



**HAL**  
open science

# Etude des gènes de réponse aux stress chez les bactéries pathogènes à Gram positif

Arnaud Chastanet

► **To cite this version:**

Arnaud Chastanet. Etude des gènes de réponse aux stress chez les bactéries pathogènes à Gram positif. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris VII, 2003. Français. NNT: . tel-04283781

**HAL Id: tel-04283781**

**<https://hal.inrae.fr/tel-04283781v1>**

Submitted on 14 Nov 2023

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

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

Université Paris VII  
Denis Diderot  
UFR de Biochimie

Unité de Biochimie Microbienne  
Institut Pasteur

# Thèse de Doctorat

Spécialité : Microbiologie

présentée par

**Arnaud Chastanet**

pour l'obtention du Diplôme de Docteur de l'Université Paris 7

## Etude des gènes de réponse aux stress chez les bactéries pathogènes à Gram positif

soutenue le 10 Juillet 2003, devant le jury composé de :

<b>M. Philippe Régnier</b>	<b>Président</b>
<b>M. Jean-Pierre Liautard</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. Patrick Trieu-Cuot</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. Anthony Pugsley</b>	<b>Examineur</b>
<b>M. Jean-Pierre Claverys</b>	<b>Examineur</b>
<b>M. Tarek Msadek</b>	<b>Directeur de thèse</b>

# **Thèse de Doctorat**

Spécialité : Microbiologie

présentée par

**Arnaud Chastanet**

pour l'obtention du Diplôme de Docteur de l'Université Paris 7

## **Etude des gènes de réponse aux stress chez les bactéries pathogènes à Gram positif**

soutenue le 10 Juillet 2003, devant le jury composé de :

<b>M. Philippe Régnier</b>	<b>Président</b>
<b>M. Jean-Pierre Liautard</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. Patrick Trieu-Cuot</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. Anthony Pugsley</b>	<b>Examineur</b>
<b>M. Jean-Pierre Claverys</b>	<b>Examineur</b>
<b>M. Tarek Msadek</b>	<b>Directeur de thèse</b>

*A mes parents.*

# Remerciements

*La fin de cette thèse marque l'achèvement de quatre années de labeur passées au sein de l'unité de biochimie microbienne. Cette période d'apprentissage a été riche de nombreuses rencontres, dont certaines auront débouché sur de solides amitiés, ainsi que -je l'espère- de durables relations. Je profite donc de cette opportunité pour remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué à créer l'excellente atmosphère qui m'aura permis de mener à bien ce travail.*

*Je remercie tout d'abord Georges « Rappaport » et André Klier pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Biochimie microbienne, pour l'intérêt qu'ils ont manifesté à l'égard de mon travail, ainsi que pour le fastidieux mais ô combien indispensable travail de correction de mes « œuvres », qu'ils ont toujours accepté avec une joie que je soupçonne feinte. A ce propos, je remercie également Christine pour son efficacité.*

*Je remercie les membres du Jury : Philippe Régnier pour avoir accepté la présidence, ainsi que Jean-Pierre Liautard et Patrick Trieu-Cuot, pour avoir accepté d'analyser ce long manuscrit dans un délai particulièrement court. Je remercie également mes examinateurs : Tony, pour ses conseils et son soutien, tant au cours de la thèse que durant la recherche du futur « post-doc », ainsi que Jean-Pierre Claverys pour nos discussions et son accueil chaleureux lors de mon séjour dans la ville rose.*

*Je remercie tous mes collaborateurs pour leur patience et leur disponibilité : Bernard Martin, Marc Prudhomme, Benoît Grossiort (pour le vélo et la chasse aux Marmottes à Asheville), Jean-Pierre Claverys et tous les membres de son équipe toulousaine ainsi qu'Ester Azoulay-Dupuis et Véronique Rieux.*

*Je remercie bien sûr The incredible TM, pour son dynamisme, son esprit brillant et sa mémoire infallible. Pardon pour tous les sobriquets dont j'ai pu t'affubler durant ces quatre ans : Chef, Master, Senseï et plus récemment... Toto, qui n'ont en rien diminué le respect que je te porte. Je tiens par la même occasion à remercier Mr Richard Brock pour son initiation au Funk et à la blaxploitation qui aura fait partie intégrale de ma formation, ainsi que le Pr Ben Rachid pour son enseignement de la génétique. Dr Tarek Jekyll and Mr T. Hyde, merci !*

*Merci à tous les membres présents et passés de l'unité et surtout à mes « co-turnes » de la pièce 2010 pour cette atmosphère conviviale, stimulante et souvent à la limite de la folie qu'ils ont su faire régner. Les anciens : Isabelle et Maryvonne pour m'avoir guidé à mon arrivée et Denis Wurst Von Frankfurt pour ses inoubliables imitations ; les hommes de passages : Eric pour avoir tenté d'instaurer la journée-de-la-gentillesse et Poupou pour ses célèbres bordées d'injures ; les Trois-drôles-de-dames (les Tarek's Angels) : Juliette, Sarah et Camille pour leur bonne humeur. Je m'excuse tout spécialement auprès de Maryvonne qui a du supporter les premières années particulièrement Rock de la pièce 2010. Enfin, je ne remercie pas : Eric pour ses goûts (!) musicaux insolites, Denis pour ses vidéos vomitives et Mr T., pour son opération annuelle de grand nettoyage (ou comment faire une demi-journée de ménage, perturber 4 scientifiques et vérifier l'intégralité des pipetmans du laboratoire pour un réisolement de 3 minutes !).*

Merci aussi à Juju, ma compagne d'infortunes scientifiques et de manips sans lendemain (« ben les manips, quand ca veut pas , ca veut pas... »), Audrey qui a dignement pris notre relais et surtout à Leyla pour... tout (la liste est trop longue).

Chauffeur occasionnel, gardien des savoirs tant scientifiques que culturels, toujours un jeu de mot au bord des lèvres et le google à la main tu es, Ô « grand maître » de la biochimie microbienne, mon second mentor. Merci à toi Philippe pour avoir inlassablement essayé (sans grand succès, je le crains) d'améliorer mes connaissances scientifiques, artistiques et historiques, égayant les périodes post-prandiales d'histoires étonnantes.

Une mention spéciale pour la « p'tite Isa », plus connue maintenant comme « Le Gourou », camarade des week-ends au labo et oreille attentive et réconfortante des fins de journées de doutes du début de la thèse ; mais aussi hôtel attitré pour les virées outre-atlantique !

Je ne saurais oublier ceux qui ont accompagné mes premiers pas dans le monde de la recherche : merci à Raymond Devoret et Adriana Bailone pour m'avoir accueilli dans le laboratoire GEMC ainsi que tous les membres du groupe. Je remercie à ce propos tout particulièrement Suzanne Sommers, pour avoir cru en moi et m'avoir redonné confiance dans un moment particulièrement difficile. Je tiens également à remercier le Pr M. Jacquet, ainsi que B. Michel qui m'ont involontairement conduit vers cette formation puis ce laboratoire, pour ma plus grande chance.

Enfin, je remercie mes proches (Leyla, Stef, Soso, Laure, Claude...) pour m'avoir supporté en toute occasion, et surtout mes parents qui m'ont toujours soutenu et laissé une totale liberté dans mes choix. Vous me soutenez encore aujourd'hui pour mon prochain départ malgré les moments difficiles que nous vivons et les doutes qu'ils génèrent. Merci à vous.

De manière générale, j'aimerais remercier tous les membres de la Biochimie Microbienne et tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont permis de passer quatre excellentes années.

# Table des matières

	pages
Avant-propos	1
INTRODUCTION	4
CHAPITRE I-Généralités sur les modèles : <i>Bacillus</i> et ses avatars	5
A- <i>Staphylococcus aureus</i>	6
B- <i>Streptococcus pneumoniae</i>	8
C- <i>Listeria monocytogenes</i>	11
CHAPITRE II-Les mécanismes de régulation de la réponse au choc thermique	14
A- <i>E. coli</i> et les autres bactéries Gram-négatives	15
1- <i>Escherichia coli</i>	15
1.1-le régulon <sup>32</sup>	15
1.2-le régulon <sup>E</sup>	19
1.3-Complémentarité des régulateurs <sup>32</sup> et <sup>E</sup>	21
2-Autres bactéries à Gram-négatif	21
3-Conclusion	24
B- <i>B. subtilis</i> et les autres bactéries Gram-positives	24
1- <i>Bacillus subtilis</i>	24
1.1-HrcA, régulateur des gènes de choc thermique de classe I	24
1.2- <sup>B</sup> , régulateur des gènes de choc thermique de classe II	28
1.3-CtsR, régulateur des gènes de choc thermique de classe III	31
1.4-La classe IV des gènes de choc thermique	34
2-Autres bactéries à Gram-positif à bas GC%	35
3-Les <i>Streptomyces</i> et les bactéries Gram-positives à haut GC%	37
Le répresseur HrcA	37
Le système HspR/HAIR	38
Le thermosenseur RheA	38
La réponse au stress thermique chez les Actinomycètes	39
CHAPITRE III-Activités biochimiques et fonctions biologiques associées	40
A-Structures et activités biochimiques	41
1-La famille des protéines Clp	41
2-Structures et fonctions	43
3-Les substrats des protéines Clp	45
B-Fonctions biologiques associées	49
1-Rôle dans la résistance aux stress et autres fonctions cellulaires	50
2-Rôle dans la virulence	52
2.1-Rôle des protéines Clp dans le processus infectieux	53
2.2-Effets sur l'induction des réponses de l'hôte	58

RESULTATS	62
CHAPITRE I-Un nouveau mode de régulation des gènes de choc thermique chez les bactéries Gram-positives	63
A-Caractérisation des régulons CtsR et HrcA de <i>S. aureus</i>	64
B- <i>S. pneumoniae</i> et <i>L. monocytogenes</i> possèdent-ils des régulons CtsR et HrcA partiellement chevauchants ?	70
C- <i>clpP</i> de <i>S. salivarius</i> est un nouveau membre de la classe des gènes de stress sous le double contrôle de CtsR et HrcA	73
D-La double régulation par CtsR et HrcA est un système largement répandu chez les bactéries à Gram-positif	74
CHAPITRE II-Analyse fonctionnelle des gènes <i>clp</i> chez les bactéries pathogènes à Gram-positif	76
A-Le rôle des gènes <i>clp</i> dans la résistance aux stress, la virulence et le développement de la compétence naturelle chez <i>S. pneumoniae</i>	76
B-ClpB est requise pour la virulence mais pas pour la résistance générale aux stress chez <i>L. monocytogenes</i>	82
DISCUSSION et PERSPECTIVES	87
I-La double régulation CtsR/HrcA-dépendante des gènes de stress	88
Le régulateur CtsR	88
Le régulateur HrcA	89
Structure des promoteurs	90
La perception du signal	92
Signification biologique	93
II-Analyse fonctionnelle des gènes <i>clp</i> chez les bactéries Gram-positives	94
La répartition des gènes <i>clp</i> chez les bactéries Gram-positives	94
La fonction des Clp	95
Les Clp de <i>S. pneumoniae</i>	96
Les Clp de <i>L. monocytogenes</i>	97
Références bibliographiques	99
Annexes	130



### Abréviations utilisées

APC	Cellules présentatrices des antigènes (Antigen Presenting Cells)
ARNP	ARN polymérase ADN-dépendante (parfois symbolisée par E)
coll	collaborateurs
GAS	Group A <i>Streptococcus</i>
GBS	Group B <i>Streptococcus</i>
GSP	Protéine de réponse à de multiples stress (General Stress Protein)
HSP	Protéine de réponse au choc thermique (Heat shock protein)
HTH	Hélice Tour Hélice
IR	motif ADN répété inversé (Inverted Repeat)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méthyciline
NBS	site de liaison à l'ATP (Nucleotide Binding Site)
pb	paires de bases
PCR	réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)
STM	mutagenèse avec étiquetage des clones (Signature Tagged Mutagenesis)
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la vancomycine

# **Avant-Propos**

*Bacillus subtilis* est une bactérie sporulante du sol. Étudiée depuis les années 40 et sujet depuis d'une abondante littérature, elle est sans doute avec *Escherichia coli* l'un des deux microorganismes les mieux étudiés, et est considérée comme le modèle des bactéries à Gram-positif.

Au sein de son environnement, *B. subtilis* est perpétuellement soumis à des modifications des conditions du milieu, telles que l'oxygénation, la quantité de nutriments disponibles, la salinité, la température ou l'acidité, qui induisent une modulation de l'expression génique. Chaque variation de ces paramètres peut être considérée comme un stress et la réponse adaptative aux variations de l'environnement est synonyme de réponse aux stress. Cette réponse adaptative est relativement bien connue chez *B. subtilis*. Elle fait intervenir des senseurs (systèmes à deux composants, senseurs de température...), des régulateurs (répresseurs ou facteurs de transcription...) et des effecteurs adaptés (enzymes détoxiquantes, protéases, chaperons moléculaires...). Enfin, la spore est la forme ultime de résistance de la bactérie, lui permettant de survivre dans des conditions extrêmes.

Ces processus fondamentaux ont été particulièrement bien étudiés chez *B. subtilis*, mais curieusement fort peu chez les autres bactéries à Gram-positif. En effet, jusqu'à ces dernières années, la recherche génétique chez les microorganismes pathogènes s'est focalisée sur les gènes directement impliqués dans la virulence, tandis que l'étude des phénomènes fondamentaux de survie se poursuivait chez les organismes modèles. Ceci est dû d'une part,

au fait que ces processus fondamentaux étaient considérés comme généralisables et d'autre part, que les fonctions dites « de ménage », n'étaient pas jugées comme jouant un rôle spécifique dans la virulence des bactéries pathogènes.

Ces dernières années ont vu se concrétiser de nombreux projets de séquençages systématiques de génomes. Depuis 1995, date de la publication du génome complet de *Haemophilus influenzae* (Fleischmann et coll., 1995), le nombre de génomes bactériens disponibles est passé à 80 et près de 150 projets de séquençage sont en cours. La disponibilité de ces génomes a eu pour conséquence de faciliter l'étude d'organismes jusqu'alors génétiquement peu étudiés, en permettant de tirer parti des acquis des bactéries modèles et en se focalisant sur certains gènes ou certaines fonctions. D'autre part, la comparaison des génomes a révélé une grande diversité de mécanismes de régulation qui, malgré des points communs dus à leur proche parenté, ne pouvaient être simplement extrapolés à partir des modèles établis chez les bactéries de référence.

L'objectif principal des travaux de thèse présentés ci-après, était la caractérisation de la réponse au stress thermique chez différents microorganismes pathogènes Gram-positifs, et plus particulièrement de la fonction et des modes de régulation des gènes de la famille *clp*. En utilisant les données du séquençage des génomes de différents organismes pathogènes à Gram-positif, nous avons identifié plusieurs gènes présentant de fortes similitudes avec des gènes de stress ou des régulateurs de ces gènes chez *B. subtilis*, ainsi que la présence de séquences opératrices potentielles dans leur promoteur. En utilisant tout d'abord *B. subtilis* comme hôte et outil, puis par des approches génétiques et biochimiques dans les organismes étudiés, nous avons pu caractériser plusieurs nouveaux gènes *clp* chez *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, et *Listeria monocytogenes* ainsi qu'un nouveau mode de régulation des gènes de réponse au choc thermique chez les bactéries à Gram-positif à bas GC %.

L'Introduction est composée de trois parties présentant les modèles bactériens étudiés, les différents mécanismes de perception et de réponse au choc thermique et enfin, les fonctions biochimiques et les activités biologiques associées aux protéines Clp. La partie Résultats présente de façon résumée les résultats avec les publications qui leur sont associées ainsi que des résultats complémentaires non publiés. Enfin, la dernière partie présente une discussion des résultats obtenus ainsi que les différentes perspectives envisagées.

# **INTRODUCTION**

## CHAPITRE I-Généralités sur les modèles

### - les avatars de *Bacillus* -

*B. subtilis* est sans doute la plus étudiée et la mieux connue des bactéries à Gram-positif et est considérée pour cette raison comme leur modèle. Son utilisation en tant que système expérimental a débuté en 1947 lorsque P.R. Burkholder et N.H. Giles ont exposé une souche Marburg de *B. subtilis* à des cycles de mutagenèse aux rayons X et UV afin d'isoler des mutants d'auxotrophie (Burkholder et Giles Jr., 1947). En 1958, J. Spizizen a démontré que *B. subtilis* pouvait être transformé par de l'ADN chromosomique exogène, ce qui constituait une première puisque seule *S. pneumoniae*, depuis la démonstration historique de Avery et coll., présentait une telle capacité (Avery, 1944; Spizizen, 1958). L'expérience fut réalisée en utilisant comme souche réceptrice la souche 168, une des souches auxotrophes pour le tryptophane isolée par Burkholder après mutagenèse. Avec l'aide de C. Anagnostopoulos, ils ont ensuite déterminé et optimisé les conditions de transformation (Anagnostopoulos et Spizizen, 1961), ouvrant la voie aux futures études génétiques, et imposant la souche 168 comme souche parentale de référence pour les laboratoires travaillant sur *B. subtilis*. Il est à noter que la mutagenèse extensive subie par cette souche a probablement modifié certaines de ces caractéristiques, au profit peut-être d'une compétence accrue puisque les isolats naturels ne présentent qu'une capacité de compétence réduite. Par la suite, la propriété de former des endospores et la facilité de manipulation génétique due à la compétence « naturelle » de la souche 168 a justifié son étude pendant des années dans une ère de recherche dominée par les travaux sur *E. coli*, considéré alors comme LE modèle bactérien. Il est cependant devenu évident que *B. subtilis* était un meilleur modèle pour les bactéries à Gram-positif que n'importe quelle bactérie à Gram-négatif, y compris *E. coli*. De la même façon, il est aujourd'hui aussi évident que les bactéries à Gram-positifs à bas GC % définissent elles-mêmes un groupe particulier, dont les membres présentent également de nombreuses différences entre eux et par conséquent aucune bactérie ne peut être une parfaite représentante de toutes les autres. Le séquençage systématique des génomes a grandement facilité l'étude des autres bactéries à Gram-positif, mais a surtout révélé de nombreuses

différences avec leur modèle. L'avancée des travaux permet de se rendre compte que chaque espèce a des caractéristiques spécifiques qui requièrent son étude.

L'étude de *B. subtilis* et des autres modèles n'est pas pour autant dépassée, car en plus de l'intérêt d'étudier ces bactéries pour leurs spécificités propres, elles restent une référence et un outil indispensable d'investigation de par leur souplesse d'utilisation et la somme des connaissances accumulées. Par contre, l'évidence est acquise que, de la même façon qu'il était important d'étudier *B. subtilis* en parallèle de *E. coli*, il est aujourd'hui important d'étudier les différences entre des espèces pourtant proches mais qui ont développé des mécanismes spécifiques qui ne sont pas extrapolables de l'étude des modèles. *B. subtilis* et *E. coli* ont perdu en partie leur position de paradigmes, mais restent des références pour l'étude des bactéries pathogènes.

## **A-*Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* est une bactérie aérobie facultative à Gram-positif non motile formant, comme son nom l'indique, des grappes de cellules lors de sa division (Gr. *Staphulê*, grain de raisin, et *Kokkos*, graine). Très commun dans l'environnement, c'est un commensal de l'homme fréquemment trouvé sur la peau ou les muqueuses, et l'on estime que 30 % de la population est porteuse de la bactérie. Cependant, c'est un pathogène opportuniste capable de provoquer une grande diversité de maladies, allant d'infections mineures cutanées à la septicémie.

Si d'autres staphylocoques comme *epidermidis* ou *haemolyticus* sont souvent rencontrés lors d'infections nosocomiales, *S. aureus* est l'espèce la plus pathogène de tous les staphylocoques. Elle est responsable de nombreux types d'infections que l'on peut classer en trois catégories : 1- les lésions superficielles et les abcès cutanés, 2- les infections systémiques graves comme les ostéomyélites, les endocardites, les pneumonies et les septicémies, et enfin 3- les toxinoses comme le syndrome de choc toxique (TSS), la nécrose épidermique toxique et l'intoxication alimentaire (second rang en France après les Salmonelles).

Sa nature ubiquiste tient principalement à la capacité des staphylocoques à résister à une large variété de stress environnementaux, ce qui la place parmi les plus résistantes des bactéries ne formant pas de spores. *S. aureus* s'adapte aux carences nutritionnelles, se développe bien en milieu complexe dans une large gamme de pH (4.8-9.4) et de température

(25°-43°C), et présente une haute tolérance aux sels (1.7M NaCl) (Novick, 1993). De plus, il présente une résistance aux désinfectants et antiseptiques expliquant sans doute sa capacité de survie en milieu hospitalier. Ces caractéristiques, alliées au fait que de nombreuses souches isolées en milieu hospitalier présentent des résistances aux antibiotiques, en font un grave problème de santé publique. Les problèmes de souches résistantes sont apparus dès l'utilisation des antibiotiques dans les années 50 et les souches résistantes à la méthicilline (ou MRSA) sont maintenant largement répandues. En juin 2002 a été isolée aux Etats-Unis la première souche pleinement résistante à la vancomycine (VRSA) (Bartley, 2002), qui constituait une arme de dernier recours contre les souches les plus résistantes. Le fait que *S. aureus* soit au premier rang, avec *E. coli*, des germes responsables de maladies nosocomiales, que près de 50 % des souches présentes dans les hôpitaux soient résistantes et souvent multi-résistantes aux antibiotiques et qu'apparaissent des souches VRSA, font aujourd'hui de ce commensal un réel problème de santé publique, et un thème de recherche en pleine expansion.

Si la recherche s'est focalisée dans les années 60 et 70 sur la mise en évidence des gènes de résistance aux antibiotiques, parallèlement à l'élucidation des modes d'action des antibiotiques ainsi que leur mode de transmission, elle a ensuite évolué vers la caractérisation d'autres facteurs de virulence et leur mode de régulation. Il a ainsi été montré que *S. aureus* exprimait un grand nombre de protéines sécrétées et de facteurs de surface dont beaucoup semblent impliqués dans son pouvoir pathogène (Arvidson, 2000; Höök et Foster, 2000), particulièrement la protéine A qui bloque certaines immunoglobulines, ainsi que de nombreuses toxines (Bohach et Foster, 2000) (entérotoxines, hémolysines, exfoliatines, toxines de choc toxique...). De plus, de nombreuses souches issues d'isolats cliniques (>90 %) présentent une capsule, dont au moins certaines, les capsules de type mucoïde, jouent un rôle dans la virulence (Lee et Lee, 2000). Enfin, on sait que *S. aureus* peut être l'objet d'endocytose par des cellules épithéliales puis persister dans le milieu intracellulaire. Cela pourrait expliquer certaines infections récurrentes, puisqu'il est démontré que *S. aureus* est même capable de s'échapper de la cellule épithéliale et d'induire l'apoptose (Lowy, 2000).

Plusieurs éléments de régulation sont impliqués dans l'expression de ces facteurs de virulence, dont l'un des plus importants et aussi le plus étudié est le système *agr* (accessory gene regulation). Le locus *agr* permet de réguler l'expression de la majorité des facteurs de virulence sécrétés *via* un mécanisme de quorum-sensing peptidique. Celui-ci est perçu par un système à deux-composants, suivi d'une cascade complexe d'induction, dont tous les acteurs ne sont pas encore connus. Cependant, plusieurs facteurs environnementaux (concentrations



**Table 1 Projets de séquençage des génomes**

	<b>Organismes</b>	<b>Souches</b>	<b>Etats</b>	<b>Origines</b>	<b>Publications</b>
<i>S. aureus</i>	Oklahoma University	NTCC 8325	annotation	NTCC	
	TIGR	COL	annotation	isolat clinique	
	Sanger Center	252 (EMRSA16)	annotation	MRSA* acquise à l'hopital (RU)	
		476	annotation	MSSA communautaire hyper virulente	
	Japanese consortium (Jutendo and Tsukuba University)	N315	<b>publiée</b>	MRSA isolée en 1982	<i>Kuroda et coll., 2001</i>
		Mu50	<b>publiée</b>	MRSA résistante à la vancomycine, isolée en 1997	<i>Kuroda et coll., 2001</i>
		MW2	<b>publiée</b>	MRSA communautaire, isolée aux USA en 1998	<i>Baba et coll., 2002</i>
<i>S. pneumoniae</i>	Sanger center	type 23F	179 contigs (18/02/02)	souche pandémique, Spanish 23F-1 multiples résistances aux antibiotiques	
	Eli Lilly & Co	R6	<b>publiée</b>	collection de laboratoire	<i>Hoskins et coll., 2001</i>
	TIGR	TIGR4	<b>publiée</b>	isolat clinique	<i>Tettelin et coll., 2001</i>
<i>L. monocytogenes</i>	European Community Consortium (Institut Pasteur)	EGD-e	<b>publiée</b>	dérivée de la souche EGD serovar1/2a	<i>Glaser et coll., 2001</i>
	TIGR	Scott A , serotype 4b	gap closure 26/11/02	isolat clinique	

\* MRSA= methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

en sel, oxygène, glucose, éthanol) et au moins cinq autres loci, *sarA*, *sarS* (*sarHI*), *rot*, *arlRS* et *sae*, sont également impliqués dans le contrôle de leur expression. Enfin, l'analyse des banques de séquences a révélé plusieurs autres homologues de Sar, dont la fonction reste à identifier [pour revue, voir (Arvidson et Tegmark, 2001; Novick, 2000)].

Le facteur sigma <sup>B</sup> de réponse aux stress semble jouer également un rôle dans l'expression de certains facteurs de virulence. En effet, un des trois promoteurs permettant l'expression du gène *sarA* est reconnu par <sup>B</sup> (Deora et coll., 1997), et la délétion de *sigB* induit l'expression du gène *hla*, qui code une exotoxine (Cheung et coll., 1999). Cependant, les effets observés, tant sur l'expression de *sar* (Cheung et coll., 1999; Gertz et coll., 2000) que sur celle d'*agr* (Cheung et coll., 1999; Horsburgh et coll., 2002), semblent contradictoires. Cette complexité est accrue du fait de l'utilisation de souches présentant différents fonds génétiques : ainsi, la souche 8325-4 porte une mutation dans le gène *rsbU* requis pour l'activité de <sup>B</sup> durant la phase exponentielle de croissance (Chan et coll., 1998).

En effet, plusieurs souches de référence sont couramment utilisées en laboratoire, dont RN8325-4 (RN450), RN4220, RN6390, COL, sans compter de nouvelles souches issues d'isolats cliniques et sélectionnées pour un phénotype particulier comme la formation de biofilms ou la résistance à un antibiotique. Parmi les quatre souches précédentes, les trois premières dérivent de la souche NTCC 8325, et présentent donc un fond génétique commun. La souche RN4220, déficiente pour le système de restriction/modification, est d'importance particulière car c'est la seule souche transformable directement par électroporation (Kreiswirth et coll., 1983). Enfin, la souche COL est un isolat clinique résistant à la méthicilline (Shafer et Iandolo, 1979).

Cette diversité des modèles se retrouve dans le nombre des projets de séquençage puisqu'on compte à ce jour 7 génomes de *Staphylococcus aureus* publiés ou en cours d'annotation (Table 1). Au commencement de mes travaux de recherche en 1999, seules les séquences partielles (contigs) des souches de laboratoire NTCC 8325 et COL étaient disponibles.

## ***B-Streptococcus pneumoniae***

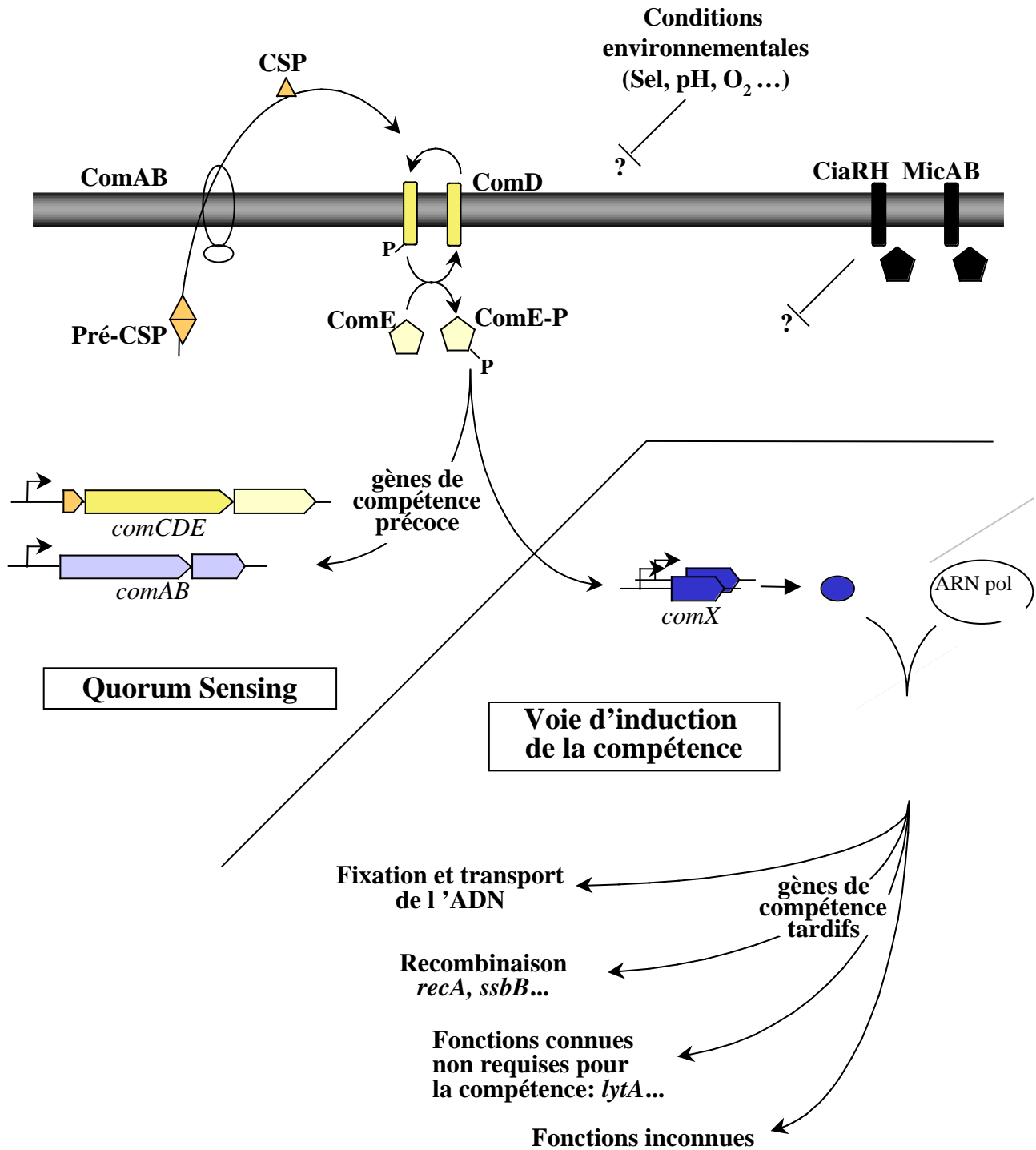
La première description publiée de *S. pneumoniae* fut réalisée en 1881 par Louis Pasteur (Pasteur, 1881). La même année, G.M. Sternberg montrait que l'injection sous-

cutanée de salive humaine chez un lapin, entraînait une forme fatale de septicémie due à la présence du pneumocoque (Sternberg, 1881). Aujourd'hui, après plus d'un siècle de recherche, *S. pneumoniae* reste sans doute une des bactéries ayant le plus apporté dans la compréhension de l'infection bactérienne et il reste le plus étudié sinon le mieux connu des streptocoques.

Les streptocoques constituent un groupe hétérogène de bactéries de formes coccoïdales, faisant généralement partie de la flore humaine ou animale, mais également fréquemment trouvés lors d'infections de gravités diverses. Plusieurs classifications sont couramment utilisées, dont celle fondée sur le caractère hémolytique des streptocoques (souches  $\alpha$ - et  $\beta$ -hémolytiques) ou celle de Lancefield basée sur une spécification sérologique. Cependant, ces différents groupes se recoupent largement et ne constituent pas de véritables taxons phylogénétiques. Ainsi les streptocoques viridans forment un groupe hétérogène de bactéries  $\beta$ -hémolytique appartenant à différents groupes de Lancefield. Parmi ceux-ci, on dénombre de nombreux pathogènes opportunistes comme *S. intermedius*, *S. anginosus*, *S. bovis*, *S. mitis*, *S. sanguis* ou encore *S. salivarius*. *S. pneumoniae* n'appartient à aucune classification de Lancefield et n'est généralement pas associé au groupe viridans bien qu'il fasse partie des streptocoques  $\beta$ -hémolytique. Ce microorganisme est cependant, avec les streptocoques de groupe A (GAS) comme *S. pyogenes*, et de groupe B (GBS) comme *S. agalactiae*, un des plus importants streptocoques du point de vue clinique.

*S. pneumoniae* est, comme la plupart des streptocoques, un commensal de l'Homme présent de façon naturelle dans les voies aériennes supérieures de près de la moitié de la population. Mais il est aussi responsable de diverses pathologies comme des angines, des sinusites et des otites et de façon plus grave, des méningites et des pneumonies fréquemment suivies de septicémies. Il entraîne ainsi chaque année la mort de près de 10 000 personnes en France.

De nombreux facteurs, le plus souvent extracellulaires, semblent impliqués dans la virulence de *S. pneumoniae*. Parmi ceux-ci, la capsule semble jouer un rôle important, puisque tous les isolats cliniques en sont pourvus et que la perte de la capsule entraîne une très forte diminution, voire une abolition de la virulence. Bien que son rôle ne soit pas totalement compris, on sait qu'elle a une action anti-phagocytaire (Garcia et coll., 2000). La pneumolysine est un autre facteur de virulence, hautement toxique pour les cellules eucaryotes. Libérée lors de la lyse cellulaire et donc dépendante de l'autolysine LytA, elle forme des pores au niveau de la membrane des cellules eucaryotes avoisinantes entraînant la



**Figure 1. Voie d'induction de la compétence chez *S. pneumoniae***

Le précurseur de la phéromone, ComC, est modifié et exporté par le complexe ABC-transporteur ComAB. L'accumulation extracellulaire du peptide phéromone CSP est détectée via le système à deux composants ComDE : le récepteur Histidine-Kinase transmembranaire ComD phosphoryle et active le régulateur transcriptionnel ComE. L'activateur ComE-P induit l'expression de l'ensemble des gènes de compétence précoces (*comAB*, *comCDE* et *comX*). Lorsque les conditions environnementales *ad hoc* (concentrations en sels...) sont remplies, la boucle de rétrocontrôle positive entraîne une forte induction des gènes de compétence précoces et du facteur de transcription ComX. Ce facteur sigma alternatif permet alors à l'ARN polymérase d'induire la transcription des gènes de compétence tardifs permettant le transport de l'ADN et la recombinaison.

lyse de ces dernières. De nombreux autres facteurs comme PspA, CbpA, NanA jouent un rôle dans la virulence de *S. pneumoniae*, même si leur rôle n'est pas toujours clairement compris [pour revue, voir (Jedrzejewski, 2001)].

Cependant, si la capsule est une caractéristique majeure de *S. pneumoniae*, la plupart des études comportant une approche génétique sont conduites dans des souches qui en sont dépourvues, et tout particulièrement dans le cadre d'études portant sur la compétence naturelle pour la transformation. En effet, l'efficacité de transformation décroît avec l'augmentation de l'épaisseur de la capsule, et jusqu'à récemment les transformations de souches capsulées restaient assez rares. Historiquement, l'utilisation de souches capsulées a donc été délaissée pour les études génétiques au profit des souches non virulentes comme la souche R6, techniquement plus souples d'utilisation.

Il est à noter que la majorité des laboratoires ayant une approche génétique de cette bactérie utilise encore aujourd'hui un nombre restreint de souches ayant une origine commune... et célèbre. En 1944, *S. pneumoniae* fut utilisé lors de l'expérience historique au cours de laquelle Avery, MacLeod et McCarty démontrèrent que le transfert des caractères génétiques se faisait grâce à l'ADN (Avery, 1944). La souche acceptrice utilisée était un variant non-capsulé dérivé d'un isolat clinique de type 2 capsulé et virulent : la souche D39. Toutes les souches non-capsulées utilisées depuis pour l'étude de la transformation sont issues d'un seul isolat clinique et de ses variants non-capsulés. Ainsi, la souche de référence R6 est un isolat obtenu en 1962, à partir de la souche R36A, elle-même obtenue en 1944 après délétion du locus spécifiant la capsule (Yother, 2000).

Cette découverte historique, qui démontra que l'ADN était le support de l'information génétique, ne fut rendue possible que grâce à une caractéristique de *S. pneumoniae* : la compétence naturelle pour la transformation. La compétence est un état physiologique transitoire de la bactérie lui permettant d'incorporer des fragments d'ADN présents dans le milieu extracellulaire, et éventuellement de les recombinaison avec son propre génome. Chez *S. pneumoniae*, cette capacité requiert d'une part, un système de captage et de recombinaison de l'ADN [pour revue voir (Dubnau, 1999)] et d'autre part, un système de régulation complexe de type quorum-sensing *via* une phéromone peptidique (Fig. 1), n'autorisant l'expression de cette machinerie que dans certaines conditions (densité de population, pH, O<sub>2</sub>...) (Claverys et Havarstein, 2002). La compétence naturelle est une propriété longtemps restée sous-estimée quant à sa présence chez les microorganismes, mais qui a été récemment recensée chez plus de 40 espèces (Lorenz et Wackernagel, 1994). Cette caractéristique relativement fréquente et requérant un nombre important de protéines finement régulées, pose

la question de la raison de la conservation d'un tel système. Parmi les différentes hypothèses formulées, le consensus actuel semble tendre vers l'adaptation et la flexibilité génétique (Claverys et coll., 2000; Dubnau, 1999).

Cette plasticité génomique pourrait ainsi permettre à *S. pneumoniae* d'augmenter sa capacité de survie au sein de son biotope naturel, l'Homme. En effet, elle pourrait être à l'origine de l'extrême polymorphisme capsulaire de *pneumoniae* (90 sérotypes capsulaires différents) et rendre compte de l'existence de gènes mosaïques à l'origine de résistances aux -lactames observées depuis quelques années. En effet, chez les isolats cliniques résistant à la pénicilline, les gènes spécifiant les protéines liant la pénicilline (PBPs) présentent des fragments d'ADN provenant d'autres espèces de streptocoques.

L'importance de *S. pneumoniae* en tant que pathogène humain et l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques expliquent sans doute l'engouement de nombreux groupes pharmaceutiques pour son génome, qui a été indépendamment séquencé à plusieurs reprises, bien que rarement publié. Cependant, les séquences génomiques de la souche R6 et d'un isolat clinique virulent (TIGR4) ont été publiées en 2001 (Table 1) et le génome d'une nouvelle souche multirésistante aux antibiotiques est actuellement en cours de séquençage au Sanger Center (RU).

### ***C-Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* est un bacille à Gram-positif non capsulé et non sporulant à bas G+C %, phylogénétiquement proche de *B. subtilis*. Le genre *Listeria* comprend six espèces dont seules *L. ivanovii* et *L. monocytogenes* sont potentiellement pathogènes. *L. monocytogenes* se retrouve dans une large gamme de niches écologiques dont le sol, l'eau, les plantes, les déjections animales et humaines. Ceci est révélateur de l'excellente capacité d'adaptation de cette bactérie qui est tolérante à de hautes concentrations en sel, à des pH relativement faibles et surtout à un large spectre de température. En effet, *Listeria* est capable de survivre aussi bien aux processus de réfrigération qu'aux pasteurisations à haute température (HTSTP, High Temperature Short Time Pasteurization, soit 72° à 85°C pendant 5 à 20 secondes) et elle est considérée comme l'une des bactéries les plus thermo-tolérantes parmi les bactéries pathogènes alimentaires non-sporulantes (Doyle et coll., 1987; Fleming et coll., 1985). Cette résistance au froid et aux traitements de stérilisation explique pourquoi

*L. monocytogenes* est un contaminant majeur de l'alimentation, à l'origine de contaminations épidémiques ou sporadiques humaines et animales, de gravités diverses.

Cependant, l'incidence de la listériose en Europe et aux Etats-Unis est en général faible avec 2 à 8 cas par an et par million d'habitants, ce chiffre pouvant être multiplié par 10 lors d'épidémies. En effet, l'ingestion de *Listeria* est heureusement le plus souvent sans conséquence bien qu'il s'agisse d'un phénomène courant, au vu de la large distribution de cette bactérie et de la grande fréquence de contamination d'aliments bruts ou manufacturés. Néanmoins, malgré cette apparente innocuité, *L. monocytogenes* est une des principales causes d'infections alimentaires. Si l'incidence de différents paramètres sur le développement d'une listériose est difficile à évaluer, un niveau de contamination élevé, la virulence de la souche, et l'état physiologique de l'hôte (personnes immunodéprimées, personnes âgées, femmes enceintes ou nouveaux-nés), jouent un rôle important dans le développement de la maladie. Les conséquences de la listériose sont alors de gravité variable : infections cutanées, gastro-entérites, ou de façon plus grave endocardites, hépatites ou encore bactériémies. En moyenne, l'issue est fatale dans 30 % des cas et jusqu'à 50 % pour les pathologies les plus sérieuses comme les méningo-encéphalites ou les abcès hépatiques (Schlech, 2000).

Si la menace potentielle de *L. monocytogenes* n'apparut que dans les années 80 lors d'une série d'épidémies, cette bactérie était déjà un modèle depuis plus de vingt ans pour les immunologistes. En effet, grâce à son développement intracellulaire, *Listeria* reste à l'abri de la réponse immunitaire humorale. Son étude a donc permis de grandes avancées dans la caractérisation de la réponse immunitaire cellulaire en mettant en évidence l'importance de l'activation des macrophages, le rôle des lymphocytes T dans le développement d'une réponse spécifique, et l'interaction entre éléments spécifiques (lymphocytes) et non-spécifiques (macrophages) du système immunitaire (Portnoy et coll., 2002; Shen et coll., 1998).

A partir des années 80, les mécanismes responsables de la virulence de *Listeria* commencèrent à être étudiés d'un point de vue génétique et aujourd'hui, *L. monocytogenes* est un modèle pour l'étude des mécanismes moléculaires du parasitisme intracellulaire. Ainsi, de nombreux gènes et protéines impliqués dans le processus infectieux ont pu être mis en évidence [pour revue, voir (Cossart et Lecuit, 1998; Vazquez-Boland et coll., 2001)]. Il a été montré que l'entrée de *Listeria* dans les cellules s'effectue par phagocytose (macrophages) ou par phagocytose induite (cellules non phagocytaires). Ceci requiert l'interaction de protéines de surfaces appelées internalines (InlA et InlB) avec un récepteur membranaire, comme l'E-cadhérine dans le cas des cellules épithéliales. Après internalisation, la bactérie s'échappe du phagosome en lysant la membrane grâce à une phospholipase (PI-PLC) et une toxine formant

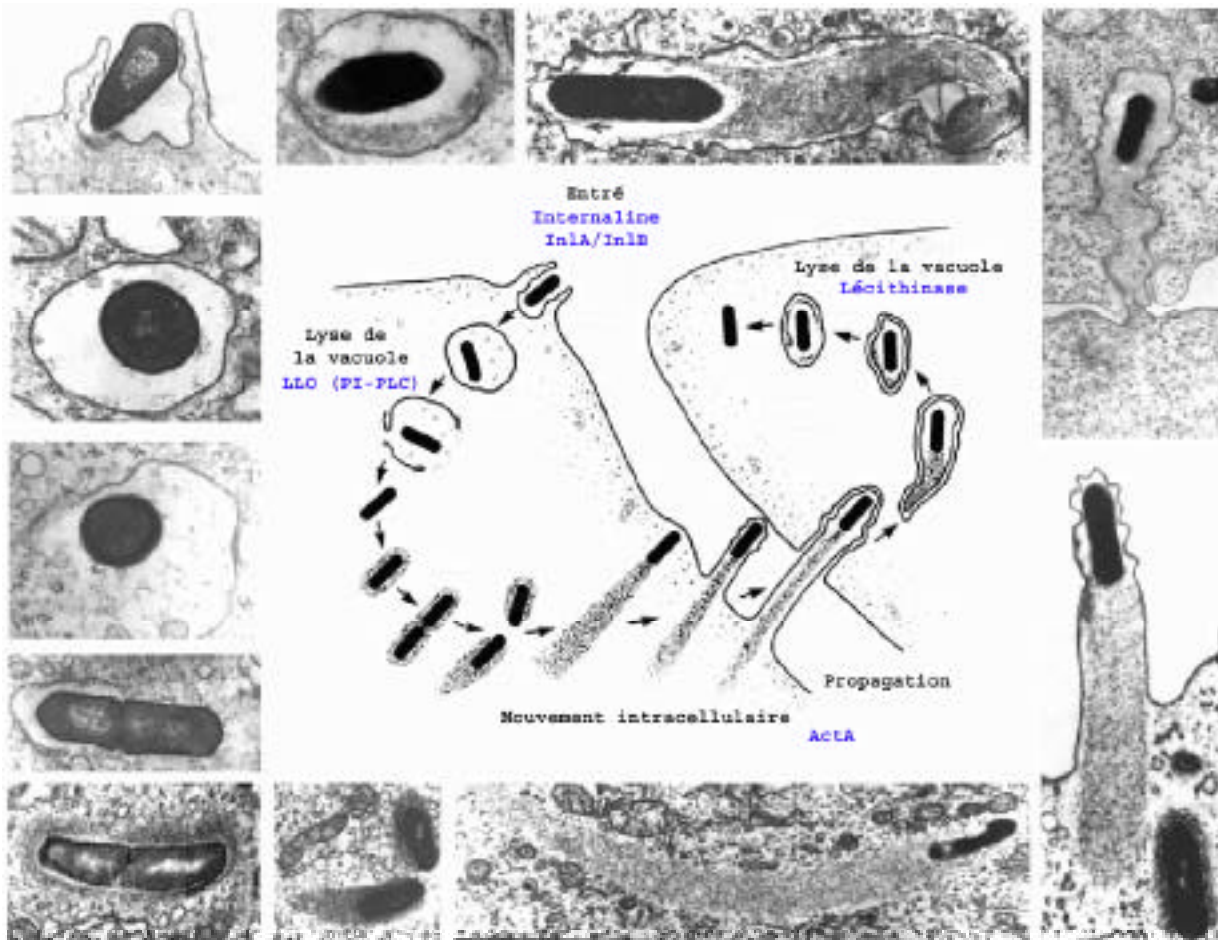


Figure 2A. Cycle d'infection de *L. monocytogenes* chez l'hôte  
(D'après Portnoy et coll., 2002 et Cossart et Lecuit, 1998)

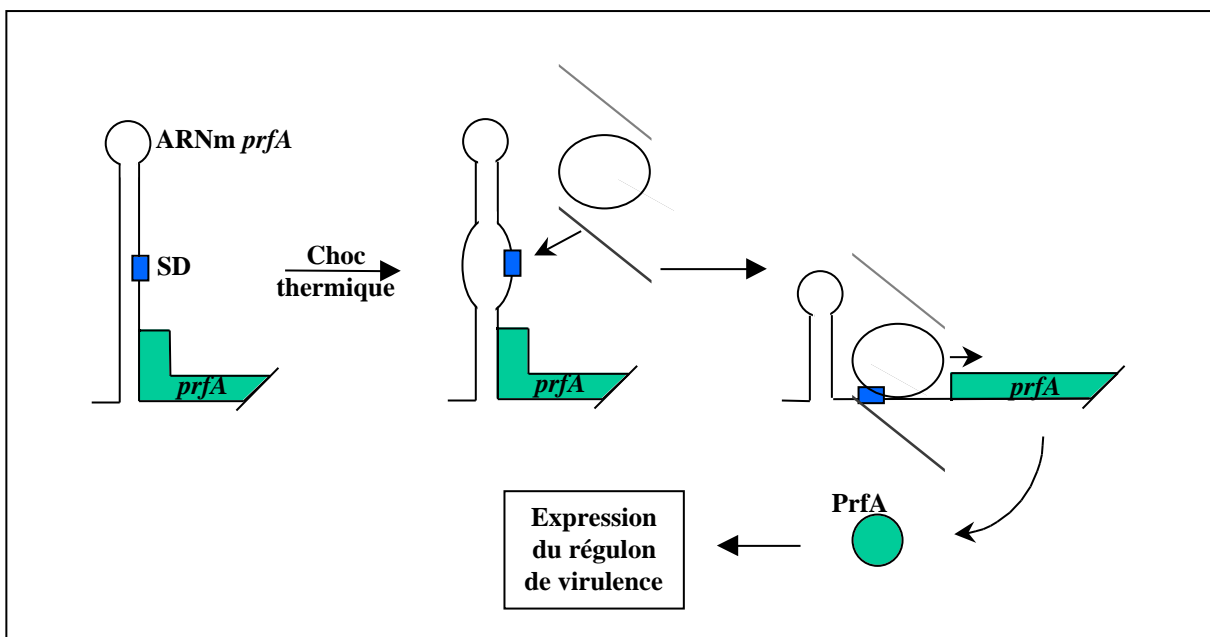


Figure 2B. Mécanisme de thermo-induction de l'expression du régulateur de virulence PrfA de *L. monocytogenes*  
D'après Johansson et coll., 2002



des pores, la listeriolysine O (LLO). Elle peut alors se diviser dans le cytoplasme et se déplacer par polymérisation de l'actine grâce à la protéine AtcA. Ainsi, elle peut gagner les cellules avoisinantes sans passer par le milieu extracellulaire (Fig. 2A). La bactérie lyse alors les deux membranes dont elle se retrouve entourée grâce à une lécithinase (PlcB) et peut poursuivre ses cycles de division/invasion.

L'ensemble de ces gènes est sous le contrôle d'un régulateur pléiotrope, PrfA, et ne s'exprime que si la température est supérieure à 30°C et de façon maximale à 37°C, la température de l'hôte. L'ARN correspondant au gène *prfA* contient en effet une structure en tige et boucle, stable à basse température, empêchant la fixation du ribosome (Fig. 2B). L'instabilité de la structure à 37°C autorise alors la traduction de l'ARN (Johansson et coll., 2002), et l'activateur transcriptionnel PrfA peut induire sa propre expression ainsi que celles, entre autres, de *plcA* (PI-PLC), *hly* (LLO), *actA*, *plcB* et partiellement *inlAB*.

Il est remarquable que ces gènes de virulence, placés sous le contrôle de PrfA, soient tous physiquement regroupés au sein d'un îlot de pathogénie, appelé LIPI-1 (*Listeria pathogenicity island-1*). Ce groupe de gènes a probablement été acquis par transfert horizontal, et est également retrouvé chez *L. ivanovii* mais est absent des souches non pathogènes, à l'exception de *L. seeligeri*. Cependant, chez ce dernier, l'îlot présente plusieurs insertions de gènes dont un entre *prfA* et *plcA* interrompant la boucle d'auto-induction de *prfA*, nécessaire pour l'activation du système. Le séquençage de ce locus de virulence chez les différentes espèces du genre *Listeria*, confirme le rôle déterminant de cet îlot de pathogénicité et révèle la part importante de la plasticité génétique dans l'évolution de la virulence de *L. monocytogenes*. Dans le même sens, les génomes de *L. monocytogenes* et *L. innocua* ont été séquençés de façon simultanée en 2001 (Glaser et coll., 2001), afin d'apporter de nouvelles pistes pour la caractérisation de facteurs associés à la virulence.

Si le travail effectué ces quinze dernières années a beaucoup apporté à la compréhension des mécanismes de virulence de *L. monocytogenes*, de nombreux autres facteurs restent à découvrir. Le séquençage complet du génome de la souche EGD-e, qui dérive de la souche EGD utilisée dans les années 60 par Mackaness, faisant de cette bactérie un modèle, et le nouveau projet de séquençage de TIGR, devraient ainsi faciliter cette approche.

## CHAPITRE II- Les mécanismes de régulation de la réponse au choc thermique

On peut définir le stress comme toute modification des conditions de l'environnement perturbant la croissance. Ceci inclut la présence de composés ayant des effets délétères sur les composants cellulaires, comme les drogues, le sodium, les métaux, les ions oxydants, les paramètres physiques comme le froid et la chaleur, et la diminution d'un composé comme la carence en nutriments ou en oxygène. La cellule stressée a plusieurs solutions pour optimiser sa survie : une réponse générale aux stress (sous contrôle de  $\sigma^S$  chez *E. coli* et  $\sigma^B$  chez *B. subtilis*) qui permet d'augmenter la résistance globale de la bactérie, des réponses spécifiques adaptées au problème rencontré et des mécanismes extrêmes comme la sporulation ou la mort programmée.

En effet, chaque stress entraîne un ensemble d'effets particuliers qui nécessitent des réponses adaptées. Par exemple, le froid va diminuer la fluidité membranaire et stabiliser les structures secondaires des acides nucléiques et requiert donc la modification du degré de saturation des acides gras et l'expression de chaperons limitant ces structures secondaires. En revanche, le stress osmotique fait varier la turgescence, le stress oxydant endommage protéines, ADN et membranes, et l'acidité perturbe les réactions chimiques, ce qui implique pour chacun de ces stress des solutions différentes. Les bactéries ont donc développé en réponse à chaque stress thermique, osmotique, acide, oxydant, nutritif, métallique ou froid, des systèmes de réponses spécifiquement adaptés.

Cependant, ces systèmes agissent fréquemment de façon croisée : plusieurs stress peuvent activer une même voie de régulation, par exemple les stress oxydant, éthanolique et salin peuvent entraîner l'accumulation de protéines dénaturées et donc induire les gènes de réponse au choc thermique. A l'inverse, un stress important peut activer plusieurs voies, par exemple un stress oxydant important induit l'expression des protéines de la réponse générale aux stress, celle de protéines détoxifiantes (superoxyde dismutase...), et celle de chaperons de stress thermique (GroESL...). Par conséquent, il est difficile d'associer un gène à un type de stress, et il est préférable d'associer un gène avec une voie de régulation, ce régulon étant inductible par un ou plusieurs stress.

Le choc thermique se traduit dans la bactérie par l'accumulation de protéines repliées de façons incorrectes, qui non seulement ne sont plus actives, mais forment des agrégats difficiles à éliminer et pouvant être délétères pour la cellule. Il entraîne l'induction de mécanismes de protection spécifiques qui permettent la réactivation ou l'élimination des protéines dénaturées et dans certaines espèces l'induction de la réponse générale aux stress (voir Chapitre III).

Dans ce chapitre, sont passés en revue les différents processus mis en jeu pour contrôler l'expression des protéines de choc thermique ou HSP (pour Heat Shock Proteins), et donc les mécanismes permettant à la cellule de percevoir le stress, en l'occurrence l'augmentation de la température.

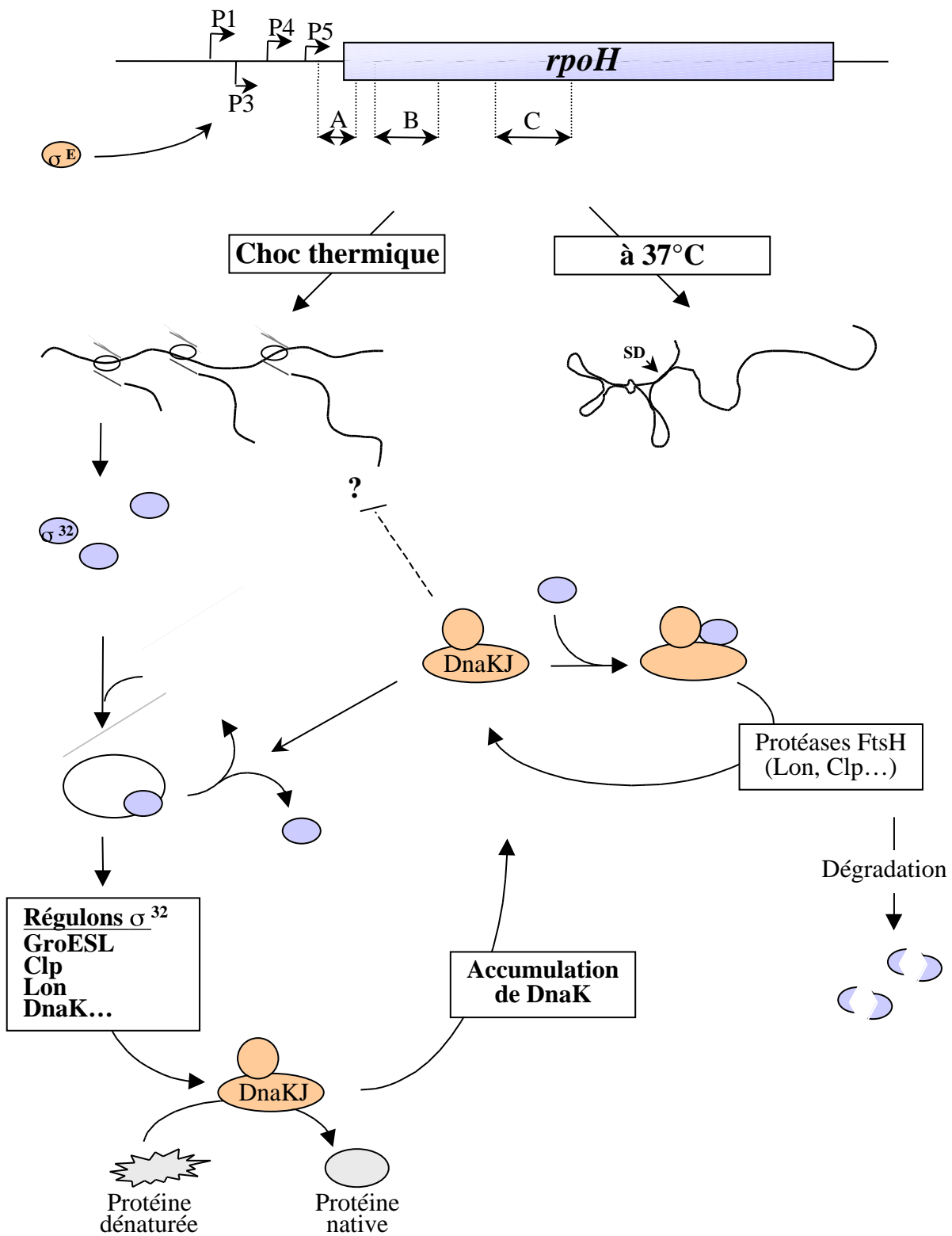
## **A-*E. coli* et autres bactéries Gram-négatives**

### **1-*Escherichia coli***

Une augmentation de température de 30° à 42°C se traduit chez *E. coli* par l'induction immédiate, d'un facteur 10 à 15, de la synthèse des protéines de choc thermique. Le maximum d'induction est atteint 5 minutes seulement après le début du stress, et ces protéines peuvent atteindre 20 % du total des protéines néo-synthétisées. Cette induction est ensuite suivie d'une diminution graduelle pendant 20 à 30 minutes jusqu'à un nouvel état stationnaire. Cependant, la réponse est modulée en fonction de l'importance du stress et de sa durée. La majorité des gènes exprimés en réponse au choc thermique, sont contrôlés par deux facteurs sigma alternatifs :  $\sigma^{32}$  et  $\sigma^E$  (24).

#### **1.1-le régulon $\sigma^{32}$**

La plupart des HSPs sont contrôlées par le facteur sigma  $\sigma^{32}$  qui est spécifié par le gène *rpoH* (*htpR*). C'est également le premier facteur sigma alternatif mis en évidence chez *E. coli* (Grossman et coll., 1984; Landick et coll., 1984). Le régulon  $\sigma^{32}$  comporte au minimum une trentaine de gènes dont un tiers environ sont de fonction inconnue (Gross, 1996). Les autres gènes spécifient majoritairement des chaperons moléculaires comme GroESL, DnaK/J, HtpG, ClpB et des protéases comme Lon, ClpX/P, ClpY/Q, FtsH, ces deux fonctions étant requises pour l'élimination des protéines dénaturées à la suite du stress thermique (voir chapitre III).



**Figure 3. Le régulateur de réponse au stress RpoH de *E. coli* est contrôlé aux niveaux transcriptionnel et post-traductionnel**

### Régulation transcriptionnelle de l'expression de *rpoH*

Le gène *rpoH* est transcrit à partir de quatre promoteurs dont trois (P1, P4, P5) sont reconnus par la forme végétative de l'ARN polymérase (ARNP<sup>-70</sup>) (Fig. 3). Les promoteurs P1 et P4 permettent l'expression constitutive de *rpoH* (Erickson et coll., 1987), tandis que P5 requiert la présence d'AMPc et de CRP et est donc un promoteur sensible à la répression catabolique (Nagai et coll., 1990). Le promoteur P3 permet l'expression du transcrit grâce au facteur sigma alternatif <sup>E</sup> (Erickson et coll., 1987), lorsque la température s'élève. En effet, le facteur <sup>70</sup> étant thermo-sensible, la transcription à partir des promoteurs P1, P4 et P5 décroît progressivement au fur et à mesure de l'augmentation de la température, pour être nulle au-delà de 48°C (Blaszczak et coll., 1995; Erickson et coll., 1987). A l'inverse, alors qu'à 30°C la part des transcrits issus du promoteur P3 est inférieure à 3 %, celle-ci augmente avec l'élévation de température pour atteindre 100 % à 50°C (Erickson et coll., 1987). Enfin, d'autres facteurs comme le complexe cAMP-CRP/CytR (Kallipolitis et Valentin-Hansen, 1998), ou DnaA (Wang et Kaguni, 1989b) pourraient moduler l'expression de ce gène et adapter l'expression basale de *rpoH* et donc des HSPs en fonction des conditions de croissance. Cependant, si l'expression de *rpoH* est adaptable en fonction de certaines conditions du milieu, la transcription de ce gène est globalement constante quelle que soit la température.

### Régulation traductionnelle de l'expression de *rpoH*

L'induction de la synthèse de <sup>32</sup> en condition de stress thermique est due à une combinaison de facteurs agissant au niveau post-transcriptionnel. L'analyse génétique a mis en évidence un contrôle traductionnel de l'expression de *rpoH*, avec la caractérisation de deux régions impliquées dans la thermorégulation, présentes en 5' de l'ARNm (Kamath-Loeb et Gross, 1991; Nagai et coll., 1991). D'une part la région A, correspondant aux nucléotides 6 à 20, dont la délétion entraîne une expression faible et non-inductible, inférieure même à celle du gène sauvage à 30°C. Cette région en aval du codon AUG, appelée « downstream box », est homologue à un domaine de l'ARNr 16S et pourrait stimuler la traduction par interaction directe et stabilisation de la sous-unité 30S du ribosome (Sprengart et coll., 1990). D'autre part, la région B, correspondant aux nucléotides 112 à 208, dont la délétion entraîne l'expression constitutive et forte de *rpoH*. Ce domaine, qui réprime l'expression de *rpoH*, forme une structure secondaire dans laquelle sont associés la région A et le codon de

démarrage de la traduction (Morita et coll., 1999a; Nagai et coll., 1991). Cette structure est stable à basse température, mais devient instable lorsque la température s'élève, libérant le domaine de démarrage et permettant au ribosome de démarrer la traduction (Fig. 3). La démonstration *in vitro*, par la technique de « toe-print », de la fixation du ribosome sur l'ARNm de *rpoH* en fonction de la température a confirmé que la structure secondaire de l'ARN était nécessaire et suffisante pour le contrôle traductionnel, en l'absence de facteurs additionnels (Morita et coll., 1999b). Ainsi, la structure de l'ARN messager de *rpoH* joue le rôle d'un thermomètre cellulaire en permettant la synthèse de  $\sigma^{32}$  en fonction de la température.

### **Régulation post-traductionnelle : inactivation et dégradation de $\sigma^{32}$**

Grâce à ce système thermo-sensible, l'accroissement de température entraîne l'augmentation de la synthèse du facteur  $\sigma^{32}$ , permettant ainsi l'expression du régulon de choc thermique. La concentration de  $\sigma^{32}$  est ainsi multipliée par 15 dans les 5 minutes suivant l'accroissement de température. Cette accumulation rapide est également due à la stabilisation de la protéine dont la demi-vie passe de 2 minutes à 30°C à 6 minutes à 42°C (Straus et coll., 1987). Cependant, ce pic d'expression est suivi d'une phase d'adaptation au cours de laquelle la traduction de l'ARNm *rpoH* décroît rapidement ainsi que la quantité de facteur sigma disponible. Ceci entraîne la chute de l'expression du régulon  $\sigma^{32}$ , qui atteint un nouvel état stationnaire : c'est l'extinction du signal (shutoff) (Straus et coll., 1987). Enfin, en cas de retour à une température de croissance basse, l'expression du régulon est rapidement inhibée.

L'extinction du signal pour atteindre l'état stationnaire à 42°C ou le retour à l'état basal à 30°C, est complexe et fait appel à plusieurs facteurs : la diminution de la synthèse de  $\sigma^{32}$  par inhibition de la traduction, l'inactivation du facteur sigma (on parle aussi de modulation de l'activité) et enfin sa dégradation.

La diminution de la synthèse de  $\sigma^{32}$  joue évidemment un rôle important, et ce d'autant plus que la demi-vie du régulateur est relativement courte, même à haute température. Cette chute d'expression de  $\sigma^{32}$  met en jeu la région C du régulateur, un petit fragment correspondant aux nucléotides 364 à 433 du transcrit (Nagai et coll., 1994), et serait médiée par les chaperons DnaK, DnaJ et GrpE (Straus et coll., 1990). Elle survient probablement au niveau traductionnel, car l'expression du gène est constante (Straus et coll., 1987) et la stabilité de  $\sigma^{32}$  dépend de la séquence en acides aminés et non de la séquence nucléotidique (Nagai et coll., 1994). Jusqu'à récemment, le modèle proposé supposait que DnaK ou DnaJ

pourraient interagir avec les chaînes naissantes de  $^{32}$  au niveau de la région C et inhiber la traduction (Nagai et coll., 1994). Mais plus récemment, il a été proposé que la diminution apparente de traduction serait en fait due à la demi-vie extrêmement courte de  $^{32}$  ( $t_{1/2}=20$ s) à haute température (Morita et coll., 2000).

L'inactivation du facteur sigma est également due aux protéines de choc thermique DnaK, DnaJ et GrpE, considérées comme des modulateurs de l'activité de  $^{32}$  (Straus et coll., 1990; Straus et coll., 1989). Celle-ci interviendrait d'une part, par la ségrégation du facteur sigma par une liaison ATP-dépendante entre ces protéines et  $^{32}$  (Gamer et coll., 1992; Gamer et coll., 1996; Liberek et coll., 1992; Liberek et Georgopoulos, 1993; Liberek et coll., 1995), d'autre part, par la dissociation du complexe ARN-polymérase- $^{32}$  ( $E^{32}$ ) (Liberek et Georgopoulos, 1993), et enfin par l'adressage du facteur sigma à des protéases, permettant ainsi sa dégradation (Straus et coll., 1990).

L'instabilité du facteur sigma est due à sa dégradation par plusieurs protéases membranaires et cytosoliques. Extrêmement instable à basse température ( $t_{1/2}=1$ min), il semblerait que  $^{32}$  soit transitoirement stabilisé durant les premières minutes suivant le stress ( $t_{1/2}=8$ mn) pour redevenir hautement instable après 5 minutes ( $t_{1/2}=20$ s), suggérant que cette instabilité participe au phénomène d'extinction (Kanemori et coll., 1999a; Tilly et coll., 1989). FtsH (HflB), une métalloprotéase à zinc trans-membranaire appartenant à la famille des ATPase de type AAA (pour ATPase Associated with various Activities), est la protéase majeure requise pour la dégradation de  $^{32}$  et sa délétion entraîne une augmentation de la demi-vie du régulateur d'un facteur 12 (Herman et coll., 1995; Tomoyasu et coll., 1995). EcfE, une protéase membranaire dont l'expression est sous contrôle du facteur  $E$  (Dartigalongue et coll., 2001b), pourrait également participer à la protéolyse de  $^{32}$  et  $E$  (Dartigalongue et coll., 2001a). Cependant, le caractère essentiel du gène rend difficile l'évaluation de la part prise par cette protéase dans l'instabilité du facteur sigma, particulièrement à haute température. D'autres protéases cytosoliques participent également à la dégradation de  $^{32}$  dont ClpYQ (HslUV), Lon, ClpXP (Kanemori et coll., 1997) et ClpAP (Wawrzynow et coll., 1995). Les chaperons pourraient eux aussi jouer un rôle clef en présentant le facteur sigma aux protéases (Straus et coll., 1990) même si ce mécanisme n'a pu être démontré *in vitro* (Blaszczak et coll., 1999).

Cependant, cette instabilité ne semble pas être la cause de l'extinction du signal. En effet, l'inactivation de la protéase FtsH entraîne, à 42°C, une forte accumulation du régulateur mais sous une forme inactive, puisqu'elle n'est pas suivie de l'induction des gènes de choc

thermique (Tatsuta et coll., 1998; Tomoyasu et coll., 1998). Cette expérience a confirmé l'idée d'un découplage entre inactivation et dégradation (Straus et coll., 1989), et a conduit à l'idée que DnaK est le vrai senseur du stress (Tomoyasu et coll., 1998). Cependant, la part relative de l'activité, de la stabilité, et du taux de synthèse dans le contrôle de  $\sigma^{32}$  reste sujet à controverse (Kanemori et coll., 1999a; Morita et coll., 2000).

Ainsi, caractérisé en 1983 comme répresseur de la réponse au choc thermique de *E. coli* (Tilly et coll., 1983), DnaK, avec DnaJ et GrpE, influe sur l'activité de  $\sigma^{32}$  à plusieurs niveaux : en séquestrant le facteur sigma par association physique directe, évitant ainsi la formation du complexe E  $\sigma^{32}$ , en inhibant sa traduction et en permettant sa dégradation par les protéases.

Ces résultats ont permis de valider le modèle proposé dès 1990 pour le contrôle homéostatique de la réponse au choc thermique (Gamer et coll., 1996; Straus et coll., 1990), dans lequel la quantité de forme libre de chaperons joue le rôle de thermomètre cellulaire. Pour résumer de façon simple, on peut dire que l'augmentation de la température entraîne l'accumulation de protéines dénaturées et donc le besoin en protéines chaperons. La quantité de forme libre de ces chaperons va par conséquent drastiquement diminuer. Le facteur sigma s'accumule alors sous forme libre grâce à la déstabilisation des structures secondaires de l'ARNm (voir Régulation traductionnelle) et à l'absence de répression traductionnelle. Le facteur végétatif  $\sigma^{70}$  étant instable à haute température,  $\sigma^{32}$  devient alors la forme majoritaire et s'associe à l'ARN polymérase pour induire le régulon de choc thermique (Blaszczak et coll., 1995).

Lorsque la quantité de chaperons augmente, ceux-ci exercent un rétrocontrôle négatif aux différents niveaux précédemment évoqués, ramenant à un nouvel état stationnaire la quantité de la forme libre de  $\sigma^{32}$  et donc le niveau d'expression du régulon (Fig. 3).

Lorsque la température diminue, en plus de la chute de la synthèse de  $\sigma^{32}$ , DnaK permettrait la réactivation des formes agrégées de  $\sigma^{70}$  et favoriserait la formation du complexe E  $\sigma^{70}$  au détriment de  $\sigma^{32}$ , permettant ainsi le retour à l'expression basale du régulon végétatif (Blaszczak et coll., 1995).

## 1.2-le régulon $\sigma^E$

Le second régulateur induit par le stress thermique est le facteur sigma alternatif  $\sigma^E$  (Erickson et Gross, 1989; Wang et Kaguni, 1989a), spécifié par le gène *rpoE* (Raina et coll.,



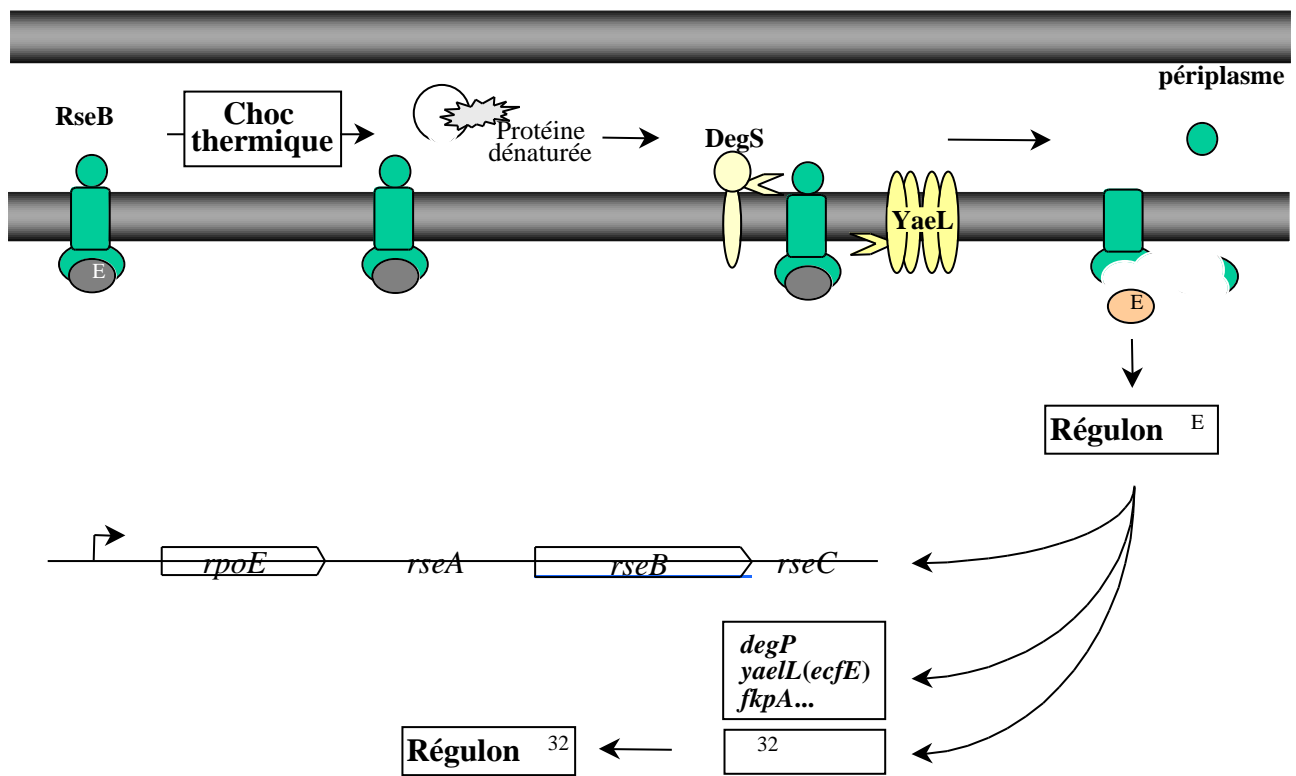


Figure 4. Mécanisme d'induction du facteur de stress  $\sigma^E$

1995). Son activation résulte de l'accumulation de protéines dénaturées dans le périplasma (Mecenas et coll., 1993), qui peuvent résulter entre autre d'un stress thermique. En plus d'induire sa propre synthèse, il régule l'expression de plusieurs protéines requises pour son activation (voir ci-après), ainsi que d'autres protéines périplasmiques dont la protéase DegP (HtrA) (Erickson et Gross, 1989; Hiratsu et coll., 1995) et la peptidyl-prolyl isomérase FkpA (Danese et Silhavy, 1997), requises respectivement pour la dégradation et le repliement des protéines. Enfin, une vingtaine de gènes dont les promoteurs présentent un motif de reconnaissance caractéristique pourraient être également contrôlés par  $\sigma^E$  (Dartigalongue et coll., 2001b). En plus de l'activation de ces gènes nécessaires à la résistance au stress périplasmique,  $\sigma^E$  induit également l'expression de *rpoH* via le promoteur P3 (Erickson et Gross, 1989; Wang et Kaguni, 1989a), et régule donc indirectement l'expression de l'ensemble du régulon  $\sigma^E$ .

### Contrôle de l'expression de *rpoE*

$\sigma^E$  appartient à la famille des facteurs sigma de type ECF, qui comprend des facteurs contrôlant l'expression de gènes requis pour des fonctions extra-cytoplasmiques. Au niveau transcriptionnel,  $\sigma^E$  s'autorégule positivement grâce à la présence d'un site opérateur dans la région promotrice de *rpoE* (Raina et coll., 1995). *rpoE* est le premier gène d'un opéron comportant trois autres gènes, *rseA*, *rseB* et *rseC* (pour Regulator of Sigma E), lesquels spécifient les protéines régulatrices de  $\sigma^E$  (Fig. 4). RseA est un facteur anti-sigma de localisation trans-membranaire, qui réprime  $\sigma^E$ , RseB est une protéine périplasmique réprimant  $\sigma^E$  probablement *via* RseA, et RseC pourrait moduler positivement  $\sigma^E$  (De Las Penas et coll., 1997; Missiakas et coll., 1997). Il a été montré que lors d'un stress, la dégradation rapide de RseA entraîne l'augmentation rapide de la forme libre de  $\sigma^E$  et par conséquent l'induction du régulon  $\sigma^E$  (Ades et coll., 1999). Cette dégradation requiert la protéase DegS, une protéine trans-membranaire homologue à DegP dont le site actif est périplasmique (Alba et coll., 2001) et la protéase à Zn YaeL (EcfE) (Alba et coll., 2002; Dartigalongue et coll., 2001a; Kanehara et coll., 2002) qui est elle aussi trans-membranaire et serait contrôlée par  $\sigma^E$  (Dartigalongue et coll., 2001b). Dans ce système, RseB pourrait être le senseur du stress. En effet, il présente la capacité de se fixer à RseA ainsi qu'aux protéines périplasmiques dénaturées (Collinet et coll., 2000). Il a donc été supposé que RseB protégerait RseA de la dégradation en absence de stress, mais se fixerait aux protéines dénaturées lors du stress, livrant ainsi le facteur anti-sigma aux protéases.

### 1.3- Complémentarité des régulateurs $\sigma^{32}$ et $\sigma^E$

Ainsi,  $\sigma^{32}$  et  $\sigma^E$  sont deux régulateurs complémentaires, induits consécutivement à des stress thermique, oxydant ou autres. L'induction de chacun d'eux est due à l'accumulation de protéines dénaturées dans un compartiment cellulaire spécifique, et permet une réponse cytosolique ou périplasmique appropriée. Cependant,  $\sigma^E$  peut aussi être considéré comme un système de secours lors du stress thermique, et particulièrement aux températures létales ( $>50^\circ\text{C}$ ), permettant l'expression des protéines cytosoliques. En effet, *E. coli* pourrait avoir permis l'évolution d'un mécanisme permettant l'expression de la réponse au stress cytoplasmique grâce à  $\sigma^E$ , lequel présente les avantages d'être induit par la température, actif (contrairement à  $\sigma^{70}$ ) et stable (contrairement à  $\sigma^{32}$ ) même à très haute température. [Pour revue sur le stress de *E. coli*, voir (Bukau, 1993; Gross, 1996; Yura et coll., 2000)].

## 2- Autres bactéries à Gram-négatif

La réponse au choc thermique chez *E. coli* est, de loin, la mieux étudiée et est longtemps restée un paradigme pour la régulation du choc thermique bactérien. Depuis quelques années, la mise en évidence de plusieurs répresseurs impliqués dans cette régulation chez *B. subtilis*, le modèle des bactéries à Gram-positif, a restreint la vision dogmatique de cette régulation *via* un unique facteur sigma alternatif aux seules bactéries Gram-négatives. Pourtant, si les bactéries relativement proches de *E. coli* comme *Pseudomonas aeruginosa* (Benvenisti et coll., 1995) semblent partager le régulateur RpoH et probablement certains éléments de régulation post-transcriptionnelle (Nakahigashi et coll., 1995, 1998), il existe de plus en plus d'exemples de régulation différente de ce modèle. Les mécanismes mis en jeu sont alors variés et font intervenir des activateurs et des répresseurs dans des réseaux d'interactions complexes, agissant généralement au niveau transcriptionnel, comme chez *Helicobacter pylori*, *Agrobacterium tumefaciens* ou encore *Bradyrhizobium japonicum*.

### Les $\gamma$ -protéobactéries

Dans ce groupe auquel appartient *E. coli*, plusieurs homologues de *rpoH* ont pu être mis en évidence : chez *Citrobacter freundii* (Garvin et Hardies, 1989) et *Pseudomonas aeruginosa* (Naczynski et coll., 1995) tout d'abord, puis chez divers  $\alpha$ - et  $\beta$ -protéobactéries (Nakahigashi et coll., 1998; Yura et coll., 2000). Leur comparaison a révélé de fortes similitudes de séquences (66 à 90 % d'identité) ainsi que la conservation chez les  $\gamma$ -

protéobactéries de la région A et d'un groupe de 9 acides aminés situés dans la région C de la séquence protéique, conservé à 100% et appelé boîte RpoH (RpoH box) (Nakahigashi et coll., 1995, 1998). La conservation de la structure secondaire de l'ARN messager permettant un appariement entre les régions A et B suggère que le mécanisme de régulation post-transcriptionnelle décrit chez *E. coli* soit conservé dans ce groupe. De plus, l'analyse de la séquence promotrice des gènes *rpoH* a invariablement révélé la présence de séquences opératrices potentielles pour  $\sigma^{32}$ , suggérant une régulation similaire à celle de *E. coli* chez les  $\alpha$ -protéobactéries.

Mais récemment, la caractérisation de l'opéron *dnaK* de *Xanthomonas campestris* a révélé la présence d'un gène homologue à *hrcA* de *B. subtilis* (Weng et coll., 2001). Ce gène spécifie le régulateur HrcA, lequel réprime l'expression de gènes de choc thermique par interaction directe avec une séquence répétée inversée appelée CIRCE (voir partie II-B-1.1). Ceci suggère la coexistence de deux mécanismes de régulation transcriptionnelle positif et négatif au sein même du groupe des  $\alpha$ -protéobactéries.

### Les $\alpha$ -protéobactéries

Plusieurs bactéries de ce groupe ont été relativement bien étudiées au niveau de la réponse au choc thermique ces dernières années. Un ou plusieurs homologues de *rpoH* ont été mis en évidence chez *Caulobacter crescentus*, *A. tumefaciens* et *B. japonicum* chez lesquels  $\sigma^{32}$  participe à l'induction de certains gènes lors du stress thermique (Nakahigashi et coll., 1999; Nakahigashi et coll., 1995; Narberhaus et coll., 1998b; Narberhaus et coll., 1997; Narberhaus et coll., 1996; Reisenauer et coll., 1996; Wu et Newton, 1996). Bien que chez ces bactéries le contrôle semble essentiellement transcriptionnel (Nakahigashi et coll., 2001; Wu et Newton, 1997), DnaK de *C. crescentus* pourrait agir sur l'activité du régulateur  $\sigma^{32}$  durant la phase adaptative (Nakahigashi et coll., 2001). Mais cette réponse dépend également du répresseur transcriptionnel HrcA. En effet, l'opéron *groESL* d'*A. tumefaciens* est réprimé à basse température et cette répression requiert la présence du motif CIRCE reconnu par HrcA (Nakahigashi et coll., 1999; Segal et Ron, 1996a) ; de même, l'expression de l'opéron *groESL* de *C. crescentus*, lequel est précédé de la séquence opératrice CIRCE, est induite dans un mutant de délétion de *hrcA* (Roberts et coll., 1996) ; enfin, la répression des opérons *groESL*<sub>4</sub> et *groESL*<sub>5</sub> chez *B. japonicum* est abolie dans un mutant *hrcA* ou lorsque des mutations sont introduites dans les motifs CIRCE ; de plus, *in vitro*, la protéine HrcA purifiée peut se fixer sur les régions promotrices de ces opérons (Babst et coll., 1996; Minder et coll., 2000).

En plus de RpoH et HrcA, au moins deux autres systèmes de régulation sont impliqués dans la réponse au choc thermique chez les  $\alpha$ -protéobactéries. Chez *A. tumefaciens* il a été montré qu'une trentaine de gènes sont induits par la température, même en absence de *rpoH* et *hrcA*, suggérant l'existence d'un troisième régulateur encore inconnu (Rosen et coll., 2002). D'autre part, chez *B. japonicum*, une séquence de 100 nucléotides, appelée ROSE, est présente en amont de quatre opérons et permet la répression à basse température de *rpoH* ainsi que d'une dizaine de gènes, dont *degP* (Narberhaus et coll., 1998a). Il a été montré *in vitro* qu'une sonde portant ce motif présentait un retard de migration en gel d'acrylamide lorsqu'elle était incubée avec un extrait brut de cellules non stressées. Cette expérience suggère que la séquence ROSE permettrait la fixation spécifique d'un répresseur encore non-identifié, en absence de stress (Narberhaus et coll., 1998a). Mais plus récemment, Nocker et coll. ont proposé un nouveau modèle dans lequel la séquence ROSE jouerait le rôle d'un thermomètre cellulaire. ROSE permettrait la formation d'une structure secondaire de l'ARNm masquant le site de fixation du ribosome (rbs) à basse température, comme dans le cas de l'ARN *rpoH* de *E. coli* (Nocker et coll., 2001a). Cette séquence a été retrouvée chez plusieurs Rhizobia, toujours en association avec des opérons thermo-inductibles, et semble donc un mécanisme commun à ce sous-groupe (Nocker et coll., 2001b).

### ***Helicobacter pylori***

A la différence des bactéries précédentes, tous les gènes spécifiant les principales protéines chaperons (DnaK, GroES-GroEL) de cette  $\alpha$ -protéobactérie, sont sous contrôle du facteur sigma végétatif  $\sigma^{80}$  (Spohn et Scarlato, 1999). Le génome semble d'ailleurs dépourvu d'homologue de *rpoH* (Tomb et coll., 1997). Ces gènes sont cependant inductibles par le stress, car placés sous le contrôle d'un répresseur transcriptionnel, HspR (Spohn et Scarlato, 1999), un régulateur décrit initialement chez les Streptomyces (voir partie II-B-3). L'opéron *hrcA-grpE-dnaK* spécifiant le chaperon DnaK présente en plus un motif de reconnaissance pour le répresseur HrcA (Homuth et coll., 2000), un autre répresseur décrit initialement chez *B. subtilis* (voir partie II-B-1). Il a été suggéré que cet opéron soit coréglé par HrcA et HspR (Spohn et coll., 2002), ce qui expliquerait la différence de sensibilité au stress entre l'opéron *hrcA-grpE-dnaK* et les opérons sous le contrôle unique de HspR comme *groES-groEL* et *cbpA-hspR*.

**Table 2 Diversité des régulateurs de choc thermique chez les bactéries Gram-négatives**

Groupes	Espèces	Régulateurs	Gènes cibles
-protéobactéries	<i>C. crescentus</i>	RpoH HrcA	→ —  <i>dnaK, groESL</i> <i>groESL</i>
	<i>A. tumefaciens</i>	RpoH HrcA autre	→ —  ? <i>dnaK, groESL</i> <i>groESL</i> >30 gènes de choc thermique HrcA et RpoH-indépendants
	<i>B. japonicum</i>	RpoH1 RpoH2 RpoH3 HrcA Rose	→ → ? —  —  <i>hrcA-grpE</i> <i>dnaK-dnaJ</i> <i>groESL4, groESL5</i> <i>hspA-rpoH1, hspBC-degP, hspD, hspEF-orfG</i>
-protéobactéries	<i>E. coli</i>	RpoH	→ <i>dnaK, groESL...</i>
	<i>X. campestris</i>	RpoH HrcA	? —  <i>groESL</i>
-protéobactéries	<i>H. pylori</i>	HspR HrcA	—  —  <i>cbpA-hspR, groESL, hrcA-grpE-dnaK</i> <i>hrcA, grpE, dnaK</i>

### 3-Conclusion

Les systèmes de contrôle de l'expression des gènes de réponse au choc thermique sont variés chez les bactéries à Gram-négatif. Le système modèle décrit chez *E. coli* fait intervenir deux facteurs sigma alternatifs pour la transcription de la majorité des gènes de réponse au stress thermique, et la régulation s'effectue aux niveaux traductionnel et post-traductionnel. Cependant, le gène *rpoH* qui code le principal facteur alternatif de stress semble être restreint aux seules protéobactéries, et à l'exclusion des  $\alpha$ -protéobactéries comme *H. pylori* ou *Campylobacter jejuni*.

A l'inverse, le système HrcA/CIRCE est largement répandu dans tout le monde bactérien. La recherche systématique des gènes homologues à *hrcA* dans les données issues du séquençage des génomes révèle que ce système semble présent chez toutes les bactéries Gram-positives et la plupart des bactéries Gram-négatives sauf chez les Aquificales, les Rickettsiales ( $\alpha$ -protéobactéries), les Neisseria ( $\beta$ -protéobactéries), et les  $\gamma$  et  $\delta$  protéobactéries (dont *E. coli*) (Segal et Ron, 1996b) (Table 2).

D'autres systèmes annexes agissant en *cis* comme le motif ROSE ou en *trans* comme le régulateur HspR, participent à la réponse au choc thermique chez certaines bactéries à Gram-négatif, et il est probable que d'autres systèmes de régulation transcriptionnelle restent à mettre en évidence comme on le suspecte chez *A. tumefaciens*. Enfin, si de nombreux travaux se sont accumulés ces dernières années mettant en évidence ces mécanismes variés de contrôle de la transcription, peu d'études portent sur l'existence des mécanismes post-transcriptionnels de régulation qui pourraient également se révéler d'une grande diversité.

## ***B.-B. subtilis* et les autres bactéries Gram-positives**

### **1-*Bacillus subtilis***

Chez *B. subtilis*, les gènes de réponse au choc thermique sont généralement répartis en quatre classes en fonction du système de régulation dont ils dépendent (Schumann et coll., 2002).

#### **1.1-HrcA, régulateur des gènes de choc thermique de classe I**

Deux opérons composent le régulon HrcA : l'opéron *groE* spécifiant les protéines chaperons GroES et GroEL (Li et Wong, 1992; Schmidt et coll., 1992), et l'opéron *dnaK* composé des sept gènes *hrcA* (*orf39*), *grpE*, *dnaK*, *dnaJ*, *orf35*, *orf28*, *orf50* (Homuth et coll.,

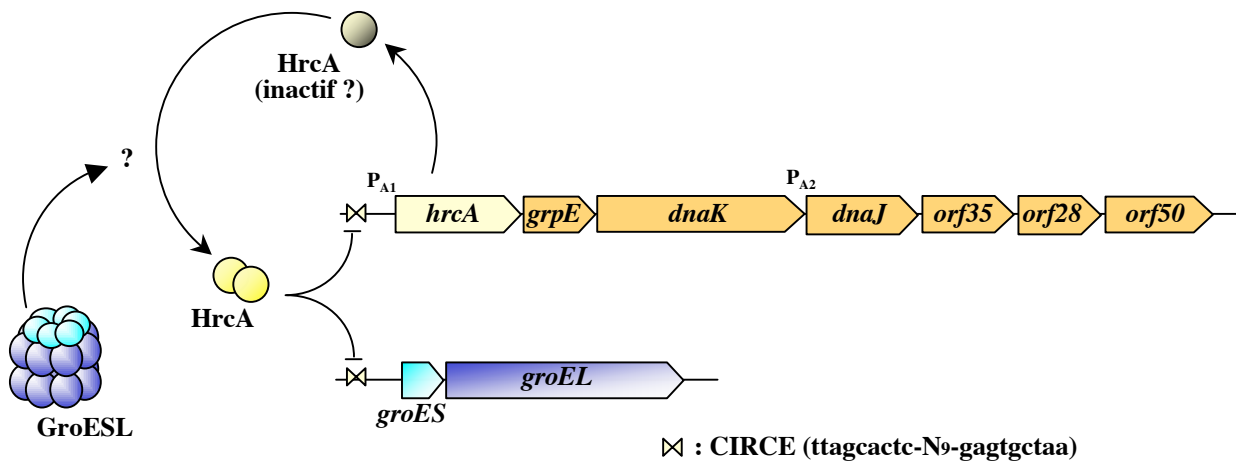


Figure 5. Le régulon HrcA chez *B. subtilis*



1997). La fonction de ces trois derniers gènes n'est pas connue et ils ne sont requis ni pour la croissance à haute température, ni pour la régulation de la réponse au choc thermique. L'opéron *dnaK* est exprimé à partir de deux promoteurs : P<sub>A1</sub> en amont du premier gène, inductible par la température, et P<sub>A2</sub> en amont de *dnaJ*, permettant l'expression constitutive des quatre gènes distaux (Fig. 5).

Bien que la synthèse des chaperons moléculaires DnaK et GroESL soit induite comme chez *E. coli* par le stress thermique, le séquençage et la caractérisation de l'expression des opérons spécifiant ces protéines ont révélé la présence de séquences promotrices canoniques de type végétatif dépendantes du facteur <sup>A</sup> (Schmidt et coll., 1992 ; Wetzstein et coll., 1992). Le facteur alternatif <sup>B</sup> a été caractérisé peu après comme le premier régulateur de choc thermique de *B. subtilis*, mais l'absence de séquences opératrices et la persistance de l'induction par le stress des opérons *dnaK* et *groESL* dans un mutant *sigB* suggérait l'existence de régulations additionnelles (Benson et Haldenwang, 1993a).

Cependant, l'analyse de leur promoteur révéla la présence d'une séquence répétée inversée parfaite de 9pb (ou IR pour Inverted Repeat). Ce motif parfaitement conservé, découvert à l'origine chez *Streptomyces albus* (Guglielmi et coll., 1993), était également observé en amont des opérons homologues de *Clostridium acetobutylicum* (Narberhaus et Bahl, 1992; Narberhaus et coll., 1992) ainsi que chez plusieurs espèces à Gram-positif et négatif, en association avec des gènes de choc thermique (Wetzstein et coll., 1992), ce qui suggérait un rôle de celui-ci dans leur régulation.

### **Le motif CIRCE**

Plusieurs arguments ont permis de montrer le rôle de cet IR comme élément régulateur agissant en *cis* : la délétion de cet élément déprime l'expression d'un gène rapporteur (van Asseldonk et coll., 1993), la présence de l'IR dans des fusions transcriptionnelles avec *lacZ* ou *ftsAZ* entraîne la chute de l'expression de ces gènes (Zuber et Schumann, 1994), et enfin la délétion partielle ou l'introduction de mutations ponctuelles dans l'un des deux bras de l'IR permet l'expression du gène aval, à basse température (Babst et coll., 1996; Zuber et Schumann, 1994).

Cet élément a été nommé CIRCE pour Controlling IR of Chaperone Expression car chez *B. subtilis* seuls les opérons *dnaK* et *groESL* sont sous son contrôle et jusqu'à récemment il était systématiquement retrouvé en association avec *dnaK* ou *groE*. La séquence consensus TTAGCACTC-N9-GAGTGCTAA est extrêmement bien conservée, et est retrouvée dans un

nombre croissant de micro-organismes : le dernier recensement publié en 1999 révélait la présence de cet élément dans 70 opérons chez 40 espèces bactériennes (Narberhaus, 1999).

Le motif CIRCE est présent dans la région 5' non traduite de l'ARNm mais peut être trouvé au niveau du site de démarrage de la transcription ou même en amont de ce site. Certains opérons contiennent deux motifs en tandem correspondant généralement à deux sites de démarrage de la transcription (Segal et Ron, 1996b). Cette variabilité du nombre de copies et de la position du motif, et surtout la capacité de réprimer un opéron tout en étant dans la région non transcrite du gène, est un argument en faveur du rôle de CIRCE dans le contrôle de la transcription plutôt que de la traduction. De plus, il a été observé que lorsque l'IR présente dans le promoteur de *groESL* de *B. subtilis* est graduellement éloignée de sa position d'origine de 5, 9, 17 puis 21pb, la répression de l'opéron est progressivement abolie (Yuan et Wong, 1995b). Ceci est en accord avec le modèle de l'opérateur CIRCE : le motif serait un site de fixation pour une protéine régulatrice agissant en *trans*, dont la présence au niveau du promoteur inhibe le recrutement de l'ARN polymérase par encombrement stérique. Il est à noter que CIRCE permettrait aussi un contrôle post-transcriptionnel de l'expression de *hrcA*. En effet d'une part, l'ARNm est déstabilisé lorsque le motif CIRCE est présent sur le transcrit (Yuan et Wong, 1995b), d'autre part, une maturation des transcrits entraînerait la séparation du transcrit instable portant CIRCE et le gène *hrcA* des transcrits stables portant les autres gènes. Ceci modifierait le rapport d'expression du régulateur par rapport à celle du chaperon (Homuth et coll., 1999). Cependant, cette instabilité étant observée à haute comme à basse température, elle ne participe pas à l'induction du système par la chaleur.

### **Le répresseur HrcA**

Le modèle du répresseur est renforcé par l'observation de Duchêne et coll., qui montre que des extraits bruts de *Streptomyces coelicolor* entraînent un retard de migration sur gel d'un fragment d'ADN portant CIRCE dans des expériences *in vitro*, à condition que les cellules n'aient pas subi de stress thermique (Duchene et coll., 1994). Un premier indice quant au régulateur impliqué est venu fortuitement de l'analyse de mutants de l'opéron *dnaK* de *B. subtilis*, en cherchant un éventuel rôle de DnaK dans la réponse au choc thermique par analogie avec *E. coli*. En effet, un mutant polaire réalisé dans le premier gène de l'opéron présente une dérégulation à basse température de *groESL*. Par contre si la mutation polaire est introduite dans *dnaK*, la régulation n'est pas affectée, suggérant l'implication de *hrcA* ou *grpE* (Schulz et coll., 1995). La démonstration du rôle de HrcA vient de résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*. Les souches, qui après mutagenèse aléatoire expriment constitutivement une fusion

transcriptionnelle *groE-bgaB* (BgaB est une  $\alpha$ -galactosidase thermostable), présentent systématiquement une mutation dans le gène *hrcA*, laquelle peut être complétée par l'introduction d'une copie sauvage du gène. Par ailleurs, l'expression de *hrcA* chez *E. coli*, qui ne possède pas ce système, réprime l'expression de la fusion *groE-bgaB*, et cette répression est levée par le choc thermique. Enfin, des extraits bruts d'une souche de *E. coli* surexprimant HrcA permettent d'observer un retard de migration sur gel, d'une sonde présentant le motif CIRCE (Yuan et Wong, 1995a). L'ensemble de ces résultats suggère que HrcA est nécessaire et suffisant pour réprimer en *trans* l'expression des deux opérons *dnaK* et *groESL* à basse température (Fig. 5).

### **GroESL, senseur du stress de *B. subtilis***

GroESL agirait comme un modulateur de l'expression du régulon HrcA/CIRCE, et serait responsable de l'activation du répresseur à basse température. En effet, en absence de GroESL, l'expression de fusions *hrcA-bgaB* et *groE-bgaB* est augmentée à basse température, de même que la quantité des protéines DnaK et HrcA, suggérant l'accumulation du répresseur sous forme inactive. De plus, la surexpression de GroESL entraîne la quasi-disparition de l'induction de *hrcA-bgaB* et *groE-bgaB* après le choc thermique, indiquant une répression permanente du régulon (Mogk et coll., 1997). Un résultat similaire avait déjà été observé chez *B. japonicum*, chez qui la délétion de l'opéron *groESL<sub>4</sub>* (sous contrôle de CIRCE) entraînait la surexpression de son propre promoteur (Babst et coll., 1996). Enfin, les auteurs montrent *in vitro* dans des expériences de retard de migration sur gel, que l'agrégation de HrcA est ralentie en présence de GroEL et que cette dernière améliore la fixation de HrcA à son propre promoteur. Le modèle de contrôle de l'expression du régulon HrcA est basé sur le titrage du chaperon GroESL, de façon analogue au modèle de titrage des chaperons DnaKJ pour le contrôle du facteur <sup>32</sup> de *E. coli*. Le niveau basal de GroESL permet le maintien de HrcA sous une conformation active qui réprime alors l'expression des opérons *dnaK* et *groESL*. Il y a donc un équilibre dynamique dû à la rétro-inhibition de la synthèse du chaperon. En condition de choc thermique, les chaperons chargés des protéines dénaturées ne peuvent activer HrcA qui s'accumule sous forme inactive. Cependant, aussi séduisant que soit ce modèle, les expériences présentées ne peuvent exclure l'existence d'un mécanisme indépendant de GroESL induit par l'accumulation de protéines dénaturées. En effet, on peut argumenter que d'une part, la suppression d'un chaperon majeur pourrait entraîner artificiellement une telle accumulation, simulant un choc thermique et induisant ainsi le

système, et à l'inverse que la surexpression du chaperon en diminuant la quantité de protéines dénaturées lors du stress limiterait son induction. De même, les expériences *in vitro* faisant valoir en présence de GroEL une diminution de l'agrégation de HrcA ou une augmentation (très relative) de la fixation de HrcA sur une sonde présentant CIRCE, ne révèlent que l'activité de chaperon de la protéine et l'extrême instabilité du régulateur *in vitro*. D'ailleurs, des études plus récentes sur l'interaction *in vitro* de HrcA avec CIRCE chez *B. japonicum* (Minder et coll., 2000) et *Streptococcus thermophilus* (Martirani et coll., 2001) montrent que GroEL n'est pas indispensable à cette fixation, suggérant que le chaperon ne permet que l'augmentation de la solubilité *in vitro* du régulateur. Enfin, l'équilibre de fixation dynamique entre les complexes GroESL/HrcA et GroESL/protéines-dénaturées reste à démontrer. Par conséquent, le modèle de titrage de GroESL, bien que séduisant par sa simplicité (et le seul proposé actuellement), demande encore à être validé.

### 1.2- $\sigma^B$ , régulateur des gènes de choc thermique de classe II

La majorité des HSPs de *B. subtilis* ne sont pas uniquement induites par la température, mais par de multiples stress environnementaux incluant les carences énergétiques. Pour cette raison, elles sont aussi appelées GSPs (pour General Stress Proteins). Ces protéines, qui peuvent représenter de 25 à 40 % de la capacité de traduction de la cellule lors du stress, sont sous le contrôle positif d'un facteur sigma alternatif,  $\sigma^B$  (37).  $\sigma^B$  a été identifié dès 1979 et fut le premier facteur sigma alternatif bactérien caractérisé (Haldenwang et Losick, 1979). De façon paradoxale, ce régulateur, dont on sait aujourd'hui qu'il induit plus de 200 gènes en réponse au stress, a longtemps été considéré comme cryptique. Il n'était pas requis pour la sporulation (Binnie et coll., 1986; Duncan et coll., 1987; Igo et coll., 1987) (phénotype qui avait motivé les premières études sur ce facteur sigma), et les quelques gènes sous son contrôle alors caractérisés étaient de fonctions inconnues. De plus, bien que sa synthèse soit induite par la chaleur, les principales protéines chaperons (DnaK et GroE) étaient exprimées indépendamment de  $\sigma^B$ , et le mutant *sigB* ne semblait pas présenter de sensibilité au stress thermique (Benson et Haldenwang, 1993a).  $\sigma^B$  joue pourtant un rôle important dans l'adaptation au choc thermique et à d'autres stress comme l'éthanol, le sel, l'acidité (Volker et coll., 1999) et dans une moindre mesure le stress oxydant (Antelmann et coll., 1996; Engelmann et Hecker, 1996). Par ailleurs,  $\sigma^B$  est induit lors de l'entrée en phase stationnaire ou en réponse à diverses carences en oxygène, en phosphate et en carbone, et de nombreux gènes du régulon sont impliqués dans le métabolisme cellulaire (Helmann et coll.,

2001; Petersohn et coll., 1999a; Petersohn et coll., 1999b; Petersohn et coll., 2001; Price et coll., 2001).  $\sigma^B$  contrôle donc un mécanisme général de protection et d'adaptation, répondant à la fois aux stress et à toute condition limitant la croissance, qui est appelé la réponse générale aux stress.

### **Le régulon $\sigma^B$**

$\sigma^B$  est un facteur sigma alternatif induisant spécifiquement la transcription de gènes cibles en interagissant avec l'ARN polymérase pour former l'holoenzyme E  $\sigma^B$ , lui conférant ainsi une spécificité de fixation vis-à-vis d'un promoteur. La séquence consensus établie pour les promoteurs  $\sigma^B$ -dépendants est : GTTTAA-N12-14-GGGTAT [pour revue voir (Hecker et coll., 1996)]. Environ 200 protéines induites par  $\sigma^B$  ont été mises en évidence, pour la plupart récemment, grâce à des approches globales comme la recherche systématique de promoteurs types (Petersohn et coll., 1999b), l'analyse protéomique par gels d'électrophorèse à 2 dimensions (Petersohn et coll., 1999a; Volker et coll., 1994) et enfin l'analyse du transcriptome (Helmann et coll., 2001; Petersohn et coll., 2001; Price et coll., 2001). On peut partager les gènes du régulon en trois catégories en fonction du mécanisme d'expression : i) ceux dont le promoteur  $\sigma^B$ -dépendant a été expérimentalement confirmé, ii) ceux présentant un promoteur  $\sigma^B$  potentiel mais non démontré et iii) ceux qui n'ont pas de promoteur  $\sigma^B$  et dont l'induction est probablement indirecte. Du point de vue fonctionnel, les gènes du régulon  $\sigma^B$  jouent un rôle dans une vaste gamme de fonctions cellulaires. Plusieurs gènes membres du régulon spécifient des protéines ayant une fonction démontrée ou supposée de protection comme les protéines ClpC et ClpP (voir Chapitre III-B), la protéine Dps qui se lie et protège l'ADN ou les catalases KatB et KatX. En font également partie la plupart des gènes permettant la régulation de  $\sigma^B$  et *sigB* lui-même, ainsi que plusieurs régulateurs induisant potentiellement l'expression d'autres gènes du régulon comme *dinR* ou *ctsR*. Enfin, de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme incluant des systèmes d'efflux et influx de solutés, la synthèse de l'enveloppe, le métabolisme du carbone et le renouvellement des macromolécules ((Price et coll., 2001) ; pour revue voir (Price, 2002)). Finalement, la part des gènes servant directement à pallier les effets du stress est relativement faible, et la réponse générale au stress serait plutôt un réarrangement global du métabolisme conférant probablement une résistance plutôt passive au stress.

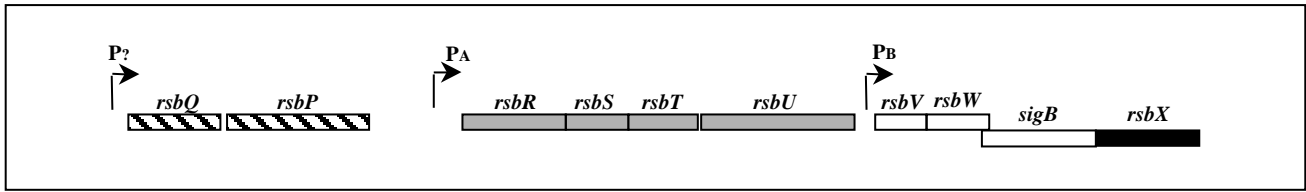


Figure 6A. Structure de l'opéron  $\sigma^B$  de *B. subtilis*

D'après Price, 2002

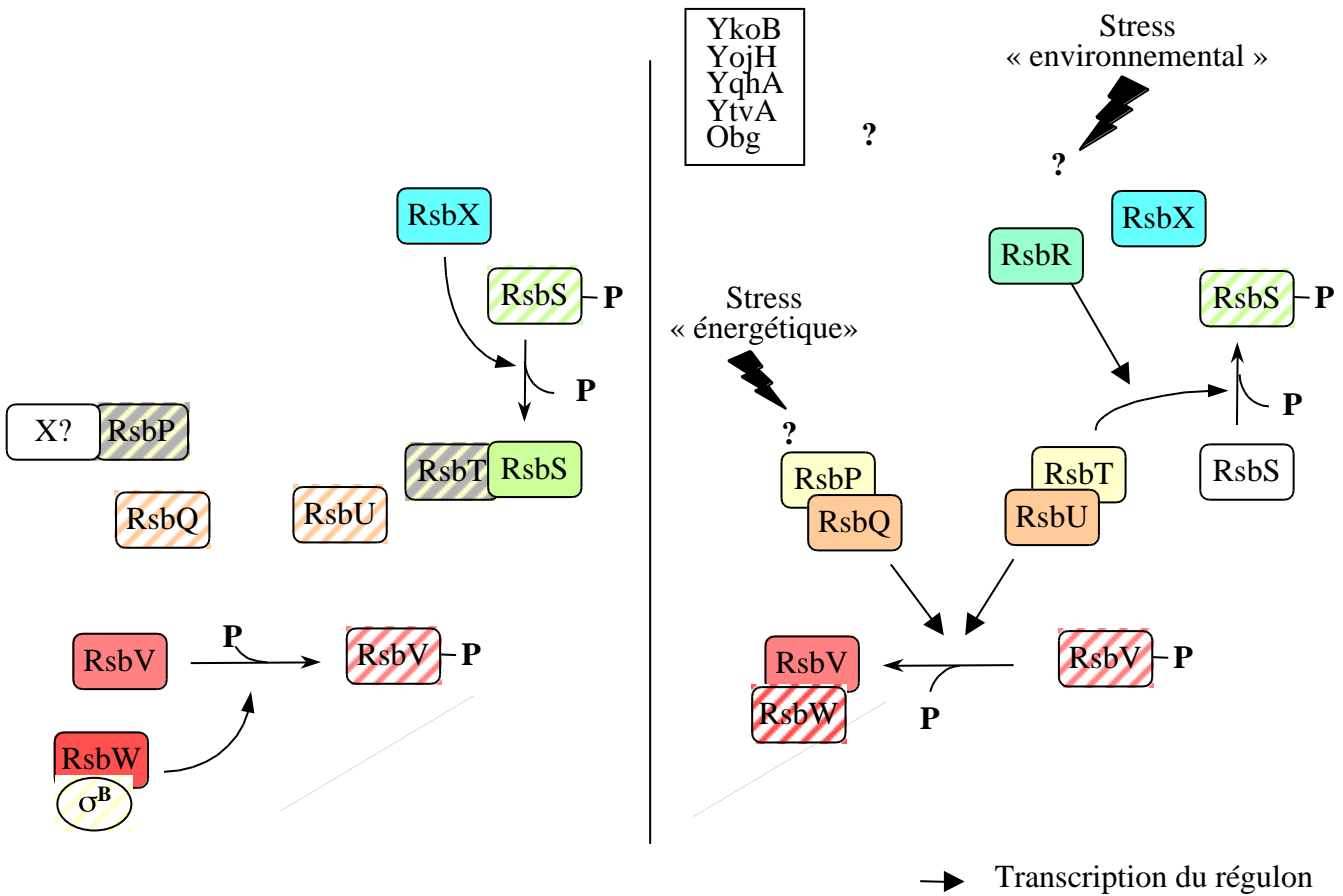


Figure 6B. Cascade d'induction du facteur  $\sigma^B$  chez *B. subtilis*

### L'opéron *rsbR-sigB*

$\sigma^B$  est codé par le gène *sigB*, septième gène d'un opéron de huit gènes (Fig. 6A). Cet opéron est transcrit à partir de deux promoteurs : le premier en amont de *rsbR* permet une expression basale constitutive de l'opéron complet, grâce à l'holoenzyme  $E^{-\lambda}$ , mais est induit lors de l'entrée en phase stationnaire de façon  $\sigma^B$ -indépendante et en présence de glucose et de glutamine (Wise et Price, 1995). Le second est un promoteur interne reconnu par  $\sigma^B$  et permettant l'expression accrue des quatre derniers gènes de l'opéron en conditions de stress (Benson et Haldenwang, 1992; Boylan et coll., 1992; Kalman et coll., 1990). Les huit gènes de cet opéron sont nécessaires pour l'induction du système en réponse aux stress environnementaux.

### La régulation de la réponse générale au stress

Le système  $\sigma^B$  perçoit différemment les stress énergétiques des stress appelés abusivement environnementaux. Les premiers correspondent aux carences en oxygène, en phosphate ou en carbone et se traduisent par une diminution du pool d'ATP disponible et les seconds aux stress thermique, éthanolique, salin ou acide. Leurs signaux sont transmis par deux voies de signalisation distinctes : la branche des stress énergétiques s'effectue *via* les régulateurs RsbQ et RsbP, et la branche des stress environnementaux par les produits des quatre premiers gènes de l'opéron *sigB*, c'est-à-dire RsbR, RsbS, RsbT et RsbU. L'ensemble des signaux est intégré au niveau des régulateurs RsbW et RsbV (Fig. 6B). Cependant, la façon dont ces stress sont perçus par ces voies respectives est encore inconnue.

RsbW est un facteur anti-sigma qui séquestre  $\sigma^B$  en absence de stress, empêchant son association avec l'ARN polymérase (Benson et Haldenwang, 1993b). Il possède également une activité sérine kinase lui permettant de phosphoryler et ainsi d'inactiver son propre inhibiteur RsbV (Dufour et Haldenwang, 1994). Lors d'un stress, RsbV-P est déphosphorylé, soit par la phosphatase RsbU (environnement), soit par la phosphatase RsbP (énergie) permettant à RsbV de se lier à RsbW, et libérant ainsi  $\sigma^B$  (Voelker et coll., 1995a; Voelker et coll., 1996; Voelker et coll., 1995b; Wise et Price, 1995) (Fig. 6B).

RsbP est une sérine phosphatase spécifique de RsbV-P, requise pour l'activation de  $\sigma^B$  en réponse au stress énergétique. Elle présente un domaine PAS similaire à ceux trouvés dans une large gamme de protéines, permettant à celles-ci de fixer un ligand et, par cet intermédiaire, de sentir divers changements comme le taux d'oxygène, le pouvoir réducteur, ou encore la lumière (Taylor et Zhulin, 1999; Vijay et coll., 2000). En plus de RsbP, au moins

un autre régulateur positif, RsbQ, est requis pour l'induction du signal, bien que sa fonction reste encore à établir (Brody et coll., 2001). Enfin, du fait de la faible affinité pour l'ATP de RsbW, il a été suggéré que son activité kinase vis-à-vis de RsbV pourrait diminuer avec la baisse de la quantité d'ATP disponible lors du stress énergétique, contribuant à l'induction du système (Alper et coll., 1996) (Fig. 6B).

RsbU est une sérine phosphatase spécifique de RsbV-P nécessaire pour la transduction du signal lié à un stress « environnemental » (Voelker et coll., 1996; Voelker et coll., 1995b; Yang et coll., 1996). Elle est régulée *via* une cascade d'activateurs et d'inhibiteurs analogues au système RsbVW: ici RsbT (l'analogue de RsbW) est un activateur de RsbU, inhibé en absence de stress par son antagoniste RsbS (l'analogue de RsbV), qui lui est actif sous forme déphosphorylée. Lors du stress, RsbT phosphoryle RsbS et se lie et active RsbU (Kang et coll., 1996; Kang et coll., 1998; Voelker et coll., 1995a; Yang et coll., 1996). Le régulateur RsbR induit la cascade d'activation de <sup>B</sup> en stimulant l'activité kinase de RsbT vis-à-vis de RsbS. RsbR peut lui-même être phosphorylé par RsbT et devient alors inactif, ce qui pourrait constituer un mécanisme de rétro-contrôle (Akbar et coll., 1997; Gaidenko et coll., 1999). RsbR étant pour le moment l'ultime régulateur identifié au sommet de la cascade d'activation, on peut supposer que l'état de phosphorylation de ce régulateur pourrait être l'élément de bascule permettant l'induction de la cascade d'activation lors du stress environnemental (Fig. 6B).

Enfin, plusieurs autres facteurs viennent contribuer à cette voie de régulation. La phosphatase RsbX, spécifiée par le gène situé en aval de *sigB*, a un effet rétro-inhibiteur sur cette voie en modifiant l'équilibre entre RsbS et RsbS-P, et serait requise pour l'extinction du système (Benson et Haldenwang, 1992; Boylan et coll., 1992; Smirnova et coll., 1998; Yang et coll., 1996). D'autre part, la GTPase Obg, ainsi que plusieurs homologues de RsbR identifiés dans le génome (YkoB, YojH, YqhA, YtvA), sont impliqués dans cette voie, mais leurs cibles et leurs fonctions (hormis Obg) sont encore inconnues (Akbar et coll., 2001; Scott et Haldenwang, 1999).

### 1.3-CtsR, régulateur des gènes de choc thermique de classe III

#### Le contrôle de l'expression de *clpC*

Parmi les gènes induits lors de la réponse générale au stress, l'expression de l'opéron *clpC* est apparue comme une curiosité. Identifié à la fois en tant que gène de stress (*gsp12*)



(Kruger et coll., 1994; Volker et coll., 1994) et de compétence (*mecB*) (Msadek et coll., 1994), son expression est induite par la température, l'éthanol et dans une moindre mesure le sel, mais de manière indépendante de  $\sigma^B$  (Kruger et coll., 1994). Ce gène code une sous-unité ATPasique de la protéase ATP-dépendante ClpP (voir Chapitre III-A). Pourtant, l'analyse du promoteur révèle la présence de séquences consensus -35 et -10 spécifiques du facteur  $\sigma^B$  et l'absence de séquence *cis*-régulatrice CIRCE (Kruger et coll., 1996). De plus, la caractérisation de l'expression de *clpC* révèle que l'opéron est bien transcrit à partir d'un promoteur  $\sigma^B$ -dépendant (pB) inductible par différents stress, mais aussi à partir d'un autre promoteur (pA) dépendant du facteur végétatif  $\sigma^A$ . Celui-ci semble prendre le relais du promoteur  $\sigma^B$ -dépendant dans un mutant *sigB* en devenant dans ce contexte inductible par la température et l'éthanol (Kruger et coll., 1996).

Un motif hélice-tour-hélice a été identifié dans le produit du premier gène de l'opéron *clpC*, suggérant un rôle régulateur pour cette protéine (Kruger et coll., 1997; Kunst et coll., 1997). Le mécanisme de régulation a ensuite été rapidement mis en évidence en montrant que l'inactivation de ce gène (*yacG*) entraînait une forte expression de l'opéron *clpC* et du gène *clpP* en absence de stress (Derré et coll., 1999b; Kruger et Hecker, 1998). Le répresseur a été nommé CtsR pour Class three stress gene Repressor.

Ainsi en absence de stress,  $\sigma^B$  est inactif et CtsR réprime l'expression de l'opéron au niveau du promoteur pA. Lors du stress thermique, l'opéron est transcrit à partir des deux promoteurs mais principalement à partir de pB, et dans le mutant *sigB*, pA devient l'unique site de démarrage de la transcription. Curieusement, ces deux systèmes semblent redondants puisque le promoteur pA est suffisant pour induire le système en réponse au stress, et que la répression par CtsR est dominante sur  $\sigma^B$  : en effet, lors de l'entrée en phase stationnaire,  $\sigma^B$  et CtsR sont tous deux actifs et donc antagonistes ; pourtant dans ces conditions, l'expression de *clpC* reste marginale (Derré et coll., 1999b; Kruger et Hecker, 1998; Kruger et coll., 1994). Cependant, on peut émettre l'hypothèse que dans des conditions de stress extrêmes,  $\sigma^B$  pourrait être nécessaire à l'expression de cet opéron du fait de l'instabilité de  $\sigma^A$ .

### **Le régulon CtsR**

Le régulon CtsR est composé du gène *clpP* qui spécifie la sous-unité protéolytique de la protéase ATP-dépendante Clp, du gène *clpE* dont la fonction est inconnue et des gènes *ctsR*, *yacH*, *yacI*, et *clpC*, formant l'opéron *clpC* (Derré et coll., 1999a; Derré et coll., 1999b) (Fig. 7). Les gènes *yacH* et *yacI*, également nommés *mcsA* et *mcsB*, spécifient des protéines

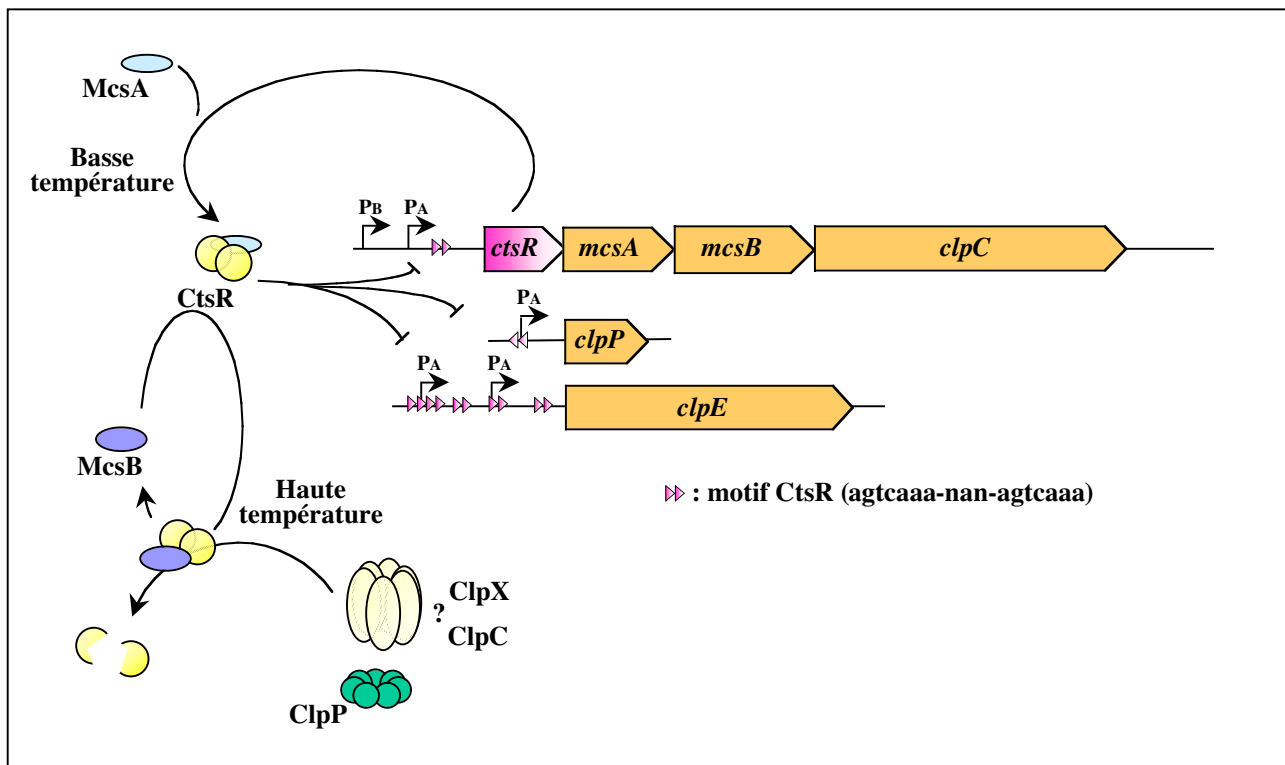


Figure 7. Le régulon CtsR de *B. subtilis*

qui présentent respectivement, un motif en doigt de Zn suggérant une interaction protéine-protéine, et un domaine arginine kinase. Elles pourraient être impliquées dans la régulation de l'activité de CtsR (voir ci-après) (Kruger et coll., 1997; Kruger et coll., 2001).

Les promoteurs CtsR-dépendants présentent à proximité immédiate (voir même chevauchante) des séquences -35 et -10 de fixation de l'holoenzyme E<sup>A</sup>, une ou plusieurs séquences opératrices. Celles-ci permettent le recrutement de CtsR en absence de stress lequel, par encombrement stérique, empêche vraisemblablement la fixation de l'ARN polymérase sur le promoteur. Leur alignement a permis l'établissement d'une séquence opératrice consensus correspondant à un heptanucléotide répété directement : A/GGTCAAA NAN A/GGTCAAA (Derré et coll., 1999b). La recherche systématique dans le génome de cette séquence a révélé que seuls ces 3 promoteurs étaient pourvus de l'opérateur, indiquant que le régulon CtsR est probablement limité à ces 6 gènes chez *B. subtilis*.

### **Mécanisme de régulation par CtsR**

CtsR réprime l'expression de ses gènes cibles par fixation directe au niveau de leur séquence promotrice grâce au motif précédemment défini. Cette activité nécessite d'une part, la dimérisation du régulateur, qui implique la région amino-terminale de la protéine et d'autre part, la reconnaissance du motif et l'interaction protéine-ADN qui requiert le motif hélice-tour-hélice (acides aminés 25 à 42). La région carboxy-terminale est probablement dédiée au maintien de la structure tridimensionnelle de la protéine, les délétions effectuées dans ce domaine s'étant révélées hautement déstabilisantes (Derré et coll., 2000).

Le système de rétro-contrôle négatif maintient l'expression de *ctsR* et des gènes sous son contrôle à un faible niveau basal à 37°C. A haute température, la répression est levée par un mécanisme encore mal compris mais impliquant probablement la déstabilisation du régulateur. Il existe plusieurs arguments en faveur de cette hypothèse. D'une part, l'induction du régulon peut-être induite en présence d'un thermo-mimétique comme la puromycine, suggérant que la détection du stress n'est pas due à l'instabilité conformationnelle de CtsR à haute température, et que le régulateur ne « sent » pas directement ce stress (Derré et coll., 1999a). D'autre part, le régulateur ne s'accumule pas à haute température, malgré l'augmentation du taux de transcription de son opéron, ce qui suggère une dégradation accrue de cet élément (Kruger et coll., 2001). Enfin, la délétion du gène *clpP*, qui code la sous-unité protéolytique de la protéase ATP-dépendante Clp (voir Chapitre III), entraîne une accumulation de la protéine à 37°C et une stabilisation à 48°C. L'ATPase Clp agissant en

partenariat avec ClpP pour la dégradation de CtsR est encore sujet à controverse et pourrait être ClpX ou ClpC (Derré et coll., 1999a; Kruger et coll., 2001).

L'activité de CtsR pourrait également dépendre des protéines codées par les deux gènes présents entre *ctsR* et *clpC*, qui ont été renommées McsA (YacH) et McsB (YacI) pour « modulator of CtsR repression ». McsA serait requis pour l'activation de CtsR car il augmente l'affinité de CtsR *in vitro* pour son promoteur et l'inactivation non-polaire de *mcsA* présente le même phénotype qu'un mutant de *ctsR*. A l'inverse, McsB inhibe *in vitro* la fixation de CtsR sur la séquence opératrice spécifique et la délétion de *mcsB* entraîne le maintien de la répression par CtsR à haute température. Au vu de ces résultats, Kruger et coll. proposent le modèle suivant : en conditions de stress, CtsR serait inhibé potentiellement dû à une activité kinase putative de McsB, et adressé à ClpP pour la dégradation, alors qu'à 37°C McsA protègerait CtsR (Kruger et coll., 2001). Cependant, ce modèle n'explique pas la manière dont est perçu le stress ni comment l'un des modulateurs McsA ou McsB prend l'avantage en fonction des conditions de stress. Enfin, le rôle des ATPases Clp et de la protéase ClpP dans cette régulation reste à définir (Fig. 7).

#### 1.4-La classe IV des gènes de choc thermique

La classe IV des gènes de réponse au choc thermique comprend tous les gènes dont l'expression est induite par ce stress et ne dépend pas des trois précédents systèmes décrits : CtsR, HrcA ou <sup>B</sup>. Elle est composée de 12 gènes dont 8 sont monocistroniques : *htrA* (Noone et coll., 2000), *htrB* (Noone et coll., 2001), *htpG* (Schulz et coll., 1997), *ftsH* (Deuerling et coll., 1995), *clpX* (Gerth et coll., 1996), *sigI* (Zuber et coll., 2001), *trxA* (Scharf et coll., 1998), et *sacB* (I. Derré et T. Msadek, données non publiées), et quatre appartiennent à deux opérons de deux gènes : *lonA-orfX* (Riethdorf et coll., 1994) et *ahpC-ahpF* (Antelmann et coll., 1996). Tous, hormis *sigI* (*ykoZ*), ont un ou plusieurs promoteurs de type <sup>A</sup>, plus ou moins canoniques, inductibles de 2 à 20 fois par le choc thermique. De plus, si l'expression de *ftsH* n'est inductible que par l'élévation de température, celles des autres gènes sont inductibles par un ou plusieurs types de stress et sont donc des gènes généraux de réponse au stress.

Le mode de régulation de la plupart de ces gènes est totalement inconnu, et seuls quelques éléments de réponses ont été récemment apportés pour quatre d'entre eux. Le gène *sigI* présente deux promoteurs, dont un est exprimé constitutivement et présente une faible similitude avec un promoteur de type <sup>A</sup> (ggcACg N19 cAgAAT) et l'autre (acGAaa N19

<i>Bsu clpP</i>	-20	G G T C A A T A A A G G T C A A A	-36
<i>Bsu clpC</i>	+3	A G T C A A A T A T A G T C A A A G T C A G T	+25
<i>Bsu clpE</i>	(-230)	A G T C A A A G A T A G T C A G A	(-214)
<i>Bsu clpE</i>	(-203)	A A T C A A A G T T G G T C A A A	(-187)
<i>Bsu clpE</i>	(-159)	G G T C A A A G A T A G T C A A A	(-143)
<i>Bsu clpE</i>	(-84)	A G T C A A A G A A G G T C A A A	(-68)
<i>Bsu clpE</i>	(-38)	G G T C A A A G A T G A T C A A A	(-22)
<i>Lmo clpP</i>	(-62)	G G T C A A A C T A G G T C A A A	(-78)
<i>Lmo clpC</i>	-3	A G T C A A A A A T A G T C A A A G T C A A T	+20
<i>Lmo clpE</i>	(-95)	A G T C A A A A T A G G T C A G T	(-79)
<i>Lmo clpE</i>	(-61)	G G T C A A A G A T A G T C A A A G T C A A G	(-39)
<i>Cac clpC</i>	(-45)	A G T C A A A G A A A G T C A A A	(-29)
<i>Cac hsp18</i>	-20	A G T C A A A G A A A G T C A A A	-36
<i>Loe hsp18</i>	-13	A G T C A A G A A A A G G T C A A A	-29
<i>Loe hsp18</i>	-31	A G T C A G T A T T G G T C A G A	-47
<i>Lsa clpE</i>	(-64)	G G T C A A A G A T A G T C A A A	(-48)
<i>Lla clpP</i>	-17	G G T C A A A A A A G G T C A A A	-33
<i>Lla clpC</i>	(-54)	A G T C A G T A A T A G T C A A A	(-38)
<i>Lla clpB</i>	(-77)	G G T C A G T A A T A G T C A A A	(-93)
<i>Lla clpE</i>	(-117)	G G T C A A A C A T G G T C A A A	(-101)
<i>Efa clpP</i>	(-83)	G G T C A A T A A A G G T C A A C	(-99)
<i>Efa clpC</i>	(-38)	G G T C A A T A T T A G T C A A G	(-22)
<i>Efa clpE</i>	(-153)	G G T C A A A A A T G G T C A A G	(-137)
<i>Sth hsp16</i>	(-42)	A G T C A A A A A A G G T C A G T	(-58)
<i>Ssa clpP</i>	(-46)	A G T C A A A T T A G G T C A A A	(-62)
<i>Spy clpP</i>	(-104)	G G T C A A T A A A G G T C A A A	(-120)
<i>Spy clpC1</i>	(-76)	A G T C A G T T T A G T C A A A	(-60)
<i>Spy clpC2</i>	(-151)	G G T C A G T A A A G G T C A A A	(-167)
<i>Spy clpE</i>	(-41)	A G T C A A A A A T G G T C A A A	(-57)
<i>Spn clpP</i>	(-68)	G G T C A A A A A A G G T C A A A	(-84)
<i>Spn clpC</i>	(-42)	A G T C A A A C A A G G T C A A G	(-26)
<i>Sau dnaK</i>	-20	G G T C A A A G T A A G T C A A T	-36
<b>Consensus</b>		<u>A</u> G T C A A A N A N A G T C A A A	
		G	G

	Helix	Turn	Helix	
<i>Bsu CtsR</i>	M G H N I R D I I E Q T L K R V L D Q H S R K K E L E I K K S K E I A D H F P C G V P P Q I N Y V I R T R F T S E R G C Y I V			59
<i>Lmo CtsR</i>	M F N I S D I I E A I L K Q V L E L S S - E A V E I K R S E I A D H F P C V P P Q I N Y V I R T R F T M E R G C Y I V			56
<i>Efa CtsR</i>	M R H G N T S D I I E A I L K K I L E E A Q - - K I E I K R A K M A N H F P N C V P P Q I N Y V I R T R F T I Q R G C Y A V			50
<i>Lla CtsR</i>	M Q S F N T S D I I E A T L K L L E E A Q - - V I E I K R A D L A N G F P D V Y P P S Q I N Y V I R T R F T P R N G P D V			58
<i>Spy CtsR</i>	M K F K N T S D I I E A I L K A I L D Q H S R - - I V L I G A R Q L A D H F Q V V P P Q I N Y V I R T R F T E S R G Y L V			58
<i>Spy CtsR</i>	M P T K N T S D I I E E I L K E I K R A G G - - I A E I K R A G L A D H F Q V V P P Q I N Y V I R T R F T E S R G Y L V			58
<i>Cao CtsR</i>	M R L S D I I E R F L A E L I A E N Y R H K I E I Q A R L L A N H F S I C A P P Q I N Y V I R T R F T Y D R G Y I			57
<i>Bsu CtsR</i>	E S K R G G G G Y I R I I K Y K N H N E V V L - I H R I I S Q I N Y H - L A Q A A S D D I I L R L L K D K V I S E R S A			117
<i>Lmo CtsR</i>	E S K R G G G G Y I R I I K V K N H D K L Q L - L K A I I S N V H D H K V S Q S F S E D V I L L L L R L L V I T R R R A			116
<i>Efa CtsR</i>	E S K R G G G G Y I R I I K V Q I S D N L K Q H D Q L I G A T - L T E K D A L T F I G L T L K E V I T K K K G			116
<i>Lla CtsR</i>	E S K R G G G G Y I R I I K I V K T Q Y S A K H E F - L Y A L T Q K V P A N - L S S K A A N D I V Q L L T D E K V L T E R E G			116
<i>Spy CtsR</i>	E S K R G G G G Y I R I I K Y E F S D H H E - L R E L L Y S I G E R - V S Q E I F R D I L Q L L V K Q F L M T R D C M			116
<i>Spy CtsR</i>	E S K R G G G G Y I R I I K Y E F S D H H E - I G N L H A T R E D C - I S E Q V F T D S F Q L L F D E R L L T E R E G			116
<i>Cao CtsR</i>	E S R R G G G G Y I R I I R K Y T R E N E K E P F I N S I V D R I K H S I T Y D A G C K Y I D G L F D H N L L T D R K V			117
<i>Bsu CtsR</i>	K M H Y E V M D R S V L H I D L F R R D E L R A R H M K A M L T P S L K L K			154
<i>Lmo CtsR</i>	K I M Y A A L D R K V L I L L P L D A S J L R A R I L R A M I V A I K Y H			152
<i>Efa CtsR</i>	K I M A A L E K E T L N G L G G E E R Y L R A Q E H R S F I E R L S Y E E			155
<i>Lla CtsR</i>	K L L L I V I T D G A - - I S P F T R G I M M K S I I M R I D R D R I C K			152
<i>Spy CtsR</i>	K L L E S V A L D M V - - L G S E A F V Y R A H H L R Q I T Q E V D R K G K			152
<i>Spy CtsR</i>	K I I L A V A S D D V - - L G T D G E T I R A R H L Y K L L Q K R I D R K G S H			153
<i>Cao CtsR</i>	A I I K A C I N D R A L L Y A G D K K N E L R A Q I T M K S V L I I L R V			153

**Figure 8. La séquence de fixation de CtsR est conservée chez les bactéries Gram-positives, de même que le domaine hélice tour hélice du régulateur requis pour cette interaction**

En haut : alignement des motifs mis en évidence dans les banques de séquences à partir du consensus établi pour *B. subtilis*.  
 En bas : alignement des séquences en acides-aminés des homologues de CtsR (d'après Derré et coll., 1999).

TggtT) induit à 50°C, ne présentant de similitude avec aucun promoteur connu. Ceci a conduit les auteurs à formuler les hypothèses que *sigI* pourrait s'autoréguler et que cette séquence pourrait être un promoteur <sup>1</sup>-dépendant. Cependant, aucune évidence génétique ou biochimique ne vient soutenir l'une de ces deux hypothèses (Zuber et coll., 2001). Dans le cas du gène *htpG*, une analyse par délétion systématique dans la séquence promotrice du gène a mis en évidence une séquence de 7 bp (GAAAAGG) en aval de la séquence -10 du promoteur végétatif <sup>A</sup>, nécessaire et suffisante pour permettre l'induction d'une fusion transcriptionnelle en réponse au seul stress thermique. Ceci suggère l'existence d'une régulation positive, bien que le régulateur n'ait pu être caractérisé (Versteeg et coll., 2003). Enfin, les gènes *htrA* (*ykdA*) et *htrB* (*yvtA*), soumis à la fois à une régulation croisée et à une autorégulation, seraient tous deux sous contrôle du système à deux composants CsrRS, lequel répond à la présence de protéines sécrétées dénaturées (Darmon et coll., 2002; Hyyrylainen et coll., 2001). L'absence de données biochimiques ne permet cependant pas d'affirmer l'existence d'une régulation directe par ce système.

Ces résultats, bien que préliminaires, ont pourtant conduit les deux groupes travaillant respectivement sur CsrRS-HtrA d'une part, et HtpG d'autre part, à revendiquer chacun la création d'une nouvelle classe IV de gènes de choc thermique, reléguant ainsi les autres gènes dans une nouvelle classe V (Darmon et coll., 2002; Versteeg et coll., 2003).

## 2-Autres bactéries à Gram-positif à bas GC%

*B. subtilis* est la bactérie dont la réponse au stress thermique est la mieux connue des bactéries à Gram-positif, avec *Streptomyces coelicolor*. Cette dernière fait d'ailleurs l'objet d'un chapitre séparé, du fait de l'existence de systèmes de régulations spécifiques chez les actinobactéries (voir ci-dessous).

L'analyse de la régulation des gènes de choc thermique, ainsi que la recherche systématique de régulateurs, ont permis la caractérisation d'homologues de CtsR, HrcA ou <sup>B</sup> de *B. subtilis* chez plusieurs bactéries à Gram-positif.

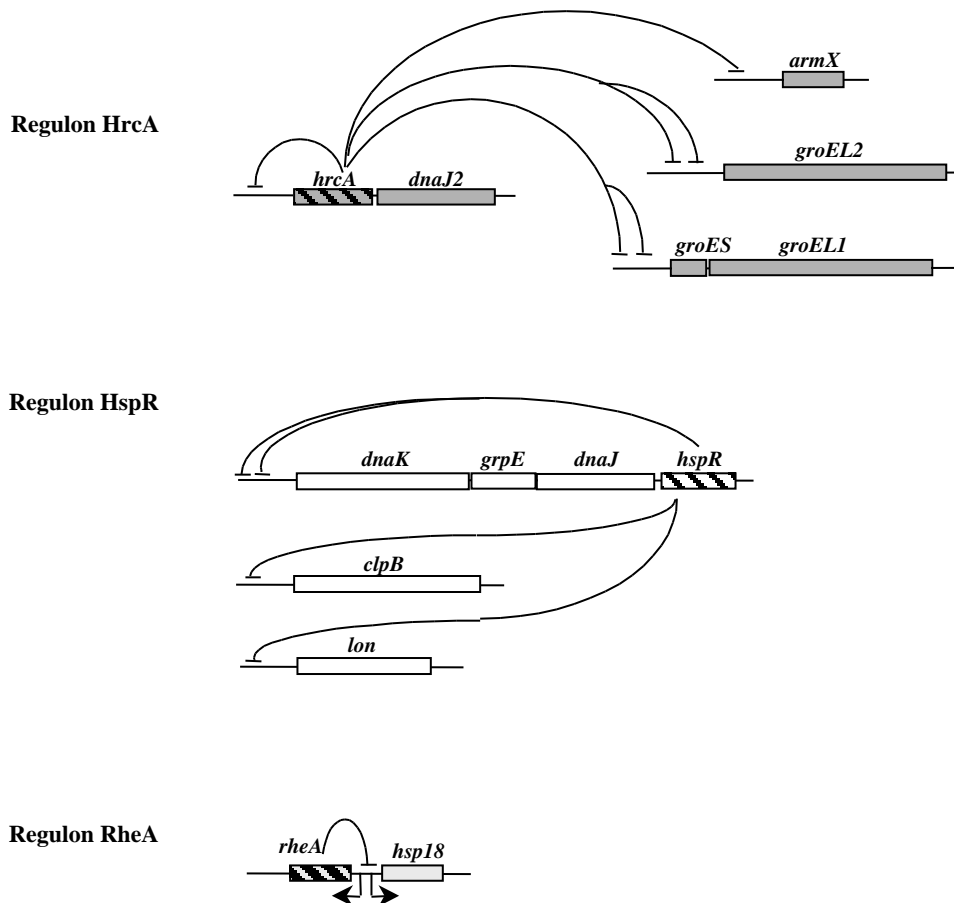
Ainsi, lors de la caractérisation du régulateur CtsR de *B. subtilis*, la recherche dans les génomes en cours de séquençage avait permis à I. Derré et coll. d'identifier 6 homologues de *ctsR* (Derré et coll., 1999b). La recherche de motifs dégénérés dans ces mêmes banques de données a également permis de découvrir 32 boîtes de fixation potentielles pour ce régulateur, en association avec des gènes supposés de réponse au choc thermique (Fig. 8), portant à 12 le nombre d'espèces susceptibles de présenter une régulation dépendante de CtsR. Par la suite, il

a été montré que les homologues de CtsR contrôlent l'expression de *clpC*, *clpP* et *clpE* chez *L. monocytogenes* et *clpC*, *clpP*, *clpE*, et *clpB* chez *L. lactis*, en réponse au stress thermique (Nair et coll., 2000a ; Varmanen et coll., 2000). CtsR semble donc être un élément de régulation du choc thermique conservé au sein des bactéries à Gram-positif à bas GC %. Cependant, si *ctsR* est toujours associé en opéron avec *clpC*, l'analyse de la structure de l'opéron montre une divergence entre les *Bacillus*, *clostridies* et *Listeria* d'un côté, et les streptocoques, entérocoques et lactocoques de l'autre. En effet, ces derniers présentent un opéron *clpC* bi-cistronique sans les modulateurs putatifs *mcsA* et *mcsB*, lesquels semblent totalement absents du génome. Même si le rôle de ces modulateurs reste à confirmer, cela suggère une certaine variabilité de ce mécanisme de régulation entre ces deux groupes.

De même, des gènes orthologues de *hrcA* ont été décrits chez *Bacillus sphaericus* (Ahmad et coll., 1999), *Geobacillus stearothermophilus* (ex-*Bacillus stearothermophilus*) (Mogk et Schumann, 1997), *Bacillus thermoglucosidasius* (Watanabe et coll., 2001), *Streptococcus mutans* (Jayaraman et coll., 1997), *S. pneumoniae* (Kim et coll., 2001a), *Streptococcus thermophilus* (Martirani et coll., 2001), *Lactococcus lactis* (Kilstrup et coll., 1997) et *Lactobacillus sakei* (Schmidt et coll., 1999). L'analyse systématique des séquences révèle la présence du motif CIRCE ou d'homologues de *hrcA* dans la plupart des génomes bactériens (voir Annexe 5 et II-A-2), ce qui fait de HrcA un régulateur de choc thermique bactérien quasi universel.

Enfin, plusieurs orthologues de *sigB* ont été caractérisés chez les bactéries Gram-positives à bas GC %. Cependant, si la structure de l'opéron octocistronique est bien conservée chez les espèces proches de *B. subtilis*, comme *B. licheniformis* et *L. monocytogenes*, les opérons *sigB* de *S. aureus* et *S. epidermidis* semblent plus courts avec seulement 4 gènes et peut-être même moins encore chez *B. anthracis* (Price, 2002). Bien que tous ces homologues de <sup>B</sup> soient effectivement inductibles par le stress, l'absence dans le génome de ces bactéries de plusieurs gènes clés requis pour la régulation de *sigB* chez *B. subtilis*, implique des mécanismes de contrôle différents. Enfin, tous les streptocoques, lactocoques et entérocoques, dont la disponibilité de la séquence a permis la vérification, sont totalement dépourvus de ce régulateur.

En conclusion, la caractérisation de ces régulations dans d'autres espèces a révélé des différences dans la structure des opérons, et donc probablement dans les modalités de fonctionnement de ces systèmes, voire parfois l'absence de l'un des régulateurs. De plus, la mise en évidence de ces systèmes n'exclut pas l'existence d'autres modes de régulation du



**Figure 9. Les régulons de stress chez les *Streptomyces***  
 D'après Servant et Mazodier, 2001



choc thermique, spécifiques de tel ou tel organisme. Par conséquent, bien que les principaux systèmes de réponse au choc thermique décrits chez *B. subtilis* soient effectivement présents chez la plupart des autres bactéries Gram-positives à faible GC %, la classification des gènes de stress thermique en quatre classes établie chez le modèle n'est pas applicable à l'ensemble du phylum.

### 3-Les *Streptomyces* et les bactéries Gram-positives à haut GC%

Les mécanismes connus de régulation de la réponse au stress thermique chez les *Streptomyces* ne comportaient jusqu'à récemment que des systèmes répressifs car ce sont ceux qui contrôlent l'expression des protéines majeures du choc thermique. Hsp58 (GroEL1), Hsp56 (GroEL2), Hsp90-100 (Lon), Hsp70 (DnaK), et Hsp18 sont tous sous contrôle du facteur HrcA, ou de l'un des deux facteurs quasi-spécifiques des bactéries Gram-positives à haut GC %, HspR ou RheA. Cependant, le séquençage du génome de *S. coelicolor* A3 a révélé l'existence de 54 facteurs sigma putatifs, parmi lesquels 9 homologues de *sigB* de *B. subtilis* ont pu être identifiés (Bentley et coll., 2002; Viollier et coll., 2003a). Plusieurs de ces facteurs commencent à être caractérisés et semblent impliqués dans la réponse aux stress et l'un d'eux,  $\sigma^H$ , serait induit par les chocs thermique, éthanolique et salin, et jouerait un rôle dans le programme de différenciation cellulaire (Kormanec et coll., 2000; Viollier et coll., 2003b). Bien que la plupart des facteurs sigma ne soient pas encore caractérisés, il devient évident que les régulations positives jouent également un rôle important dans cette réponse, et l'étude de ces facteurs modifiera probablement de façon considérable la vision actuelle du régulon de choc thermique des *Streptomyces*.

#### Le répresseur HrcA

Chez les *Streptomyces*, le gène *hrcA* est en opéron avec un paralogue de *dnaJ*, et HrcA réprime sa propre expression ainsi que celle de *groEL2* et de l'opéron *groES-groEL1* (Grandvalet et coll., 1998) (Fig. 9). La recherche systématique du motif CIRCE dans la séquence génomique de *S. coelicolor* a révélé l'existence d'un nouveau membre du régulon HrcA, *armX*, une protéine riche en sérine également présente chez les autres Actinomycètes, mais dont la fonction est encore inconnue (A. Sobczyk, J. Viala, C. Lavire et P. Mazodier, communication personnelle).

### **Le système HspR/HAIR**

L'opéron *dnaK* de *S. coelicolor* ne comporte ni le gène *hrcA* ni le motif CIRCE, à la différence de *B. subtilis*, et son expression est indépendante de ce régulateur bien que thermoinductible. Par contre, l'inactivation du dernier gène de l'opéron entraîne la dérépression de l'opéron et l'accumulation de DnaK à toutes les températures (Grandvalet et coll., 1997). De plus, le produit du gène, qui présente certaines similitudes avec les régulateurs GlnR et MerR, code une protéine capable de se fixer sur la région promotrice de l'opéron (Bucca et coll., 1995), indiquant que cette protéine, HspR (pour Heat shock protein Regulator), est le répresseur de l'opéron *dnaK*. Celui-ci contrôle également la synthèse de la protéase Lon et du chaperon ClpB (Grandvalet et coll., 1999; Sobczyk et coll., 2002) (Fig. 9). La comparaison des séquences promotrices de *dnaK* et *clpB* a permis l'identification d'un motif commun répété inversé (IR). Des expériences *in vitro* de retard de migration sur gel et d'empreinte à la DNase I ont démontré l'interaction directe et spécifique entre HspR et ce motif de reconnaissance, nommé HAIR (HspR-Associated Inverted Repeat) dont le consensus est CTTGAGT-N7-ACTCAAG (Grandvalet et coll., 1999).

Par ailleurs, DnaK pourrait agir comme corépresseur en permettant la formation d'un complexe HspR-DnaK-ADN stable. Cette interaction semble indépendante de la présence d'ATP ou des cofacteurs GrpE et DnaJ et ne serait pas due à l'activité de chaperon de DnaK et donc à la solubilisation accrue de HspR *in vitro*, mais bien à la stabilisation du complexe ternaire (Bucca et coll., 2000). Cette observation a conduit les auteurs à postuler que l'accumulation de protéines dénaturées par le stress thermique devrait limiter la quantité de forme libre de DnaK disponible pour interagir avec HspR, et à proposer un modèle d'induction du régulon par titrage du chaperon DnaK.

Il est intéressant de noter d'une part, que ce système est restreint aux actinomycètes et à un petit nombre de bactéries à Gram-négatif (*H. pylori* et *Aquifex aeolicus*) et d'autre part, qu'il s'agit du seul exemple où la régulation de la synthèse des chaperons GroESL et celle de DnaK soient totalement distinctes.

### **Le thermosenseur RheA**

Chez *S. albus*, Hsp18 est une petite protéine dont la synthèse est induite uniquement à haute température et requise pour la thermotolérance aux températures extrêmes. Des données génétiques et biochimiques ont montré que la transcription de *hsp18* est réprimée par le produit de *rheA*, le gène placé juste en amont et dans le sens opposé de *hsp18*, avec lequel il partage la région promotrice (Servant et Mazodier, 1996; Servant et coll., 1999). Des

expérimentations *in vitro* ont montré que RheA (Repressor of *h*sp *e*ighteen) réprime l'expression de ces gènes par fixation directe au niveau d'une séquence répétée inversée qui chevauche la boîte -35 du promoteur de *hsp18* et la boîte -10 de *rheA*. De plus, l'interaction est inhibée de façon réversible par une préincubation à 41°C, et la modification conformationnelle de la protéine en fonction de la température a pu être observée par dichroïsme circulaire, suggérant que RheA joue directement un rôle de thermomètre cellulaire (Servant et coll., 2000). Cependant, si la délétion du régulateur entraîne bien l'accumulation des ARNm de *hsp18* à 37°C, la protéine ne devient détectable qu'à haute température. Ceci implique un mécanisme supplémentaire de régulation thermosensible post-transcriptionnelle encore inconnu, qui pourrait être lié à la présence d'une structure secondaire en 5' de l'ARNm comme dans le cas de *rpoH* de *E. coli* (Servant et Mazodier, 1996).

RheA est donc un thermosenseur dont la capacité de fixation à sa cible n'est dictée que par son seul état conformationnel, ce qui constitue avec le senseur TlpA de *S. typhimurium* les seuls exemples connus de protéines régulatrices capables de sentir directement la chaleur (Hurme et coll., 1997).

### **La réponse au stress thermique chez les actinomycètes**

Nous avons déjà vu que le régulateur HrcA était largement répandu dans l'ensemble du monde bactérien, et la structure du régulon HrcA de *S. coelicolor* semble conservée aussi bien chez les autres *Streptomyces* (*S. lividans*, *S. albus*) que chez les mycobactéries. De même, le régulateur HspR est présent chez tous les actinomycètes et contrôle les opérons *dnaK*, *clpB* et *lon*, ce dernier gène n'ayant été identifié que dans une seule espèce de mycobactérie, *M. smegmatis* (Servant et Mazodier, 2001). Récemment, l'analyse du transcriptome de *M. tuberculosis* a confirmé le rôle de HrcA, HspR ainsi que plusieurs facteurs sigma alternatifs dans le contrôle de la réponse au choc thermique. Il a également été mis en évidence de nouveaux gènes de stress, dont l'un semble un membre du régulon HAIR/HspR spécifique des mycobactéries et spécifiant un probable antigène de 14 KDa nommé Acr2 (Stewart et coll., 2002).

A l'inverse de HrcA et HspR, le régulateur RheA semble extrêmement spécifique puisque restreint à un petit nombre d'espèces du genre *Streptomyces*, à l'exclusion même de *S. coelicolor* et *S. lividans*.

## CHAPITRE III-Activités biochimiques et fonctions biologiques associées

L'élévation de la température a pour conséquence la dénaturation des protéines. Celle-ci entraîne non seulement leur inactivation, mais aussi leur agrégation du fait de l'exposition de résidus hydrophobes normalement enfouis dans le cœur de la structure. Ceci explique que la majorité des protéines de réponse au choc thermique soient des chaperons moléculaires et des protéases, dont la fonction est respectivement de renaturer les protéines et de les hydrolyser.

Le concept de chaperon moléculaire est apparu il y a une quinzaine d'années, suite au constat que l'information portée par la chaîne d'acides aminés constituant une protéine n'est pas toujours suffisante à l'établissement d'une structure tridimensionnelle correcte. Il existe une classe de protéines permettant d'aider les chaînes polypeptidiques complètes ou en cours de synthèse à acquérir la bonne conformation. Elles ont été nommées ainsi car elles doivent empêcher les interactions impropres qui auraient lieu en absence de leur « surveillance ». Les chaperons sont donc requis pour l'acquisition de la structure native des protéines cytoplasmiques, d'une part, en prenant en charge les chaînes naissantes des protéines en cours de synthèse à leur sortie des ribosomes, et d'autre part, en assistant le repliement des protéines entièrement synthétisées. Les chaperons sont également indispensables à la sécrétion des protéines qu'ils maintiennent sous une forme dépliée, permettant ainsi leur passage à travers l'étroit canal de l'appareil de sécrétion. Enfin, lorsque survient un stress comme l'élévation de température, ils ont un effet i) protecteur, car en interagissant rapidement avec de nombreuses protéines dès les premières étapes du dépliement, ils empêchent l'accentuation du phénomène d'agrégation, et ii) réparateur, car ils permettent aux protéines déjà dénaturées de retrouver leur structure native.

Les protéases agissent de façon complémentaire en permettant l'élimination des agrégats protéiques par l'hydrolyse des protéines irréversiblement dénaturées. Ainsi, sur les 25 protéines de fonctions connues induites par le choc thermique chez *E. coli*, on compte 10 chaperons (GroES/GroEL, DnaK/DnaJ, HtpG, HslO, HslR, IbpA, IbpB, et ClpB) et 6 protéases (DegP, ClpY/Q, ClpX/P et Lon), les autres étant principalement des protéines régulatrices (facteurs sigma) ou des protéines d'assistance au repliement (peptidyl-propyl

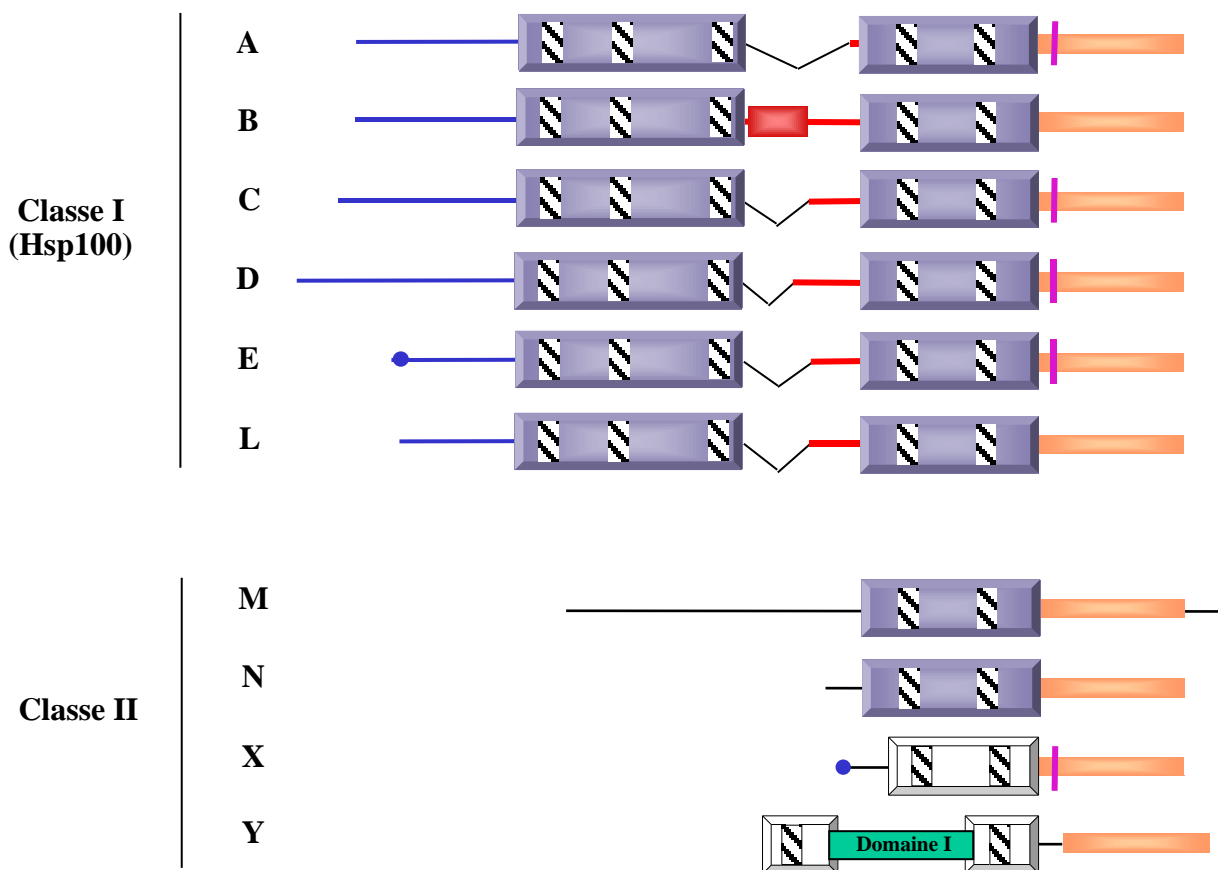
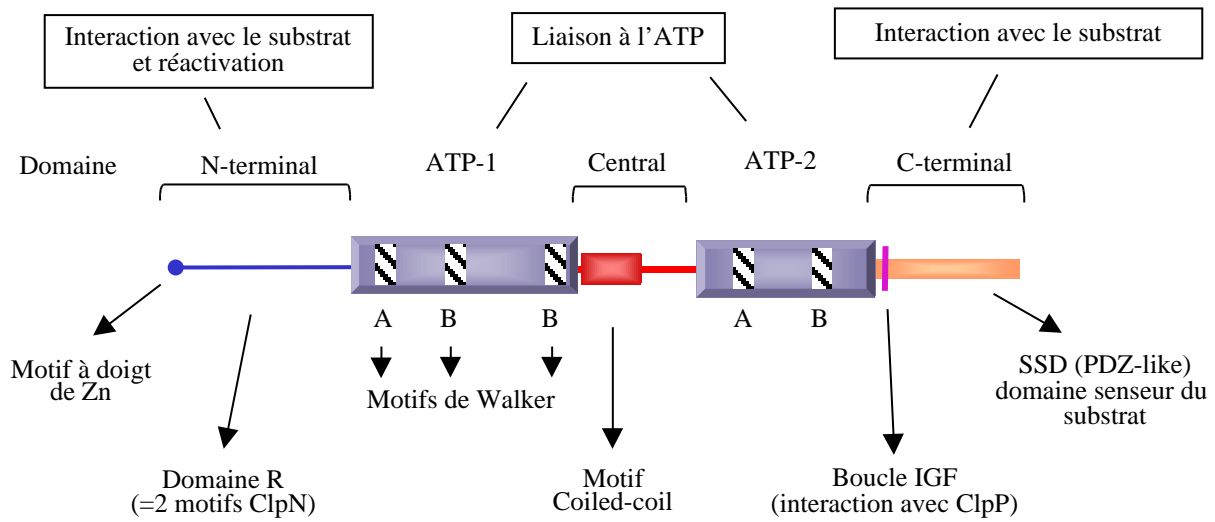


Figure 10. Structure et classification des ATPases de la famille Clp

isomérases...) qui, à la différence des chaperons, catalysent une réaction enzymatique spécifique (Yura et coll., 2000). De même chez *B. subtilis*, le stress thermique induit les chaperons GroESL et DnaKJ ainsi que plusieurs protéases dont LonA, FtsH, ClpXP, HtrA, ClpCP.

Ce chapitre sera particulièrement dédié à la présentation d'une classe particulière de HSP, la famille des Clp, comprenant des protéines qui présentent la particularité d'agir à la fois comme protéases et comme chaperons. Dans la première partie seront détaillés les aspects relatifs à la structure tridimensionnelle et à l'activité biochimique des différentes sous-unités ainsi que les substrats identifiés. Par ailleurs, un nombre croissant de données suggère un rôle de ces protéines dans différentes fonctions cellulaires comme la croissance, la division, la motilité, la virulence, sans pour autant que le substrat spécifique ait pu être mis en évidence. Cet aspect sera abordé dans la seconde partie.

## **A-Structure et activités biochimiques**

### **1-La famille des protéines Clp**

Les Clp sont des protéines quasi ubiquitaires, présentes chez toutes les eubactéries, ainsi que chez les organismes photosynthétiques, des cyanobactéries aux plantes supérieures, et chez les animaux. Elles forment une famille hétérogène de protéines car on regroupe sous cette appellation à la fois les protéines ayant une activité ATPasique et celles ayant une activité peptidasique. Bien que certaines peptidases et ATPases interagissent en formant des complexes protéolytiques ATP-dépendants, elles correspondent à des protéines non apparentées.

#### **Les sous-unités ATPasiques**

La famille des ATPases Clp est fréquemment appelée Clp/HSP100 par simplification bien qu'elle regroupe des protéines de tailles variées. Celles-ci se répartissent en deux classes en fonction du nombre de sites liant l'ATP : la Classe I regroupe les protéines de plus haut poids moléculaire (environ 100 kDa) présentant deux domaines de liaison à l'ATP ou NBS (pour Nucléotide Binding Site) et la Classe II les protéines présentant un seul domaine (Fig. 10). La structure et la séquence en acides aminés de ces domaines est une des caractéristiques des ATPases Clp, et est extrêmement bien conservée dans toute la famille. Le domaine situé

**Table 3 Répartition des gènes *clp* chez les bactéries Gram-positives**

			Classe I		Classe II		Protéases				
Firmicutes (bas GC %)	<i>Bacillus</i>	<i>anthracis</i>	B	C		X	Y	PP	Q		
		<i>cereus</i>	B	C		X	Y	PP	Q		
		<i>halodurans</i>		C	E	X	Y	PP	Q		
		<i>stearothermophilus</i>	B	C	E	X	Y	P	Q		
		<i>subtilis</i>		C	E	X	Y	P	Q		
		<i>Oceanobacillus</i>	<i>iheyensis</i>		C	E	X	Y	P	Q	
		<i>Listeria</i>	<i>innocua</i>	B	C	E	X	Y	PP	Q	
			<i>monocytogenes</i>	B	C	E	X	Y	PP	Q	
		<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	B	C		L	X	Y	P	Q
			<i>epidermidis</i>	B	C			X	Y	P	Q
		<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>		C		L	X	Y	P	Q
			<i>plantarum</i>	B	C	E	L	X	Y	P	Q
	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	B	C	E		X	Y	P	Q	
		<i>faecium</i>	B				X	Y	P	Q	
	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	B	C	E	L	X		P		
	<i>Streptococcus</i>	<i>agalactiae</i>	AAA		C	E	L	X		P	
		<i>equi</i>		C	E	L	X		P		
		<i>gordonii</i>				L	X		P		
		<i>mutans</i>	B	C	E	L	X		P		
		<i>pneumoniae</i>		C	E	L	X		P		
		<i>pyogenes</i>		C	E	L	X		P		
		<i>thermophilus</i>		C	E	L	X		P		
		<i>thermophilus</i>		C	E	L	X		P		
	<i>Clostridium</i>	<i>acetobutylicum</i>	A	B	C	E		X		P	
		<i>thermocellum</i>	A		C	E		X		P	
		<i>difficile</i>		B	C			X		PP	
		<i>perfringens</i>		B	C			X		P	
		<i>tetani</i>		B	C	E		X		P	
<i>Desulfitobacterium</i>		<i>hafniense</i>			C		X	Y	P	Q	
<i>Thermoanaerobacter</i>	<i>tengcongensis</i>			C		X	Y	P	Q		
Actinobactéries (haut GC %)	<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	B	C			X		PP		
	<i>Mycobacterium</i>	<i>leprae</i>	B	C			X		PP		
		<i>tuberculosis</i>	B	C			X		PP		
	<i>Corynebacterium</i>	<i>eficiens</i>	B	C			X		PP		
		<i>glutamicum</i>	B	C			X		PP		
	<i>Streptomyces</i>	<i>coelicolor</i>	B	CCC			X		PPPPP		
	<i>Thermobifida</i>	<i>fusca</i>	B	C			X		PP		
	<i>Tropheryma</i>	<i>whipplei</i>	B	C			X		PP		
			sequence incomplète								
		sequence complète									

en position amino-terminale, présent uniquement dans la Classe I, possède un motif de type Walker A ( $Gx_4GKT$ ) et deux motifs de type Walker B ( $Rx_{4-12}h_4D$ ) alors que le domaine carboxy-terminal commun aux deux classes présente un seul motif de chaque type.

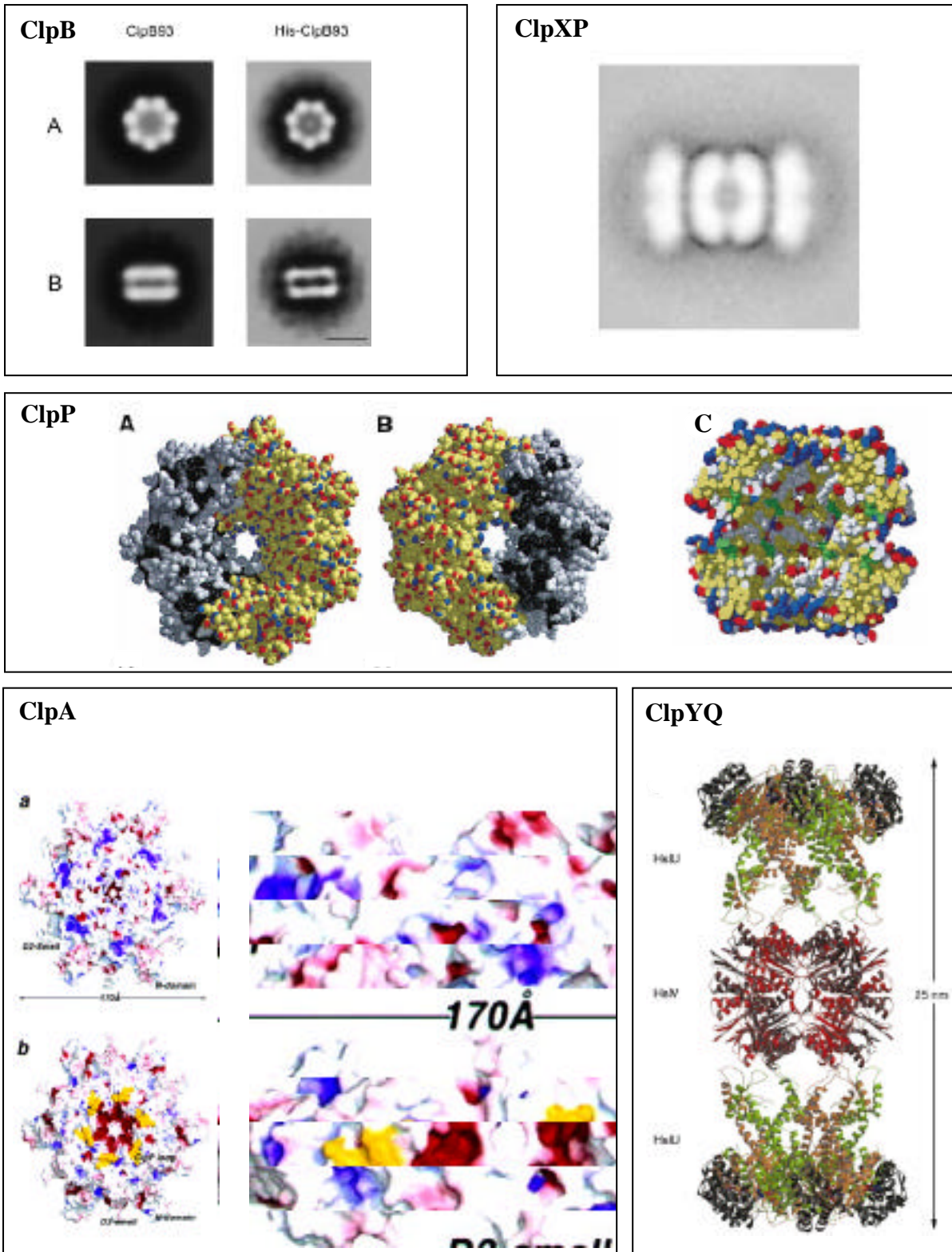
La Classe I comporte 6 types de protéines appelées ClpA, ClpB, ClpC, ClpD, ClpE et ClpL dont les structures sont très proches et que l'on distingue principalement en fonction de la longueur variable de la séquence centrale séparant les deux NBS, mais aussi sur la base de leur région amino-terminale (Derré et coll., 1999a; Huang et coll., 1993; Schirmer et coll., 1996). Alors que les protéines ClpA, ClpB et la plupart des ClpC présentent un motif typique appelé ClpN (Barnett et coll., 2000), la protéine ClpE possède, elle, un motif en doigt de Zn (Derré et coll., 1999a; Nair et coll., 1999). Les protéines de la Classe II (ClpM, ClpN, ClpX et ClpY) sont plus courtes et sont homologues à la région carboxy-terminale des protéines de la Classe I, particulièrement ClpM et ClpN. ClpX et ClpY sont les plus divergentes, en particulier ClpY dont le domaine de liaison à l'ATP présente une insertion de 140 résidus entre les motifs de Walker A et B [pour revue voir (Schirmer et coll., 1996; Squires et Squires, 1992)].

On dénombre actuellement 10 types d'ATPases Clp et chaque génome est doté d'un jeu de gènes *clp* spécifiques (Table 3). Ainsi les paralogues *clpC* et *clpX* sont présents chez toutes les bactéries à Gram-positif, alors que les gènes *clpM*, *clpN*, et *clpD* en sont absents. Le nombre total de paralogues est variable suivant les espèces : par exemple, les mycobactéries présentent le jeu de *clp* le plus restreint (*clpB/C/X*) alors que le génome de *L. lactis* en compte cinq (*clpB/C/E/L/X*). Cette distribution des paralogues est probablement le reflet de différents évènements de duplication-délétion de gènes, évolution dans laquelle les transferts horizontaux ont probablement joué un rôle important. En témoigne la présence de *clpA* chez *S. agalactiae* au sein d'un élément mobile (plasmide intégré) (Glaser et coll., 2002), ou celle d'un *clpB* extrêmement dégénéré chez *S. mutans*, bien que ces paralogues soient absents de tous les autres streptocoques dont le génome a été séquencé (Lemos et Burne, 2002).

### **Les sous-unités protéolytiques**

Il existe deux types de sous-unités protéolytiques Clp : ClpP, présente chez la plupart des espèces eubactériennes (à l'exception des mycoplasmes) et ClpQ (HslV-CodW), présente dans un nombre plus restreint de microorganismes. Celles-ci ne sont apparentées ni dans leur séquence, ni dans leur mécanisme de fonctionnement (Ramachandran et coll., 2002; Rohrwild et coll., 1996). D'après les résultats obtenus chez *E. coli*, ClpP s'associe avec les sous-unités ATPasiques ClpA et ClpX alors que ClpQ s'associe à la sous-unité ClpY (HslU-CodX)





**Figure 11. Structures tridimensionnelles des protéines de la famille Clp**

Les clichés des complexes ClpB (Kim et coll., 2000) et ClpXP (Ortega et coll., 2000) ont été obtenus par microscopie électronique. Les représentations des complexes ClpYQ (Bochtler et coll., 2000), ClpP (Wang et coll., 1997) et ClpA (Guo et coll., 2002), ont été élaborées à partir des structures cristallographiques.

(Gottesman et coll., 1993; Katayama et coll., 1988; Rohrwild et coll., 1996). La spécificité d'association entre sous-unités protéasiques et ATPasiques serait liée à des symétries d'association différentes. En effet, les hexamères de ClpA et ClpX s'associent à des heptamères de ClpP alors que les hexamères de ClpY s'associent aux hexamères de ClpQ. Ceci implique que les mécanismes d'action de ces complexes soient spécifiques (Ramachandran et coll., 2002), bien que la convergence de structure ait pu suggérer un mécanisme commun (Wang et coll., 1998). Cette spécificité semble confirmée par le fait que *clpQ* ne soit jamais présent dans un génome indépendamment de *clpY*.

Le gène *clpP* semble présent chez toutes les eubactéries à l'exception des mycoplasmes, le plus souvent en une seule copie par génome. Cependant, certaines bactéries comme les membres du groupe *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *C. difficile*, *S. equi* ou encore les mycobactéries, possèdent deux gènes *clpP*, le nombre maximum étant détenu par le groupe des *Streptomyces* dont la famille multigénique est constituée de 5 gènes *clpP*. Il est intéressant de noter que les différents membres de ces familles multigéniques ne sont pas redondants mais ont acquis à la fois des fonctions et des mécanismes de régulation différents, comme cela a été démontré chez *Bacillus thuringiensis* (Fedhila et coll., 2002) ou *S. lividans* (de Crecy-Lagard et coll., 1999; Viala et coll., 2000).

## 2-Structures et fonctions

### Structures

Les protéines Clp ont deux caractéristiques structurales majeures. La première est leur capacité à s'oligomériser. Ainsi, les ATPases ClpY, ClpA et ClpX de *E. coli* sont toutes capables de former des hexamères, l'oligomérisation étant stimulée en présence d'ATP (Bochtler et coll., 2000; Guo et coll., 2002; Kessel et coll., 1995). De même, le chaperon ClpB de *E. coli* formerait des heptamères (Fig. 11), et probablement des complexes heptamériques mixtes entre les deux formes de la protéine ClpB de 93 et 79 kDa respectivement (Kim et coll., 2000a). Il a également été montré par des approches de microscopie électronique et de cristallographie que ClpP et ClpQ formaient respectivement des heptamères et hexamères (Bochtler et coll., 2000; Flanagan et coll., 1995; Kessel et coll., 1995; Kessel et coll., 1996; Wang et coll., 1997). Dans tous les cas se retrouve une structure annulaire commune (Fig. 11).

La seconde caractéristique, déterminante pour l'activité biochimique de ces protéines, est la capacité d'association de certaines ATPases Clp hexamérisées avec les oligomères de ClpP ou ClpQ. Par exemple, ClpP peut s'associer à ClpA ou ClpX et ClpQ s'associe à ClpY. Les complexes multiprotéiques résultants présentent une activité protéolytique ATP-dépendante avec une spécificité de substrat dépendant de l'ATPase. La structure tridimensionnelle de ces complexes présente de fortes analogies avec celle du chaperon GroES-GroEL, ou du protéasome 26S eucaryote (Kessel et coll., 1995; Wang et coll., 1998).

### Activités biochimiques

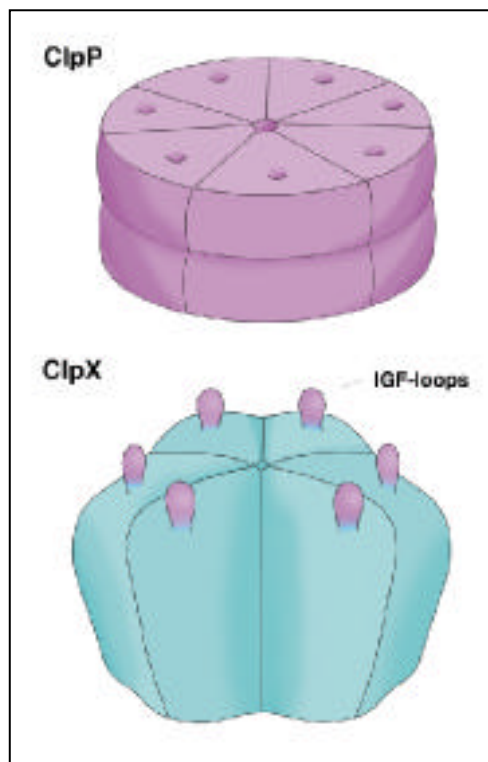
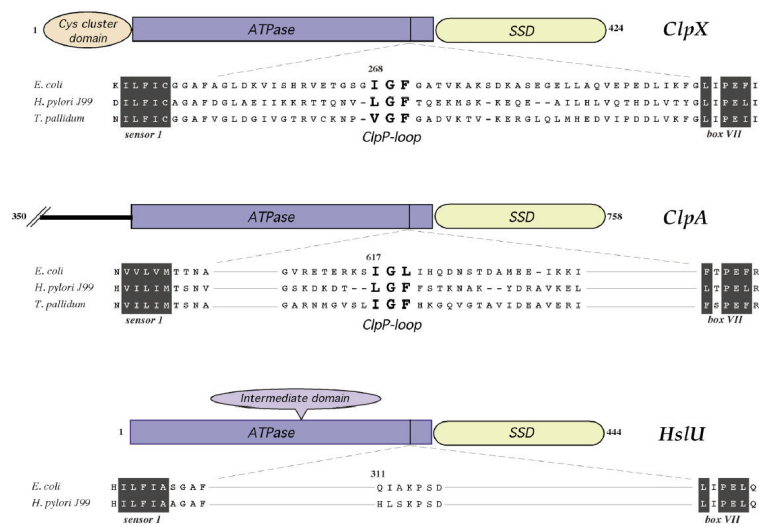
L'oligomérisation de ClpP est nécessaire à l'acquisition de l'activité sérine protéase (Wang et coll., 1997). L'heptamère de ClpP est alors capable de dégrader de courts peptides jusqu'à 7 acides aminés, mais l'association avec les hexamères de ClpA ou ClpX est requise pour la dégradation des peptides de tailles supérieures et des protéines (Woo et coll., 1989).

Au sein du complexe protéolytique, les ATPases ont pour fonction première la reconnaissance du substrat, laquelle passerait par l'interaction entre un domaine senseur appelé SSD situé dans la région carboxy-terminale (pour Sensor and Substrate Discrimination) et des résidus déterminants portés par le substrat et encore non caractérisés (Smith et coll., 1999). La seconde fonction des ATPases est de dénaturer le substrat. Cette étape est indispensable pour lui permettre de traverser l'étroit canal reliant la chambre ATPasique à la chambre protéolytique (Kim et coll., 2000b; Weber-Ban et coll., 1999).

Lorsque les ATPases ne sont pas associées à ClpP, elles présentent généralement une activité de chaperon vis-à-vis des substrats, lesquels sont alors relargués dans le milieu après dénaturation (Weber-Ban et coll., 1999). En effet, il est probable que cette dénaturation partielle donne une chance au substrat d'évoluer spontanément vers l'état natif, ce qui est également le principe de fonctionnement des chaperons GroESL.

Cette capacité d'interaction entre sous-unités ATPasiques et peptidasiques est à l'origine de la dualité de fonctions des Clp-ATPases : à la fois chaperons lorsqu'elles sont seules, et protéases lorsqu'elles sont associées, et conférant dans ce cas au complexe la spécificité vis-à-vis du substrat.

Bien que la quasi totalité des études sur l'activité biochimique des Clp ait été réalisée sur les protéines de *E. coli*, il est probable que les ATPases ClpE et ClpC présentes chez de nombreuses bactéries à Gram-positif possèdent la même dualité de fonctionnement. En effet, il a été mis en évidence par alignements multiples que les ATPases interagissant avec ClpP présentent un tripeptide (isoleucine, glycine, phénylalanine) caractéristique dans le second



**Figure 12. Les boucles IGF présentes à la surface de ClpX permettent l'interaction avec les sous-unités protéolytiques ClpP**  
 D'après Kim et coll. 2001

NBS. Les expériences *in vitro* ont démontré l'absolue nécessité de ce motif pour la formation du complexe ClpXP (Kim et coll., 2001b). Cette séquence, appelée IGF ou boucle-ClpP (ClpP-loop), est également présente chez ClpA (Fig. 12). Par contre, elle est absente de ClpY, qui n'interagit qu'avec ClpQ, et de ClpB, qui n'agit que comme chaperon moléculaire et ne forme pas de complexe avec ClpP (Woo et coll., 1992). De même, la recherche de ce motif dans les banques de séquences par Kim et coll., montre que la boucle IGF est systématiquement présente, avec une dégénérescence au niveau du premier acide aminé (I, M, V, ou L) dans les protéines ClpA, ClpC, ClpX et ClpE de 14 bactéries. Par contre, elle est toujours absente des protéines ClpB ainsi que dans les ATPases Clp des espèces dépourvues de ClpP comme *S. cerevisiae*. En recherchant ce motif dans les protéines Clp identifiées chez les bactéries Gram-positives, nous avons confirmé l'absence de la boucle IGF dans les homologues de ClpB et sa présence dans ceux de ClpA, ClpC, et ClpE. Par contre, les deux premiers acides aminés du motif IGF sont systématiquement absents des protéines ClpL, suggérant que celles-ci ne s'associent pas avec ClpP et que son activité soit restreinte à l'activité de chaperon.

### 3-Les substrats des protéines Clp

Dans une très large majorité, les données biochimiques concernant la structure, l'activité de chaperon ou de protéolyse ainsi que la recherche de substrats spécifiques proviennent d'études réalisées chez *E. coli*. Quelques substrats ont été mis en évidence chez *Caulobacter crescentus*, du fait de l'implication des Clp dans le contrôle du cycle cellulaire, et chez *B. subtilis* car elles jouent un rôle dans le contrôle de la compétence (voir Table 4).

#### ClpAP de *E. coli*

La mise en évidence d'un complexe protéolytique dégradant la caséine de manière ATP-dépendante est à l'origine de la découverte des Clp, d'où leur nom (Clp pour Caseinolytic protease) (Katayama et coll., 1988; Katayama-Fujimura et coll., 1987). Par la suite, plusieurs protéines ont été identifiées comme des cibles du complexe ClpAP comme MazE, l'antitoxine d'un « module de dépendance » (addiction module) (Aizenman et coll., 1996), RepA, une protéine requise pour la réplication du plasmide P1 (Hoskins et coll., 1998; Wickner et coll., 1994) et peut-être ClpA elle-même puisqu'une fusion traductionnelle *clpA-lacZ* est stabilisée dans un mutant *clpA* ou *clpP* (Gottesman et coll., 1990; Maurizi et coll.,

**Table 4 Liste des substrats des Clp**

Espèces	Clp	Activité Clp	Substrat	Activités du substrat	Références		
<i>Escherichia coli</i>	ClpAP	dégradation	Caséine		Katayama et al., 1997	Katayama et al., 1998	
	ClpAP	dégradation	MazE	Antitoxine (module de dépendance)	Aizenman et al., 1996		
	ClpAP	dégradation	ClpA	Chaperon/sous-unité ATPasique de protéase	Gottesman et al., 1990	Maurizi et al., 1990	
	ClpAP	dégradation	RepA	Protéine de répliation du plasmide P1	Wickner et al., 1994		
	ClpA	chaperon	"		Wickner et al., 1994	Pak et al., 1999	
	ClpX	chaperon	O	Protéine de répliation du phage	Wawrzynow et al., 1995		
	ClpXP	dégradation	"		Wojtkowiak et al., 1993	Gottesman et al., 1993	
	ClpXP	dégradation	phd	Protéine de dépendance du plasmide P1	Lehnher et al., 1995		
	ClpXP	dégradation	RpoS	Facteur sigma (phase stationnaire)	Schweder et al., 1996		
	ClpXP	dégradation	UmuD'	ADN Pol V (mutagenèse SOS)	Frank et al., 1996		
	ClpXP	dégradation	Mu <sub>rep</sub>	Protéine de répliation du plage Mu	Mahmmedi et al., 1994		
	ClpX	chaperon	MuA	Transposase du plage Mu	Levchenko et al., 1995	Krukltis et al., 1996	Jones et al., 1998
	ClpYQ	dégradation	RpoH	Facteur sigma (réponse aux stress)	Kanemori et al., 1997		
	ClpYQ	dégradation	SulA	Inhibiteur de la division cellulaire	Kanemori et al., 1999		
	ClpYQ	dégradation	RcsA	Activateur des gènes capsulaires	Wu et al., 1999		
	ClpAP	dégradation	protéines étiquetées (SsrA)		Gottesman et al., 1998		
	ClpXP	dégradation	"		Gottesman et al., 1999	Levchenko et al., 2000	
	ClpAP	dégradation	protéines dénaturées		Hoskins et al., 2000		katayama et al., 1998
	ClpXP	dégradation	"		Kanemori et al., 1997		
ClpYQ	dégradation	"		Missiakas et al., 1996			
<i>Bacillus subtilis</i>	ClpCP	dégradation	ComK	Activateur des gènes de compétence	Turgay et al., 1997	Turgay et al., 1998	
	ClpCP	dégradation	MecA	Adaptateur pour ComK	Turgay et al., 1997	Turgay et al., 1998	
	ClpCP	dégradation	ComS	Inducteur de ComK	Turgay et al., 1997	Turgay et al., 1998	
	ClpCP	dégradation	Spx	Répresseur de ComK	Nakano et al., 2001	Nakano et al., 2002	
	ClpXP	dégradation	"		Nakano et al., 2001	Nakano et al., 2002	
	ClpCP	dégradation	"	Facteur sigma (sporulation et compétence)	Nanamiya et al., 1998	Liu et al., 1999	
	ClpCP	dégradation	Spo0A	Inducteur de la sporulation	Nanamiya et al., 1998		
	ClpCP	dégradation	SpoIIAB	Facteur anti-sigma de $\sigma^r$ (sporulation)	Pan et al., 2001		
	ClpXP	dégradation	protéines étiquetées (SsrA)		Wiegert et al., 2001		
	ClpCPX	dégradation	protéines dénaturées		Kruger et al., 2000		
	<i>Caulobacter crescentus</i>	ClpXP	dégradation	CtrA	Régulateur de la division cellulaire	Jenal et al., 1998	
		ClpXP	dégradation	McpA	Chimiorécepteur	Tsai et al., 1998	
		ClpXP	dégradation	McpB	Chimiorécepteur	Potocka et al., 2002	
<i>Streptomyces lividans</i>	ClpP3/4	dégradation	PopR	Activateur de l'operon <i>clpP3/4</i>	Viala et al., 2002		
	ClpP1/2	dégradation	PopR		Viala et al., 2002		

1990). De plus, ClpA présente une activité de chaperon vis-à-vis de la protéine RepA en permettant sa réactivation par dissociation des dimères, et peut donc soit activer la protéine, soit se combiner avec ClpP pour la dégrader (Pak et coll., 1999; Wickner et coll., 1994).

En plus de la dégradation spécifique de substrats, le complexe ClpAP joue un rôle dans l'élimination aspécifique de protéines : d'une part, en dégradant des protéines dénaturées, qui ne sont normalement pas des substrats à l'état natif (Hoskins et coll., 2000; Katayama et coll., 1988), et d'autre part, en participant à la dégradation des protéines étiquetées par le système SsrA (Gottesman et coll., 1998). Ce dernier permet, lorsque la traduction est interrompue, de libérer le complexe ternaire ARNm-ribosome-protéine, et d'adresser aux protéases la protéine tronquée.

### **ClpXP de *E. coli***

De même, le complexe ClpXP de *E. coli* participe de manière aspécifique à la dégradation des protéines étiquetées par SsrA et serait même *in vivo* le complexe prédominant pour cette dégradation (Gottesman et coll., 1998). En effet, le facteur SspB se fixe sur ces protéines tronquées et stimule leur reconnaissance par le complexe ClpXP (Levchenko et coll., 2000).

Le complexe présente également une activité protéolytique spécifique vis-à-vis de  $\phi$ O, une protéine clé de la réplication de l'ADN du phage  $\phi$  de *E. coli*, qui est à l'origine de la découverte de la protéine ClpX (Gottesman et coll., 1993; Wojtkowiak et coll., 1993). Celle-ci possède aussi une activité chaperon pour  $\phi$ O, puisqu'elle la protège de l'agrégation, la solubilise après dénaturation et augmente son affinité pour son site de reconnaissance (Wawrzynow et coll., 1995). D'autres protéines sont substrats du complexe ClpXP comme la protéine de dépendance Phd, une protéine antidote qui force le maintien du plasmide P1 chez *E. coli* (Lehnher et Yarmolinsky, 1995), le facteur sigma de phase stationnaire  $\sigma^S$ , dont la stabilité est augmentée *in vivo* dans des mutants *clpP* ou *clpX* (Schweder et coll., 1996), ou encore la protéine UmuD', une sous-unité de l'ADN polymérase V requise pour la réplication mutagène dite « SOS », et dont la dégradation n'a lieu que lorsqu'elle est associée en complexe inactif UmuD'/D (Frank et coll., 1996). Enfin, ClpX joue un double rôle dans la réplication du phage Mu. D'une part, cette protéine reconnaît et dégrade le répresseur du phage, en association avec ClpP, déréprimant le système de réplication par transposition (Mhammedi-Alaoui et coll., 1994), et d'autre part, elle intervient en tant que chaperon pour modifier la conformation de la transposase MuA et permettre la dissociation du complexe

tetramérique de MuA nécessaire à la formation du réplisome (Jones et coll., 1998; Krukltis et coll., 1996; Levchenko et coll., 1995).

### **ClpYQ de *E. coli***

Deux fonctions physiologiques importantes de la cellule font intervenir ce complexe : la réponse aux stress et le contrôle du cycle cellulaire. En effet, il a été montré que ClpYQ participe à la dégradation du facteur de stress <sup>32</sup> mais aussi des protéines anormales (Kanemori et coll., 1997; Missiakas et coll., 1996; Smith et coll., 1999). D'autre part, bien qu'il n'ait pas été mis en évidence de rôle de ClpYQ dans la dégradation des protéines marquées par SsrA, le domaine de reconnaissance du substrat (SSD) de ClpY reconnaît spécifiquement la protéine Arc étiquetée, suggérant peut-être un rôle mineur de ce complexe dans cette voie de dégradation (Smith et coll., 1999).

Par ailleurs, la surexpression de ClpYQ reverse le phénotype de sensibilité aux UV d'un mutant *lon*, lequel est dû à la stabilisation de l'inhibiteur de la division, Sula. En effet, la protéine du système SOS Sula est un inhibiteur de FtsZ exprimée uniquement en réponse aux UV et normalement dégradée par Lon pour permettre la poursuite du cycle cellulaire (Khattar, 1997; Wu et coll., 1999). Il a été démontré que Sula est en fait directement le substrat de la protéase ClpYQ et de Lon (Kanemori et coll., 1999b). De plus, Lon et ClpYQ partagent un second substrat, RcsA, qui induit l'expression des gènes capsulaires (Wu et coll., 1999). Enfin, ClpYQ pourrait être impliquée dans la stabilité de DnaA (Katayama et coll., 1996; Slominska et coll., 2003).

### **ClpCP et ClpXP de *B. subtilis***

Chez *B. subtilis*, les protéines ClpC, ClpP et ClpX sont impliquées dans le contrôle de différentes fonctions cellulaires, et l'inactivation de chacun de ces gènes a des effets pléiotropes sur la cellule. Le rôle joué par les Clp dans l'activation ou l'inactivation de plusieurs protéines incluant plusieurs facteurs sigma pourrait expliquer ces phénotypes (voir Chapitre III-B). Cependant, peu de substrats des Clp ont clairement été identifiés à ce jour et presque tous interviennent dans le contrôle de la compétence ou de la sporulation (SpoIIAB, <sup>H</sup>, ComK, ComS, MecA et Spx).

En effet, la protéine ClpC en association avec l'adaptateur MecA séquestre le facteur de compétence ComK, empêchant celui-ci d'induire sa propre synthèse ainsi que celle de son régulon (Fig. 13). Le complexe ainsi formé peut alors s'associer à ClpP, entraînant la



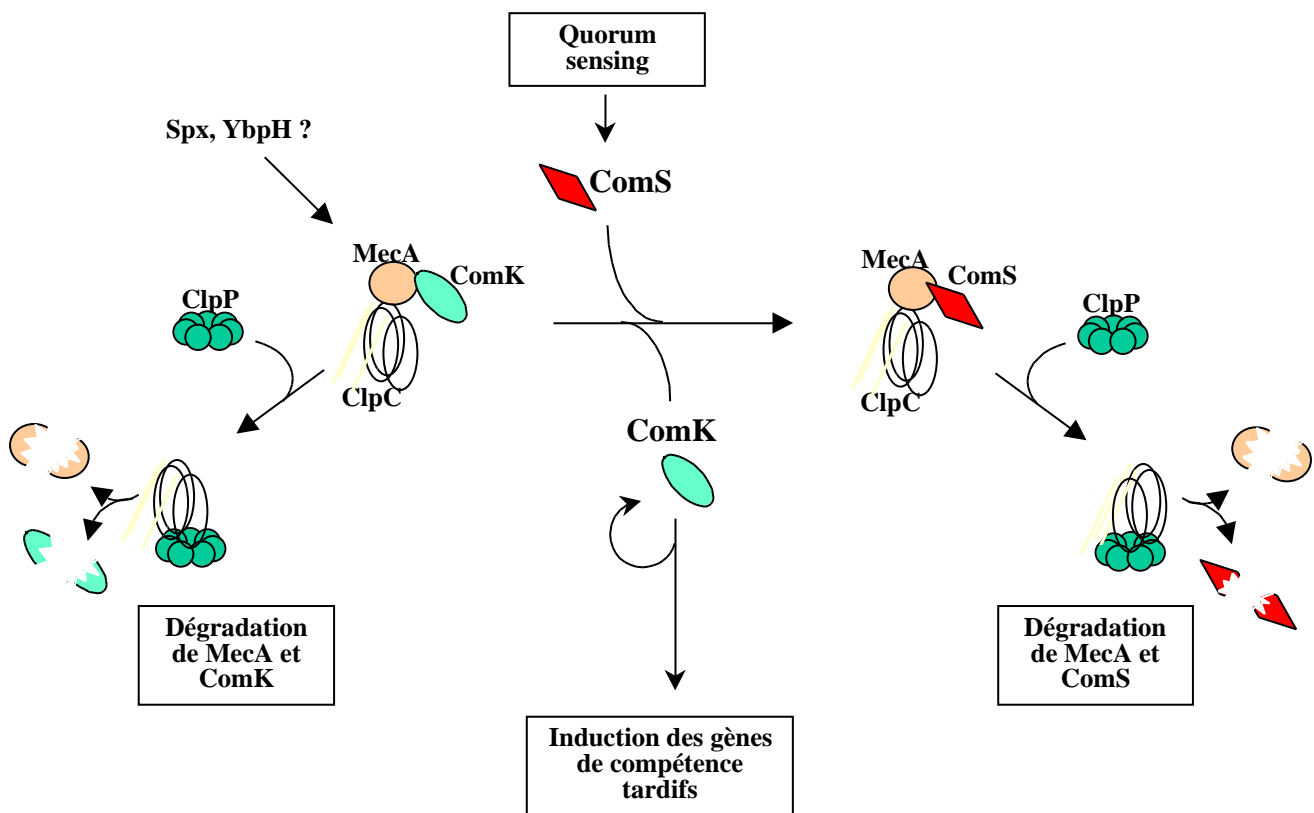


Figure 13. Le complexe ClpCP joue un rôle clef dans le contrôle de la compétence de *B. subtilis*

dégradation de ComK. En réponse à l'induction de la voie de signalisation de la compétence, le facteur ComS s'accumule, se lie à MecA et libère ComK, lequel peut exprimer les gènes de compétence. Le complexe MecA/ComS/ClpC s'associe alors à ClpP, et la protéase ainsi formée dégrade MecA et ComS [(Turgay et coll., 1998; Turgay et coll., 1997), pour revue voir (Msadek, 1999)]. Le rôle de Spx (Yjbd) n'est pas clairement défini mais on sait qu'il augmente l'affinité du complexe ClpC/MecA pour ComK et que son absence entraîne l'expression de *comK*, indépendamment de ClpP, suggérant qu'il serait requis pour le titrage et la dégradation de ComK (Nakano et coll., 2001; Nakano et coll., 2002a). Cependant, Spx est un substrat des protéases Clp puisqu'il est dégradé *in vitro* par le complexe ClpCP en présence de MecA ou de son paralogue YbpH et stabilisé *in vivo* par l'inactivation de *clpP* ou *clpX* (Nakano et coll., 2001; Nakano et coll., 2002b).

Depuis plusieurs années on sait que ClpP est requis pour la sporulation, et qu'un mutant de *clpC* présente une efficacité de sporulation réduite bien que sa fonction dans ce processus ne soit pas clairement établie (Msadek et coll., 1998). ClpC semble impliquée dans la stabilité de deux facteurs précoces de sporulation,  $\sigma^H$  et Spo0A, suggérant un rôle de la protéase ClpCP, bien que cet effet n'est observable qu'à haute température et ne rend donc probablement pas compte de ce défaut de sporulation (Nanamiya et coll., 1998). Par contre, le rôle de ClpCP a été récemment montré dans l'activation de  $\sigma^F$ , un facteur de sporulation actif dans la préspore. En effet, la protéase ClpCP dégrade le facteur anti-sigma SpoIIAB, lequel en s'associant avec  $\sigma^F$  inhibe son activité pendant les phases précoces de la sporulation. L'inactivation de *clpC* se traduit donc par la stabilisation de SpoIIAB et l'inactivation de  $\sigma^F$ . De plus, l'activation de  $\sigma^F$  est dépendante de la formation du septum, laquelle semble déficiente dans ce mutant, ce qui pourrait indirectement participer à son inactivation (Pan et coll., 2001). Ceci n'exclut cependant pas que le défaut de sporulation puisse être dû à l'action d'autres substrats de la protéase ClpP.

### Autres Clp

*C. crescentus* est un microorganisme qui présente la particularité de posséder un cycle de vie biphasique, puisque la division cellulaire asymétrique conduit à la formation de deux cellules au programme de différenciation différent. Les protéines ClpX et ClpP sont impliquées dans la dégradation de plusieurs protéines en fonction de la phase du cycle cellulaire, dont des récepteurs impliqués dans le chimiotactisme comme McpA et McpB (Potocka et coll., 2002; Tsai et Alley, 2001). De plus, des résultats obtenus *in vivo* montrent la

**Table 5 Fonctions associées aux Clp**

<b>Clp</b>	<b>Fonctions associées</b>	<b>Espèces</b>
<b>Virulence</b>		
ClpA	Détection par le système immunitaire de l'hôte?	<i>Brucella suis</i>
ClpB	Développement intramacrophagique	<i>Francisella novicida</i>
ClpB	Développement chez l'hôte	<i>Salmonella enterica</i>
ClpB	Expression de l'invasine Inv	<i>Yersinia enterocolitica</i>
ClpP	Répression du locus <i>ail</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
ClpC	Echappement des phagosomes - Expression de InlA, InlB, ActA	<i>Listeria monocytogenes</i>
ClpE	Croissance dans le foie et la rate	<i>Listeria monocytogenes</i>
ClpP	Expression de LLO et échappement du phagosome	<i>Listeria monocytogenes</i>
ClpX	Développement chez l'hôte (STM)	<i>Staphylococcus aureus</i>
ClpE	Développement chez l'hôte (STM)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
ClpC	Développement chez l'hôte (STM)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
ClpL	Développement chez l'hôte (STM)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
ClpP	Développement chez l'hôte (STM)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
ClpB	Différenciation vers la forme virulente Amastigote	<i>Leishmania major</i>
ClpB	Prolifération de la forme Amastigote	<i>Leishmania donovani</i>
ClpB	Expression du facteur de virulence A2	<i>Leishmania donovani</i>
<b>Stress</b>		
ClpA	Résistance au stress thermique	<i>Brucella suis</i>
ClpB	Résistance aux stress	<i>Brucella suis</i>
ClpB	Résistance aux stress (gène essentiel à haute température)	<i>Escherichia coli</i>
ClpY(Q)	Résistance aux stress (non essentiel)	<i>Escherichia coli</i>
ClpB	Résistance aux stress (gène essentiel à haute température)	<i>Helicobacter pylori</i>
ClpP(X)	Dégradation de RpoS (Développement chez l'hôte)	<i>Salmonella enterica</i>
ClpB	Adaptation au froid	<i>Synechococcus sp</i>
ClpB	Tolérance induite aux hautes températures	<i>Synechococcus sp</i>
ClpC	Résistance aux stress, croissance à haute température	<i>Bacillus subtilis</i>
ClpX	Résistance aux stress, croissance à haute température	<i>Bacillus subtilis</i>
ClpP	Résistance aux stress, croissance à haute température	<i>Bacillus subtilis</i>
ClpP	Résistance aux stress	<i>Streptococcus mutans</i>
ClpP	Résistance aux stress	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<b>Division, morphologie, différenciation</b>		
ClpP	Croissance	<i>Yersinia enterocolitica</i>
ClpC	Division cellulaire	<i>Bacillus subtilis</i>
ClpP	Division cellulaire	<i>Bacillus subtilis</i>
ClpP2	Croissance à basse température	<i>Bacillus thuringiensis</i>
ClpE+X	Division cellulaire	<i>Listeria monocytogenes</i>
ClpP	Division cellulaire	<i>Streptococcus mutans</i>
ClpP	Croissance	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
ClpP1	Différenciation cellulaire	<i>Streptomyces</i>
ClpX	Différenciation cellulaire à pH acide	<i>Streptomyces</i>
ClpY(Q)	Division cellulaire	<i>Escherichia coli</i>
<b>Autres</b>		
ClpAX(P)	Dégradation des protéines étiquetées (SsrA)	<i>Escherichia coli</i>
ClpAX(P)	Dégradation des protéines dénaturées	<i>Escherichia coli</i>
ClpY(Q)	Dégradation des protéines dénaturées	<i>Escherichia coli</i>
ClpP	Élimination des protéines tronquées	<i>Lactococcus Lactis</i>
ClpC,X,P	Dégradation des protéines dénaturées	<i>Bacillus subtilis</i>
ClpX,P	Dégradation des protéines étiquetées (SsrA)	<i>Bacillus subtilis</i>
ClpC,X,P	Compétence	<i>Bacillus subtilis</i>
ClpC,X,P	Sporulation	<i>Bacillus subtilis</i>
ClpP	Chimiotaxie, motilité, synthèse d'autolysines	<i>Bacillus subtilis</i>
ClpP	Induction de signal peptidases (sécrétion de protéines)	<i>Bacillus subtilis</i>
ClpP	Synthèse d'enzymes dégradatives	<i>Bacillus subtilis</i>
ClpP	Formation de biofilms	<i>Streptococcus mutans</i>
ClpP	Formation de biofilms	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

corrélation entre l'absence de ClpX ou ClpP et la stabilisation du régulateur CtrA, suggérant un lien causal direct. Ce contrôle d'un régulateur clé de la division cellulaire, dont la dégradation contribue à la transition entre les phases G1 et S du cycle de développement, expliquerait le caractère essentiel des gènes *clpX* et *clpP* de *C. crescentus* (Hung et Shapiro, 2002; Jenal et Fuchs, 1998).

Enfin, il a été montré récemment que la dégradation du régulateur PopR, qui contrôle positivement l'expression de l'opéron *clpP3-clpP4* de *Streptomyces lividans*, est lui-même dépendant des loci *clpP1-clpP2* et *clpP3-clpP4*. Cette dégradation dépend de la présence de deux résidus alanine présents à l'extrémité C-terminale du régulateur, ce qui correspond à un signal nécessaire mais non suffisant pour la dégradation des protéines étiquetées par le système SsrA, et renforce l'hypothèse d'une dégradation Clp-dépendante (Viala et coll., 2000).

## **B-Fonctions biologiques associées**

L'étude du rôle des protéines Clp a révélé deux types d'activité biochimique : une activité chaperon permettant de modifier la conformation d'une protéine et une activité de protéase permettant sa dégradation. Par ailleurs, les Clp ont une double fonctionnalité impliquant à chaque fois les deux types d'activités biochimiques : elles permettent de façon non spécifique la renaturation ou l'élimination de protéines dénaturées, ce phénomène de dénaturation étant amplifié lors de stress, et d'autre part, elles ont une activité là encore de dégradation ou de repliement mais vis-à-vis de substrats spécifiques, jouant ainsi un rôle régulateur. Cette activité spécifique semble très variable d'une espèce à l'autre puisque aujourd'hui il n'existe pas d'exemple de substrat universel des Clp, à l'exception des protéines étiquetées par le système SsrA, lequel peut être considéré davantage comme un mécanisme « de ménage ». On connaît aujourd'hui un petit nombre de ces substrats, et cette activité régulatrice spécifique, même chez *E. coli* et *B. subtilis*, est encore mal établie.

L'intérêt croissant pour les protéines de stress, particulièrement du fait de leur rôle potentiel dans la virulence de bactéries pathogènes, a permis la mise en évidence de multiples phénotypes liés à l'inactivation des *clp*. Cependant, dans la majorité des cas les substrats des Clp sont encore inconnus et le lien de cause à effet n'a pu être caractérisé (Table 5).

## 1-Rôle dans la résistance aux stress et autres fonctions cellulaires

### Chez *E. coli* et autres bactéries Gram-négatives

Bien que chez *E. coli* plusieurs gènes *clp* soient membres du régulon<sup>32</sup> et donc inductibles par de multiples stress, l'inactivation de ces gènes a peu d'effet, même à haute température, suggérant un rôle mineur dans la résistance aux stress. Il a pourtant été montré que la délétion de *clpA*, *clpX* ou *clpP* entraîne une diminution de 10 à 15 % de la dégradation des protéines anormales (Gottesman et coll., 1993; Katayama et coll., 1988) et les complexes ClpXP et dans une moindre mesure ClpAP, sont requis pour l'élimination des protéines tronquées, étiquetées par le système SsrA. De plus, les protéines Clp sont associées à différentes fonctions cellulaires, dont l'activation et la dégradation de plusieurs protéines phagiques et la stabilité de facteurs de transcription comme<sup>32</sup> ou<sup>S</sup> (Table 4). Cependant, des mutants des gènes *clpC*, *clpP*, et *clpX* se développent normalement (Gottesman et coll., 1993; Katayama et coll., 1988; Maurizi et coll., 1990). ClpY et ClpQ participent au contrôle du cycle cellulaire, mais leur action étant redondante avec la protéase Lon (voir ci-dessus), elles ne sont pas essentielles. Les mutants d'inactivation de *clpY* et *clpQ* ne présentent pour seul phénotype qu'un faible défaut de croissance aux températures supérieures à 43°C, ce qui suggère que ces gènes ont probablement là encore un rôle secondaire dans la résistance au stress (Missiakas et coll., 1996).

Par contre, ClpB est une protéine majeure de l'adaptation au stress de *E. coli*. En effet, elle présente une activité chaperon capable de solubiliser, replier et ainsi éliminer les agrégats protéiques stables, en association avec DnaK, DnaJ et GrpE au sein d'un complexe multi-chaperon (Goloubinoff et coll., 1999; Zolkiewski, 1999). Cette réactivation d'agrégats protéiques, en association avec DnaK et DnaJ, avait été précédemment démontrée pour ClpB de *Thermus thermophilus* et l'homologue eucaryote Hsp104 de *S. cerevisiae* (Glover et Lindquist, 1998; Motohashi et coll., 1999; Parsell et coll., 1994). Ceci explique probablement pourquoi cette protéine est essentielle à la survie de *E. coli*, *H. pylori* et *B. suis* à haute température (Allan et coll., 1998; Ekaza et coll., 2001; Kim et coll., 1998; Squires et coll., 1991). De plus, ClpB serait requise en condition de stress pour aider les protéines DnaK et DnaJ au repliement des protéines nouvellement synthétisées (Thomas et Baneyx, 2000). Chez *Synechococcus* sp., ClpB est requise pour l'adaptation au froid et la tolérance induite aux températures létales (Eriksson et Clarke, 1996; Porankiewicz et Clarke, 1997). Cette faculté d'adaptation induite a également été rapportée chez plusieurs eucaryotes comme *S. cerevisiae*

(Lindquist et Kim, 1996; Sanchez et Lindquist, 1990), *Arabidopsis thaliana* et le maïs (Nieto-Sotelo et coll., 2002; Queitsch et coll., 2000).

Enfin, il a été montré chez *Pseudomonas fluorescens* que le gène *clpP* est nécessaire à l'établissement du biofilm en milieu minimum (O'Toole et Kolter, 1998).

### ***B. subtilis* et autres bactéries Gram-positives**

Chez *B. subtilis*, l'inactivation de *clpX*, *clpP* ou *clpC* a des effets pléiotropes. Ceux-ci jouent un rôle clé dans la renaturation et l'élimination de protéines dénaturées et leur délétion entraîne une sensibilité accrue aux stress (Gerth et coll., 1998; Kruger et coll., 1994; Kruger et coll., 2000; Msadek et coll., 1998; Msadek et coll., 1994; Schlothauer et coll., 2003). Cette observation, qui est différente de la situation chez *E. coli*, s'explique peut-être par l'absence de la protéine ClpB, et une distribution des rôles différents entre les Clp des bactéries Gram-positives. L'expression des gènes *clpX*, *clpE*, *clpC*, et *clpP* est inductible en conditions de stress et les deux derniers pourraient contrôler leur propre expression *via* la dégradation de leur répresseur transcriptionnel CtsR (Derré et coll., 2000; Kruger et coll., 2001). De plus, le complexe ClpXP est responsable de l'élimination des protéines étiquetées par le système SsrA de façon analogue à *E. coli* (Wiegert et Schumann, 2001).

D'autre part, les protéines ClpC, ClpP et ClpX sont impliquées dans un réseau de régulation complexe et interviennent à de multiples niveaux dans le contrôle de la compétence, la sporulation, la motilité ou encore la chimiotaxie (Table 5). En effet, en plus de leur rôle précédemment décrit dans la dégradation des facteurs de compétence ou de sporulation ComK, MecA, Spx et SpoIIAB, elles semblent impliquées dans le contrôle de plusieurs facteurs sigma comme par exemple le facteur  $\sigma^D$ . Celui-ci contrôle l'expression de gènes requis pour la motilité, la chimiotaxie et la synthèse d'autolysine, et est réprimé par un facteur antisigma, FlgM, lui-même activé par ComK. ClpC et MecA activent donc indirectement le facteur  $\sigma^D$  *via* la répression de ComK, mais aussi par une autre voie indépendante de ComK mais non caractérisée (Liu et Zuber, 1998). De même, l'activation du facteur  $\sigma^H$ , lequel est requis pour l'expression de gènes de compétence (*comS*) mais aussi pour le déclenchement de la sporulation, serait dépendante de la présence de ClpX. Bien que sa fonction ne soit pas clairement établie, ClpX permettrait indirectement l'échange entre les facteurs  $\sigma^A$  et  $\sigma^H$  pour l'ARN polymérase et interagirait directement avec celle-ci pour stimuler la transcription par le complexe  $\sigma^H$ -RNAP (Liu et coll., 1999; Liu et Zuber, 2000; Nakano et coll., 2000). Enfin, un paralogue récemment identifié du gène *mecA*, *ybpH*,

participerait à la régulation de la compétence et de la sporulation, de façon ClpC-dépendante (Persuh et coll., 2002).

Enfin, certains phénotypes restent inexplicables, comme l'induction de signal peptidases entraînant l'augmentation de la sécrétion de protéines (Pummi et coll., 2002), ou l'aspect des mutants *clpX* et *clpP* qui se présentent sous forme de chaînes de cellules allongées, suggérant un défaut dans la division ou la morphologie cellulaire (Gerth et coll., 1998; Msadek et coll., 1998).

Le rôle des Clp dans la différenciation cellulaire est particulièrement étudié dans le genre *Streptomyces*. En effet, un mutant de *clpP1* présente un phénotype « bald », c'est-à-dire qu'il est incapable de réaliser un mycélium aérien (de Crecy-Lagard et coll., 1999), et un mutant de *clpX* présente le même phénotype, mais uniquement à pH acide et pouvant être complété de façon extracellulaire (Viala et Mazodier, 2003). La famille des gènes *clp* des *Streptomyces* est sans doute la plus large actuellement décrite, et ceux-ci semblent agir dans une cascade d'activation complexe [(Viala et Mazodier, 2002; Viala et coll., 2000)]. Cependant, s'ils semblent impliqués comme chez *E. coli* et *B. subtilis* dans la dégradation des protéines étiquetées par le système SsrA (Viala et Mazodier, 2002), ils ne sont ni inductibles en conditions de stress, ni requis pour la résistance aux stress.

Au contraire, ClpP de *L. lactis* est impliquée dans l'élimination de protéines tronquées produites par l'addition de puromycine et présente un défaut de croissance dès 37°C (Frees et Ingmer, 1999). Le mutant d'inactivation de *clpP* de *S. agalactiae* présente également un défaut de croissance à haute température qui semble lié à une division anormale (Nair et coll., 2003). De même, la délétion de *clpP* de *Streptococcus mutans* entraîne la formation de chaînes, suggérant un défaut de division, ainsi qu'une sensibilité aux stress, et une capacité réduite à élaborer un biofilm (Lemos et Burne, 2002).

## 2-Rôle dans la virulence

En plus du rôle joué par les Clp dans les différents processus physiologiques précédemment décrits comme la division, la compétence, la sporulation ou la résistance aux stress, un nombre croissant de données indique qu'elles participent également à la virulence de nombreux pathogènes, procaryotes à Gram-positif ou négatif et eucaryotes. Ce phénomène n'est pas caractéristique des Clp mais plutôt de l'ensemble des HSP, dont tous les membres, chaperons ou protéases, sont aujourd'hui le sujet de nombreuses études concernant leur rôle

dans l'interaction hôte/pathogène et la virulence des microorganismes. Cet intérêt est sans doute renforcé par le fait que depuis 15 ans, les protéines de choc thermique ont fait leur apparition dans l'étude de plusieurs grandes branches de la recherche biomédicale : le cancer, les maladies autoimmunes, les protéinopathies comme les maladies à prion ou certaines maladies neurodégénératives, et enfin les maladies infectieuses.

La mise en évidence d'un rôle des protéines de stress dans la virulence n'est pas *a priori* surprenant. Le processus infectieux passe par de nombreuses étapes susceptibles d'induire les mécanismes de réponse aux stress. Ainsi, la carence en fer dans l'organisme est un facteur limitant de la croissance bactérienne, et son acquisition par de multiples stratégies est directement liée au pouvoir pathogène (Brown et Holden, 2002; Ratledge et Dover, 2000). De même, la capacité de résistance au stress acide a été corrélée avec la virulence de nombreux pathogènes, particulièrement ceux présentant un développement intestinal ou pénétrant l'organisme par ingestion comme *L. monocytogenes*, *E. coli*, *V. cholerae* ou *H. pylori* [pour revues, voir (Foster, 1999; Merrell et Camilli, 2002)]. Enfin, de récents rapports montrent le rôle de plusieurs gènes de *S. typhimurium* (Testerman et coll., 2002; van der Straaten et coll., 2001), *M. tuberculosis* (Manganelli et coll., 2001), et *S. aureus* (Horsburgh et coll., 2001) à la fois dans la virulence et la résistance au stress oxydant. La superoxyde dismutase (SOD) est ainsi connue depuis des années pour sa contribution à la virulence de nombreuses bactéries (ex, *Campylobacter jejuni*, *Shigella flexneri*, *S. typhimurium*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*) en contrecarrant l'attaque oxydante des phagocytes (Lynch et Kuramitsu, 2000; Poyart et coll., 2001; Yesilkaya et coll., 2000).

Cependant, les liens établis entre les HSPs et la virulence sont indépendants de la capacité de résistance au stress thermique des microorganismes. Le premier - historiquement - est le caractère fortement immunogène des chaperons comme GroESL. Le second est la capacité suspectée, et plus rarement démontrée, de permettre spécifiquement l'expression de facteurs clés du processus infectieux. Là encore, les protéines Clp présenteraient une dualité de fonctionnement en étant impliquées simultanément dans ces deux aspects.

### **2.1-Rôle des protéines Clp dans le processus infectieux**

Ces dernières années ont vu un accroissement rapide du nombre de publications rapportant le rôle de HSP comme les protéases Lon, HtrA et Clp dans la virulence de diverses pathogènes. Dans certains cas, le rôle des Clp dans la virulence est totalement inexpliqué : soit les gènes ont été mis en évidence au cours d'une recherche systématique comme la



mutagenèse STM (Signature Tagged Mutagenesis) soit l'effet a été spécifiquement observé durant la recherche de phénotypes associés à la délétion du gène. C'est le cas par exemple pour plusieurs gènes *clp* de *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Francisella novicida*, ou encore pour les gènes *clpE* de *L. monocytogenes* et *clpB* de *Salmonella*. Dans les autres cas, l'inactivation du gène *clp* est associée à une modification de l'expression ou de l'activité d'un facteur de virulence pouvant rendre compte, au moins partiellement, du défaut de virulence observé. Enfin, il n'existe aujourd'hui que deux exemples dans lesquels la perte de virulence du mutant est uniquement liée à une sensibilité aux conditions de croissance : la sensibilité au froid du mutant *clpP1* de *Bacillus thuringiensis* et au stress acide du mutant *clpP* de *Samonella*.

### **Les gènes *clp* détectés par recherche systématique et aléatoire**

Le gène *clpX* de *S. aureus* a été identifié par STM, une méthode qui permet de sélectionner des candidats potentiellement avirulents *in vivo* au sein d'un large groupe de mutants d'insertion (Mei et coll., 1997). Cependant, ce résultat n'a pas été confirmé par des tests classiques d'infection, par exemple, dans un modèle murin et il n'existe aucune donnée sur la physiologie de ce mutant.

Cette même approche a permis chez *S. pneumoniae* l'identification de *clpE* dans un isolat clinique de type 19F, puis de *ctsR* dans un isolat de type 3 et plus récemment de *clpL* dans un isolat de type 4 (Hava et Camilli, 2002; Lau et coll., 2001; Polissi et coll., 1998). Dans le cas du gène *ctsR*, les auteurs ont émis l'hypothèse, non vérifiée, que le phénotype pourrait être dû à un effet polaire sur *clpC*, présent directement en aval en opéron avec *ctsR*. Ce résultat a été récemment contredit par une étude montrant que la délétion de *clpC* dans la souche D39 n'entraînait qu'un effet marginal sur la virulence dans un modèle murin d'infection intra-trachéale (Robertson et coll., 2002). Cependant, le séquençage récent de la souche R6 de *S. pneumoniae*, qui dérive de l'isolat D39, a révélé la présence d'un codon stop conduisant à la synthèse d'un polypeptide tronqué (Hoskins et coll., 2001). Ceci pourrait expliquer l'absence d'effet dans ce mutant *clpC* (voir aussi, Résultats II). Par ailleurs, Robertson et coll. montrent que la délétion de *clpP* entraîne une augmentation de quatre ordres de grandeur de la dose létale ( $DL_{50}$ ), mais aussi une sensibilité accrue aux stress et une croissance réduite en conditions optimales qui pourraient partiellement rendre compte de ce défaut de virulence.

Chez *Francisella novicida*, cinq loci ont été identifiés lors d'une recherche systématique de nouveaux gènes impliqués dans le développement intracellulaire. Cette bactérie à Gram-négatif est un bon modèle pour l'étude du pathogène humain *Francisella*

*tularensis*, l'agent de la tularémie, car bien qu'il soit très proche de ce dernier et hautement virulent pour la souris, il ne se transmet normalement pas à l'homme. La croissance du mutant *clpB*, dans des macrophages issus du péritoine de souris, est 100 fois inférieure à celle de la souche sauvage. Un phénotype identique a été observé dans une autre lignée cellulaire de macrophages, bien que le mutant ne présente aucune altération de la croissance en milieu de culture, suggérant un rôle spécifique de ClpB lors de la croissance intracellulaire (Gray et coll., 2002).

Chez *S. enterica* serovar Typhimurium, *clpB* est l'un des 18 gènes identifiés parmi 2500 mutants systématiquement testés pour leur aptitude à coloniser le tractus digestif du poulet. Celui-ci ne présente aucune déficience de croissance à 41°C, la température du modèle, et l'effet sur la virulence a été confirmé par un test d'ingestion sur des poussins de 1 jour, particulièrement sensibles à *Salmonella*, au cours duquel 90 % des animaux ont survécu (Turner et coll., 1998).

Enfin, il a été montré chez *L. monocytogenes* que l'inactivation de *clpE* entraînait une augmentation de 2 log de la DL<sub>50</sub>, bien que le mutant ne semble pas déficient pour la croissance, même en conditions de stress (Nair et coll., 1999).

### **Les gènes *clp* agissant spécifiquement sur un facteur de virulence**

#### ***L. monocytogenes***

Un mutant *clpP* de *L. monocytogenes* est totalement avirulent et présente *in vitro* une capacité réduite à s'échapper des phagosomes des macrophages et à se multiplier. Ces phénotypes sont proches de ceux du mutant du gène *hly* spécifiant la listériolysine O (LLO). En effet, cette dernière est responsable de l'échappement du phagosome, et joue également un rôle dans l'activation du système immunitaire. Le phénotype de ce mutant semble donc s'expliquer, du moins partiellement, par la faible activité de la LLO (Gaillot et coll., 2001; Gaillot et coll., 2000). Cette faible activité ainsi que le défaut d'immunisation par injection massive de ce mutant, suggèrent que la protéase ClpP pourrait être requise pour la maturation ou l'export de ce facteur. Cependant, la mutation entraîne également une croissance réduite en condition optimum (milieu riche à 30° C), et une sensibilité accrue aux stress qui pourraient expliquer la faible capacité de croissance intracellulaire et joueraient également un rôle important dans la perte de virulence de ce mutant.

Le rôle de ClpC dans la virulence de *L. monocytogenes* est étudié depuis plusieurs années et est sans doute l'exemple le mieux documenté. Depuis les travaux de Rouquette et

coll., on sait que ClpC est requise lors du processus infectieux pour permettre l'échappement précoce de la bactérie du compartiment phagosomal, ce qui se traduit chez un mutant *clpC* par une augmentation de la DL<sub>50</sub> de 3 log dans le modèle d'infection murin, et l'incapacité à se développer dans le foie et la rate (Rouquette et coll., 1998; Rouquette et coll., 1996). Cependant, l'effet éventuel sur l'expression ou l'activité de LLO n'a jamais été évalué. Plus récemment, les travaux de Nair et coll. ont montré que l'inactivation de *clpC* entraînait une diminution de la capacité d'adhésion et d'invasion vis-à-vis de cellules épithéliales, ainsi qu'une polymérisation réduite de l'actine pour les bactéries présentes dans le cytoplasme. Ces effets s'expliquent par une diminution de l'expression des internalines InlA et InlB ainsi que de la protéine ActA requise pour la polymérisation de l'actine, *via* un mécanisme encore inconnu, mais sans modification de l'expression de leur régulateur commun PrfA (Nair et coll., 2000b).

Enfin, l'expression du facteur de virulence SvpA, une protéine sécrétée requise également pour l'échappement du phagosome et dont l'inactivation diminue significativement la virulence, est contrôlée par ClpCP en association avec l'adaptateur MecA (Borézée et coll., 2001). L'absence de preuves biochimiques ne permet pas de conclure si ce facteur est directement une cible de cette protéase ou si les Clp jouent sur la régulation de son expression plutôt que sur sa stabilité.

### ***Yersinia enterocolitica***

ClpP de *Y. enterocolitica* est impliquée dans le contrôle de l'expression du gène *ail* (attachment invasion locus) (Pederson et coll., 1997). Ce gène code un petit antigène de surface présent uniquement chez les souches pathogènes. Bien que son rôle *in vivo* n'ait pas été démontré, il confère la capacité d'envahir des cellules cultivées *in vitro*, et protège *Yersinia* de l'activité bactéricide du sérum humain. L'inactivation de *clpP* entraîne une surexpression du gène *ail*, ce qui suggère que ClpP pourrait contrôler un régulateur transcriptionnel impliqué dans l'expression de ce locus. Cependant, l'effet de l'inactivation de *clpP* chez l'hôte n'a pas été évalué, et le taux de croissance faible observé chez ce mutant pourrait là encore diminuer significativement sa capacité de développement chez l'hôte, indépendamment de son effet sur *ail*.

Par contre, ClpB est impliquée dans l'expression du gène *inv*, un facteur de virulence requis pour l'initiation de la colonisation de l'hôte. En effet, l'expression de *inv* est altérée par l'inactivation du gène *uvrC*, mais ce phénotype peut être compensé par l'inactivation de *clpB* (Badger et coll., 2000).

### ***Leishmania***

Les *Leishmania* sont des endoparasites des mammifères capables de se développer dans le phagosome des macrophages après acquisition d'une forme cellulaire spécifique appelée le stade amastigote. Le passage à la température de l'hôte induit non seulement l'expression de nombreuses protéines de choc thermique, mais peut également chez certaines espèces induire la différenciation en forme amastigote (Krobitsch et coll., 1998) et même augmenter le pouvoir infectieux (Smejkal et coll., 1988).

Chez *L. major*, contrairement aux autres protéines HSP qui sont fortement exprimées en conditions normales et faiblement induites par le stress, ClpB n'est synthétisée qu'en condition de stress thermique à 35° C, la température de l'hôte (Hubel et coll., 1995). Dans un modèle murin d'infection, le mutant d'inactivation de *clpB* présente un retard dans l'initiation des lésions suggérant un défaut durant les phases précoces de l'invasion plutôt que durant la prolifération des formes intracellulaires pleinement différenciées. Les résultats de l'infection de macrophages *in vitro* montrent que le délai observé est effectivement dû à un défaut de différenciation du mutant du stade promastigote vers la forme amastigote (Hubel et coll., 1997).

Si le rôle de ClpB dans cette différenciation n'est pas encore connu, certains éléments de réponse pourraient venir de l'étude de *L. donovani*, chez laquelle ClpB est requise pour la prolifération de la forme amastigote (Krobitsch et Clos, 1999). De plus, un nouveau lien entre la virulence et le gène ClpB vient d'être découvert dans cette espèce. En effet, l'inactivation de *clpB* entraîne la disparition de la protéine A2, un marqueur spécifique de la forme amastigote (Krobitsch et coll., 1998). Les protéines de la famille A2 ont préalablement été montrées comme étant des facteurs de virulence absolument requis pour la survie de la forme mammifère du parasite (Zhang et Matlashewski, 1997). L'expression de ClpB, maintenue durant tout le cycle amastigote, est, comme les protéines A2 dont elle semble contrôler l'expression, indispensable à la virulence de ce pathogène *in vivo* et *in vitro*, bien que la physiologie du mutant ne semble pas affectée, même à 37° C (Clos et coll., 2001; Krobitsch et coll., 1998).

### **Les gènes *clpP* de *B. thuringiensis* et de *Salmonella***

Récemment, deux gènes homologues de *clpP* de *B. subtilis* ont été caractérisés chez *B. thuringiensis* (Fedhila et coll., 2002). Proche des pathogènes humains *Bacillus cereus* et *Bacillus anthracis*, cette bactérie sporulante est un entomopathogène fréquemment utilisé

dans le cadre de la lutte biologique. Le phénotype du mutant *clpP1* est un cas typique dans lequel la perte de virulence est directement liée à une déficience physiologique majeure plutôt qu'à la perte d'un facteur de virulence. En effet, le pouvoir pathogène de ce mutant est sévèrement atténué dans un modèle d'infection par injection dans l'hémocoèle de larves de *Bombyx mori*, un lépidoptère hautement susceptible à la souche parentale de *B. thuringiensis*. L'analyse phénotypique de ce mutant révèle que ClpP1 est requis pour la croissance à basse température. La croissance du mutant, normale à 37° C, est fortement ralentie en milieu riche à 25° C et les cellules présentent alors un aspect filamenteux, suggérant une altération dans la division cellulaire. De plus, il ne pousse pas en microaérobie à 28° C, la température des larves, dans de l'hémolymphe *in vitro*. Enfin, si le test de virulence dans le modèle *B. mori* est réalisé en incubant les larves à 37° C, alors la mortalité observée pour le mutant est identique à celle de la souche sauvage, ce qui indique que le défaut de virulence est dû au taux de croissance réduit à la température de l'hôte.

Le mutant *clpP* de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium a été détecté dès 1995 lors d'une recherche de type STM, mais n'a alors pas été caractérisé de façon approfondie (Hensel et coll., 1995). Par la suite, Webb et coll. ont confirmé que la délétion de *clpP* entraînait une augmentation de la DL<sub>50</sub> de 3 log dans un test d'infection par voie orale, ainsi que la stabilisation du facteur <sup>S</sup> (RpoS). Or, ce facteur sigma induit l'expression de nombreux gènes requis pour la résistance au stress acide, et son inactivation entraîne une chute importante de la capacité d'invasion de *Salmonella*, suggérant aux auteurs que l'effet observé dans le mutant *clpP* soit lié à <sup>S</sup> (Webb et coll., 1999). Cependant ceux-ci n'expliquent pas pourquoi la stabilisation de <sup>S</sup> dans le mutant *clpP* entraîne un phénotype non-virulent identique à l'inactivation de <sup>S</sup>. Plus récemment, il a été suggéré que <sup>S</sup> serait dégradé par la protéase ClpP après présentation par le complexe ClpX/MviA (RssB) (Moreno et coll., 2000). Ceci suggère, par analogie avec le complexe MecA/ClpCP de *B. subtilis*, que <sup>S</sup> soit titré par le complexe ClpX/MviA dans le mutant *clpP*, stabilisant celui-ci sous forme inactive. Il a d'ailleurs récemment été montré que le mutant *clpX* était largement atténué, comme le mutant *clpP*, dans sa capacité de colonisation des organes (Yamamoto et coll., 2001).

## 2.2-Effets sur l'induction des réponses de l'hôte

La présence d'anticorps spécifiquement dirigés contre ClpC de *Mycobacterium leprae* a été détectée dans le sérum de patients infectés par *M. leprae* mais aussi *M. tuberculosis* (Misra et coll., 1996). Les auteurs supposent que ClpC pourrait ainsi être requise à la fois

dans les phases précoces de l'interaction hôte /pathogène mais aussi dans le développement de l'immunité acquise. Ces hypothèses se fondent sur une abondante littérature concernant le rôle d'autres protéines de choc thermique dans l'interaction bactérie/hôte et l'induction du système immunitaire, dont il nous faut rappeler les grandes lignes.

La recherche de nouveaux vaccins contre les espèces de mycobactéries, de salmonelles et de parasites comme *Plasmodium falciparum*, a révélé à la fin des années 80 que les protéines de choc thermiques comme DnaK et GroESL font partie des antigènes majeurs de ces pathogènes (Young et coll., 1988a; Young et coll., 1988b). En effet, l'immunisation contre ces microorganismes entraîne l'apparition d'une gamme d'anticorps dont beaucoup sont dirigés contre les HSP. Ceci a poussé certains chercheurs à considérer ces protéines comme des candidats potentiels pour de nouveaux vaccins, d'autant plus que la grande conservation de ces protéines permet d'envisager une reconnaissance croisée des antigènes d'une espèce par les anticorps dirigés contre une espèce proche. Dès lors, les HSP sont devenues le sujet d'une importante littérature quant à leur rôle potentiel dans l'activation du système immunitaire inné et acquis [pour revue voir, (Zugel et Kaufmann, 1999)].

Ces protéines de stress sont en fait massivement induites durant le cycle infectieux, devenant ainsi les protéines majoritaires de la cellule. En effet, il a été montré chez plusieurs espèces dont *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Brucella abortus* ou encore *Salmonella* que les protéines GroESL et DnaK sont spécifiquement induites pendant l'infection de macrophages ou de cellules épithéliales (Buchmeier et Heffron, 1990; Gahan et coll., 2001; Lin et Ficht, 1995; Qoronfleh et coll., 1998). Ceci a rapidement conduit à l'hypothèse que lors de la lyse de bactéries dans les macrophages, ces protéines étant les plus fortement exprimées, elles sont également présentées de façon majoritaire à la surface des cellules présentatrices d'antigène (APC = antigen presenting cells) (Buchmeier et Heffron, 1990). L'abondance des HSP serait donc probablement responsable de leur immunodominance.

On peut légitimement se demander quelles sont les conséquences de cette réactivité dans le processus infectieux, puisque les cibles reconnues par ces anticorps sont des protéines cytoplasmiques. En fait, plusieurs études semblent montrer, notamment chez *H. pylori*, *Brucella abortus* et *Mycobacterium tuberculosis*, que la vaccination de souris par les homologues de GroESL ou DnaK confère effectivement une protection contre ces bactéries (Ferrero et coll., 1995; Stevens et coll., 1997). Si depuis quelques années de nombreuses publications tentent de prouver que ces protéines auraient une localisation extracellulaire ou même seraient requises pour l'adhésion des bactéries et l'interaction avec l'hôte, les résultats obtenus ne sont pas convaincants. De plus, aucune hypothèse ne permet d'expliquer la

présence extracytoplasmique putative de ces protéines qui sont dépourvues de tout signal d'export. Enfin, on peut s'interroger sur la fonctionnalité de protéines extracellulaires dont l'activité est strictement dépendante de la présence d'ATP. Il est donc probable que la présence de ces anticorps soit une conséquence indirecte de l'activation des lymphocytes B de la réponse acquise, ce qui n'implique pas que ceux-ci interviennent dans l'élimination de ces pathogènes.

Cependant, les HSP pourraient jouer un rôle dans la détection du pathogène et l'activation de la réponse acquise, laquelle joue un rôle fondamental, surtout dans l'élimination des bactéries à développement intracellulaire. En effet, l'élimination de bactéries par les cellules du système inné ou humoral [macrophages, neutrophiles et cellules NK (Natural Killer cells)], entraîne l'exposition d'antigènes complexés aux protéines du CMH (Complexe Majeur d'Histo-compatibilité) à la surface de ces cellules APC. Au cours de l'interaction cellule-cellule avec les lymphocytes, ces antigènes sont reconnus comme le non-soi, conduisant à l'induction de la réponse dite acquise. L'activation du système lymphocytaire est indispensable pour l'élimination complète des microorganismes du système, indépendamment des lymphocytes B, car elle permet la libération de cytokines par les cellules CD4 stimulant l'activation des macrophages. Les formes activées des macrophages sont les seules à pouvoir lutter efficacement contre les bactéries à développement intracellulaire facultatives ou obligatoires.

Par conséquent, les HSP pourraient indirectement activer le système inné. Cette stimulation serait d'autant plus efficace que les espèces proches semblent activer les mêmes lymphocytes, ce qui non seulement multiplierait la fréquence de réactivation du système, mais permettrait également une protection croisée vis-à-vis de différentes espèces.

La conséquence directe de ce phénomène est donc que les HSP sont probablement perçues comme un système d'alarme de la réponse immunitaire indiquant la présence d'un pathogène, et qu'elles présentent le paradoxe d'être à la fois indispensable à la survie du microorganisme et la cause de sa détection. Ceci semble parfaitement illustré par les travaux récents de Stewart et coll. qui montrent que la surexpression de DnaK chez *M. tuberculosis* lui confère un désavantage durant la phase chronique de l'infection alors que ce mutant est pleinement virulent pendant les étapes précoces de l'infection (Stewart et coll., 2001).

De façon analogue, la protéine ClpA de *Brucella suis* pourrait être impliquée dans l'activation des macrophages et permettre ainsi l'élimination de ce pathogène. En effet, alors que le mutant *clpA* présente une croissance intracellulaire normale dans des macrophages murins et humains, il présente la capacité de persister dans le foie et la rate dans un modèle

d'infection murin (Ekaza et coll., 2000). Les résultats suggèrent l'existence d'un délai pour l'établissement de la réponse inflammatoire, et d'une intensité de réponse plus faible vis-à-vis de ce mutant, alors que l'activation des macrophages et l'induction de l'immunité à médiation cellulaire sont indispensables pour l'élimination de la bactérie. Cependant, on ne peut exclure que cet effet soit la conséquence du relativement faible taux de croissance de ce mutant observé à 37 °C chez la souris et en milieu de culture. Cependant, la surexpression de ClpA semble contre-sélectionnée dans le test d'infection murin mais pas en milieu de culture ou durant les expériences *in vitro* d'infection de macrophages. Ceci suggère que la surexpression de ClpA pourrait conférer un désavantage à *B. suis* durant le processus infectieux.

En conclusion, les protéines Clp pourraient jouer un rôle à trois niveaux différents au cours de l'interaction hôte/pathogène. Premièrement, en tant que protéines de réponse aux stress, elles permettraient l'adaptation aux conditions de survie dramatiques rencontrées lors de l'infection : carences, stress oxydant, stress acide... Indépendamment, certaines d'entre elles pourraient permettre l'expression spécifique de facteurs de virulence indispensables à l'accomplissement du processus infectieux. Enfin, ces protéines fortement induites durant l'infection, pourraient, de manière analogue aux chaperons GroESL et DnaK, induire les mécanismes de défense de l'hôte.

Ceci est sans doute une des causes de la mise en place de mécanismes fins de contrôle de l'expression des gènes de stress chez les bactéries pathogènes, ceux-ci étant indispensables au développement du cycle infectieux et de leur survie chez l'hôte et paradoxalement cause de leur détection et de leur élimination.



# **RESULTATS**

## CHAPITRE I-Un nouveau mode de régulation des gènes de choc thermique chez les bactéries Gram-positives

Comme nous l'avons vu dans la première partie, les gènes de choc thermique sont groupés en quatre classes chez le modèle des bactéries à Gram-positif : *B. subtilis*. L'une regroupe les gènes sous contrôle du répresseur HrcA, dont ceux codant les chaperons moléculaires GroES, GroEL et DnaK ; la seconde est composée du régulon <sup>B</sup> et comporte plus de 200 gènes, induits par de multiples stress ainsi que par l'entrée en phase stationnaire ; la troisième regroupe les gènes *clpP*, *clpE*, et l'opéron *clpC* dont l'expression est négativement contrôlée par le régulateur CtsR. Enfin, la dernière classe correspond à tous les gènes inductibles par le choc thermique dont l'expression est indépendante de HrcA, CtsR ou <sup>B</sup> (voir Introduction-II-B).

Si des homologues de ces régulateurs se retrouvent dans de nombreux génomes de bactéries à Gram-positif, plusieurs caractéristiques laissent à penser que le modèle présenté ci-dessus n'est pas applicable à l'ensemble de ce groupe et qu'il existe de nombreuses exceptions à cette règle. D'une part, certains gènes impliqués dans le contrôle de ces régulateurs sont absents, comme les gènes spécifiant les modulateurs McsA et McsB de CtsR, ou les gènes *rsbRST*, d'autre part, certaines espèces sont dépourvues d'un régulateur comme les streptocoques qui n'ont pas le facteur sigma alternatif <sup>B</sup>.

De même, l'analyse du génome de *S. aureus* a révélé, lors de la recherche d'homologues du régulateur CtsR chez les bactéries Gram-positives, la présence d'un motif de fixation potentiel pour celui-ci en amont de l'opéron *dnaK* (Derré et coll., 1999b). Si la réponse aux stress chez cet organisme était encore largement inconnue, il avait cependant été montré qu'à l'instar de la situation chez *B. subtilis*, *S. aureus* présentait un homologue de HrcA, premier gène de l'opéron *dnaK*, qui réprime sa propre expression (Kuroda et coll., 1999).

L'objectif principal de cette thèse était, en parallèle de l'analyse phénotypique des gènes *clp* chez les pathogènes à Gram-positif (voir II), d'identifier les régulons dépendant de CtsR et HrcA chez *S. aureus*. Ceci nous a conduit à la caractérisation d'un nouveau mode de régulation impliquant ces deux régulateurs, présents chez de nombreuses bactéries Gram-positives incluant plusieurs pathogènes.

## A-Characterisation des régulons CtsR et HrcA de *S. aureus*

### 1-Analyse informatique de la séquence génomique de *S. aureus*

On savait déjà que HrcA était codé par le premier gène de l'opéron *dnaK*, lequel est composé de 5 gènes chez *S. aureus* : *hrcA* (*hrc37*), *grpE*, *dnaK*, *dnaJ*, et *orf35* (Ohta et coll., 1994). Cet opéron est inductible par la température et son expression, comme celle de l'opéron *groESL*, est augmentée dans le mutant d'inactivation de *hrcA*, phénotype pouvant être compensé par complémentation, en introduisant une copie sauvage du gène (Kuroda et coll., 1999). Par ailleurs, le motif consensus reconnu par CtsR chez *B. subtilis* avait été identifié dans le promoteur de l'opéron *dnaK* (Derré et coll., 1999b).

L'analyse de la séquence du génome de la souche de *S. aureus* NCTC-8325 d'une part, et de la souche COL d'autre part, a révélé la présence d'un gène présentant 48% d'identité et 71% de similitude avec le gène *ctsR* de *B. subtilis*. La recherche du motif dégénéré correspondant à la séquence opératrice de CtsR dans ces deux banques de séquences indique qu'il n'existe que six sites potentiels de fixation pour ce régulateur (Fig. 14). En plus de l'opéron *dnaK*, les gènes dont les régions promotrices présentent un (ou deux) motif(s) spécifient les homologues des ATPases ClpC et ClpB et de la protéase ClpP. La dernière cible est localisée en amont de l'opéron *groESL*, lequel constitue avec l'opéron *dnaK*, le régulon HrcA complet, puisque aucun autre motif CIRCE n'a été découvert durant l'analyse systématique des séquences génomiques.

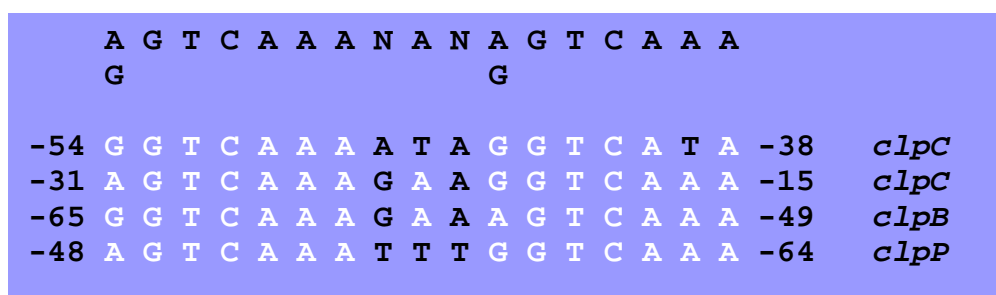
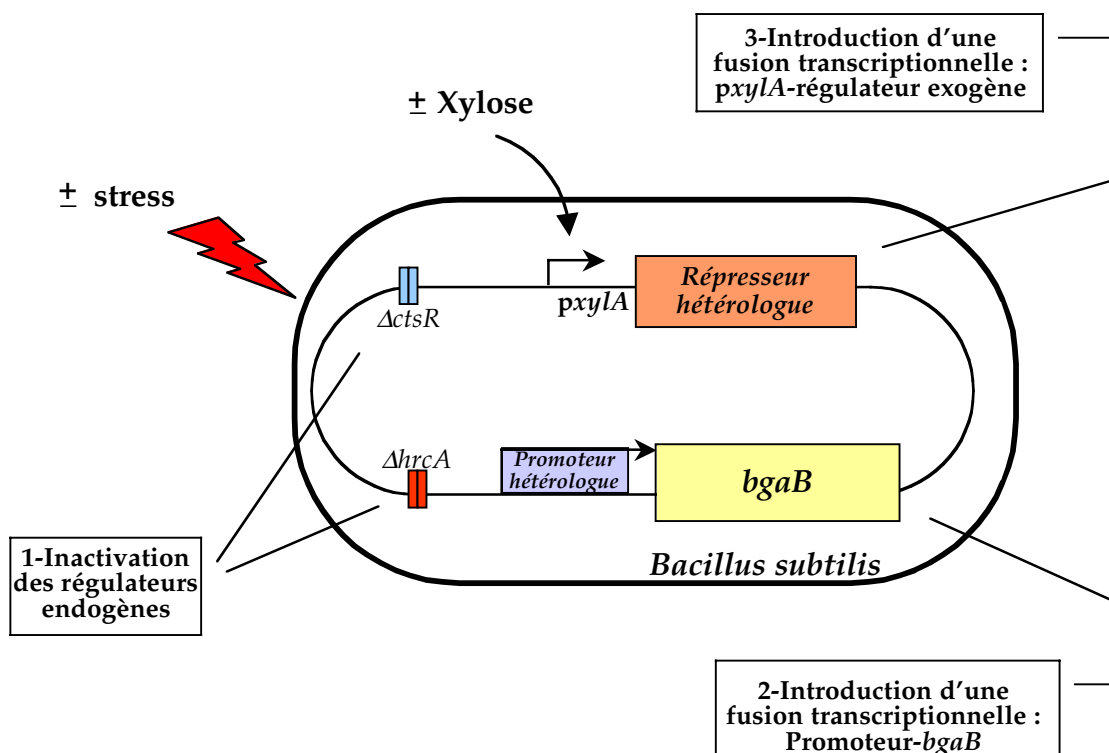


Figure 14. Alignements des motifs de liaison putatifs de CtsR mis en évidence dans le génome de *S. aureus*

### 2-Mise en évidence des régulons CtsR et HrcA

Afin de démontrer le rôle des régulateurs CtsR et HrcA dans la régulation des gènes précédemment découverts, nous avons utilisé *B. subtilis* comme hôte hétérologue. Pour cela,

nous avons introduit les gènes spécifiant les régulateurs CtsR ou HrcA sous contrôle d'un promoteur inductible par le xylose, dans des souches de *B. subtilis* préalablement inactivées pour les gènes endogènes *ctsR* et *hrcA*. Dans un deuxième temps, des fusions transcriptionnelles entre les promoteurs des gènes étudiés et *bgaB*, qui spécifie la  $\alpha$ -galactosidase thermostable de *B. stearothermophilus*, ont été introduites en simple copie dans le chromosome (Fig.15).



**Figure 15. Stratégie d'étude de la régulation des gènes de stress *in vivo* en utilisant *B. subtilis* comme hôte hétérologue**

Une fusion transcriptionnelle entre le promoteur d'intérêt et le gène rapporteur *bgaB*, est introduite dans une souche de *B. subtilis* inactivée pour le régulateur putatif homologue endogène. Le gène codant le régulateur exogène est amplifié à partir du chromosome et introduit dans la souche de *B. subtilis* sous contrôle du promoteur inductible par le xylose *pxylA*. L'expression de la fusion *bgaB* est suivie en présence (+xylose) ou absence (-xylose) de ce régulateur, et en fonction du stress.

Les tests d'activité  $\alpha$ -galactosidase réalisés à 37°C en présence de xylose montrent que l'expression de toutes les fusions entre *bgaB* et les promoteurs des gènes *clp*, est réprimée

lorsque l'expression de CtsR est induite. De même, l'expression des fusions *dnaK'-bgaB* et *groE'-bgaB* est réprimée en présence de CtsR ou de HrcA de *S. aureus*. L'expression de ces fusions est totalement déréprimée lorsque la croissance est effectuée à 48°C, indiquant que la répression est thermosensible (Fig. 16).

<u>Promoteur</u>	<u>Facteur de répression</u>		<u>Induction</u> à 46°C
	CtsR	HrcA	
<i>pclpB</i>	32	-	+
<i>pclpC</i>	33	-	+
<i>pclpP</i>	4	-	+
<i>pdnaK</i>	48	3.2	+
<i>pgroESL</i>	24	3.5	+

**Figure 16. CtsR de *S. aureus* réprime l'expression de *clpB*, *clpP*, *clpC*, *dnaK* et *groESL* dans l'hôte hétérologue *B. subtilis*, tandis que HrcA réprime *dnaK* et *groESL***

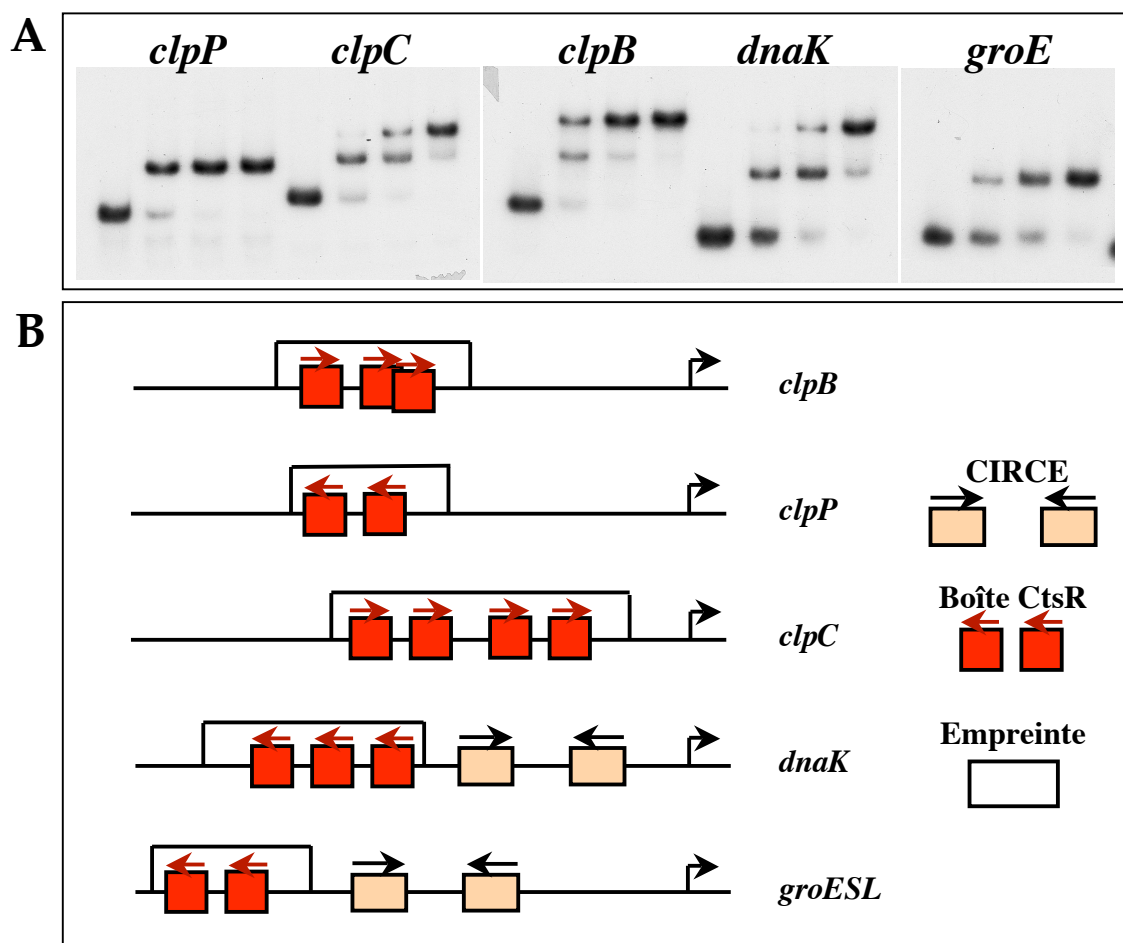
### 3-Etude *in vitro* des interactions répresseurs/opérateurs

Afin de compléter les résultats *in vivo* obtenus par notre approche génétique, une approche biochimique a été entreprise afin de mettre en évidence une interaction directe entre chacun des régulateurs et leurs séquences d'ADN cibles.

Pour cela, les protéines recombinantes CtsR et HrcA de *S. aureus* ont été surproduites chez *E. coli* grâce au vecteur d'expression modifié pET28/16, puis purifiées grâce à leur étiquette poly-histidine sur une colonne d'agarose NTA-nickel. Dans le cas de la protéine HrcA, le caractère fortement insoluble de la protéine a nécessité sa purification sous forme dénaturée en concentration saturante d'urée, puis sa renaturation par dialyse en présence de poly-(dI-dC), un analogue d'ADN. Grâce à cette méthode, adaptée de la technique de Watanabe et coll. (Watanabe et coll., 2001), nous avons pu obtenir le régulateur sous forme active et soluble, permettant les expériences *in vitro* décrites ci-après en absence d'agents dénaturants ou de protéines chaperons.

Ces protéines nous ont permis de réaliser des tests de retard de migration de fragments d'ADN sur gel de polyacrylamide (Fig. 17). Les sondes d'ADN radiomarquées, correspondant aux régions promotrices des opérons *dnaK* et *groE*, ont été incubées avec des concentrations croissantes de chacun des régulateurs purifiés et en présence d'un excès d'ADN compétiteur non spécifique. Nous avons ainsi montré que CtsR était capable de se fixer spécifiquement aux régions promotrices des gènes *clpB*, *clpC*, *clpP*, *dnaK* et *groESL*.

Mais aussi que HrcA, en absence de chaperon ou de composé dénaturant, était capable de se fixer et de déplacer totalement les fragments correspondant aux régions promotrices de *dnaK* et *groESL*. Par contre, une expérience contrôle a confirmé que le fragment correspondant au promoteur du gène *clpB*, qui est dépourvu de la séquence CIRCE, n'était pas retardé par HrcA. Enfin, les expériences d'empreintes à la DNase I nous ont permis de caractériser précisément le domaine spécifique d'interaction entre ces régulateurs et les séquences d'ADN (Fig. 17). Ces résultats montrent que le régulon CtsR est composé des gènes *clpB*, *clpP* et des opérons *clpC*, *dnaK* et *groESL*, ce qui implique que le régulon HrcA est totalement inclus dans le régulon CtsR, la synthèse du régulateur HrcA étant elle-même réprimée par CtsR.



**Figure 17. CtsR de *S. aureus* se fixe spécifiquement sur les séquences promotrices des gènes *clpB*, *clpP*, *clpC*, *dnaK* et *groESL***

La fixation de CtsR aux régions promotrices des gènes *clpB*, *clpP*, *clpC*, *dnaK* et *groESL* est testée par retard de migration sur gel de polyacrylamide (A). Dans cette expérience, CtsR se fixe spécifiquement aux fragments radiomarqués, formant deux complexes avec les promoteurs de *clpB*, *clpC* et *dnaK* et un avec *clpP* et *groESL*. Des expériences d'empreintes à la DNase I réalisées sur les mêmes fragments (schématisées en B), ont révélé la localisation précise des sites de fixation ainsi que leur étendue.

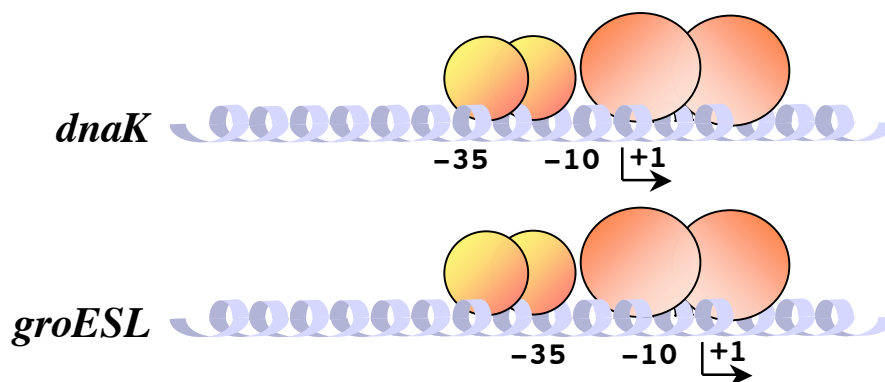
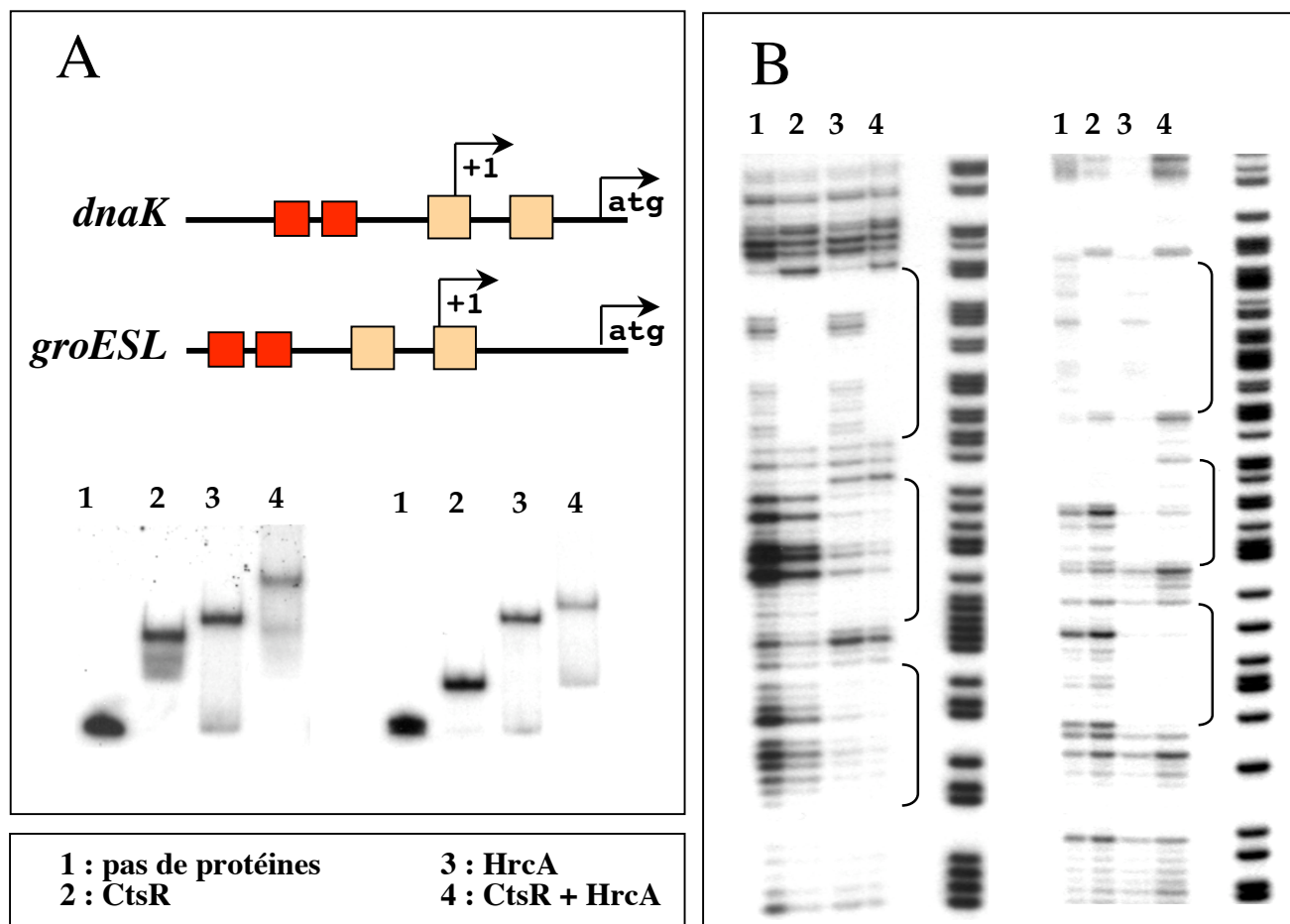
#### **4-La fonction des répresseurs CtsR et HrcA n'est pas redondante chez *S. aureus***

Les expériences *in vitro* ont confirmé que les deux régulateurs se fixent spécifiquement sur les promoteurs des gènes *dnaK* et *groESL*. Ils confirment donc les résultats obtenus chez *B. subtilis* indiquant que CtsR et HrcA ont la capacité de réprimer les deux opérons. Nous avons voulu savoir si les deux régulateurs pouvaient se fixer simultanément, et quelle était la contribution de chacun de ces régulateurs dans le contrôle de l'expression de ces opérons.

Pour répondre à la première question, des expériences *in vitro* de retard de migration sur gel et d'empreintes à la DNase I ont été réalisées en incubant les sondes radiomarquées avec les deux régulateurs simultanément. Nous avons alors observé la formation de complexes ternaire ADN/CtsR/HrcA, indiquant que ces deux protéines peuvent se fixer simultanément sur ces promoteurs (Fig. 18). L'incubation avec des concentrations variables de chacun des régulateurs n'a révélé aucune coopération dans leur fixation, la formation de chacun des complexes ADN/régulateur se faisant de façon indépendante de la seconde protéine.

Dans ce cas, on pouvait imaginer soit que la fixation de chacun des régulateurs était nécessaire et suffisante pour éteindre totalement l'expression de ces opérons et donc que leurs effets étaient redondants, soit que les effets étaient cumulatifs. Dans ce but, trois mutants d'inactivation ont été construits : un pour *ctsR*, un pour *hrcA* et le double mutant. L'expression de l'opéron *groESL* a alors été comparée *in vivo* chez *S. aureus*, par quantification des transcrits dans des expériences d'extensions d'amorce, entre la souche sauvage RN4220 et les trois souches mutantes. Ces expériences ont révélé que l'inactivation de chaque régulateur ne lève que partiellement la répression de cet opéron à basse température, d'un facteur 3 environ, alors que la perte des deux régulateurs entraîne une induction d'un facteur 20, correspondant à l'expression de la souche sauvage en condition de stress thermique à 48 °C. Ceci indique que chaque répresseur a la capacité d'agir indépendamment de l'autre et de réprimer en partie l'expression des opérons *dnaK* et *groESL*.

La double régulation de ces opérons suggère que leur expression soit soumise à un contrôle fin permettant plusieurs niveaux d'induction, afin d'adapter au mieux l'expression en fonction du stress, ou de limiter l'expression de ces gènes. Cependant, les différentes conditions de stress testées jusqu'à présent n'ont pas permis de mettre en évidence une spécificité stress/régulateur, puisque l'expression des régulateurs CtsR et HrcA semblent tous deux répondre à l'accroissement de température, à l'éthanol et au SDS, et pas au stress salin, alcalin ou acide.



**Figure 18. CtsR et HrcA de *S. aureus* se fixe simultanément sur les séquences promotrices des opérons *dnaK* et *groESL***

Dans les expériences de retard de migration sur gel, chacune des protéines CtsR et HrcA purifiées de *S. aureus* se fixe spécifiquement et indépendamment sur les promoteurs de *dnaK* et *groESL* (A), et un retard plus important est obtenu lorsque les deux protéines sont co-incubées avec le fragment d'ADN. Dans les expériences d'empreintes à la DNaseI (B), la zone de protection due à CtsR recouvre la séquence -35 du promoteur ainsi que son motif de reconnaissance, tandis que HrcA protège deux régions recouvrant l'élément CIRCE et le site de démarrage de la transcription.

Ces résultats regroupent des données non publiées ainsi que les travaux parus dans l'article situé en annexe n°1 : Chastanet *et al.* Mol. Micro., (2003) 47(4), 1061-1073.



## B- *S. pneumoniae* et *L. monocytogenes* possèdent-ils des régulons CtsR et HrcA partiellement chevauchants ?

### 1-Etude du régulon CtsR de *S. pneumoniae*

Au début de cette thèse, dans le cadre de notre étude sur les gènes *clp* de *S. pneumoniae*, trois gènes *clp* ont pu être identifiés par analyse de la séquence génomique, alors partielle de la souche TIGR4 (Cf. II). L'étude de la séquence des régions promotrices de ces gènes homologues de *clpE*, *clpC* et *clpP* de *B. subtilis*, a révélé la présence de motifs bien conservés pour la fixation du régulateur CtsR. Le gène spécifiant celui-ci avait été préalablement identifié directement en amont du gène *clpC* (Derré et coll., 1999b). La recherche systématique du site opérateur de CtsR a révélé une seule autre cible en amont de l'opéron *groESL*.

Afin de caractériser le régulon CtsR, nous avons tout d'abord démontré la répression des fusions transcriptionnelles *clpC'-bgaB*, *clpP'-bgaB*, *clpE'-bgaB* et *groE'-bgaB*, par CtsR de *S. pneumoniae*, dans l'hôte hétérologue *B. subtilis*. Puis, la purification du régulateur nous a permis de montrer l'interaction directe entre celui-ci et les régions promotrices de ces gènes. Enfin, la comparaison chez *S. pneumoniae* de l'expression de ces cinq gènes et opérons par extensions d'amorces entre une souche sauvage et une souche inactivée pour *ctsR*, a confirmé le rôle de ce régulateur dans le contrôle de leur expression (Fig. 19).

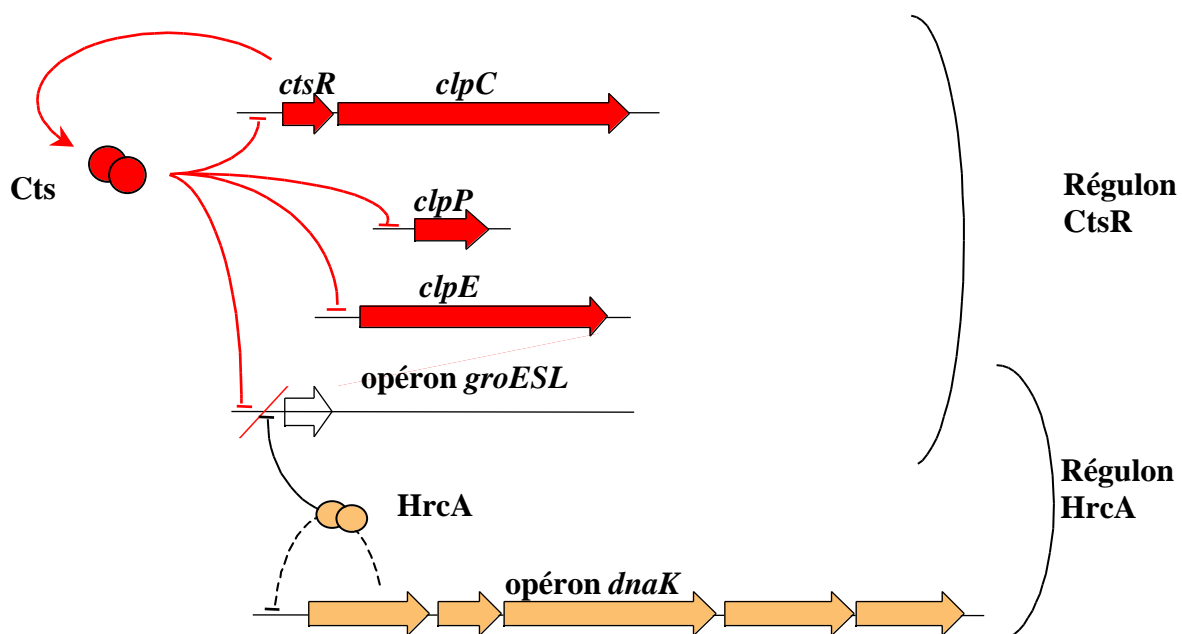


Figure 19. Les régulons CtsR et HrcA de *S. pneumoniae*

Les publications des séquences complètes des génomes de la souche R6 et de la souche TIGR4 ont plus récemment révélé un ultime gène potentiellement membre de ce régulon (Hoskins et coll., 2001; Tettelin et coll., 2001). En effet, ce gène qui présente 54 % d'identité avec le gène *clpL* de *L. lactis*, est précédé d'une région promotrice relativement étendue dans laquelle nous avons pu identifier trois sites opérateurs pour CtsR.

### **2-L'opéron *groESL* est doublement réprimé chez *S. pneumoniae***

Alors que l'opéron *groESL* est un membre du régulon CtsR, l'analyse détaillée de la région promotrice de l'opéron *dnaK* ne révèle par contre aucun motif de reconnaissance pour CtsR. Cependant, *groESL* et *dnaK* présentent respectivement un et deux motifs CIRCE, et des expériences *in vitro* de retard de migration sur gel ont montré que des extraits bruts de *E. coli* surexprimant HrcA de *S. pneumoniae* pouvaient retarder la migration de sondes correspondant aux régions promotrices de ces opérons (Kim et coll., 2001a). Ceci suggère que HrcA pourrait réprimer l'expression de ces deux opérons, et donc que seul l'opéron *groESL* serait soumis à la double régulation par CtsR et HrcA. Cette situation est donc intermédiaire entre celle de *B. subtilis* où les régulons CtsR et HrcA sont totalement indépendants et celle de *S. aureus* où ils sont totalement imbriqués.

### **3-Les rôles de CtsR et HrcA dans le contrôle de *dnaK* chez *L. monocytogenes***

Chez *L. monocytogenes*, le régulateur CtsR a été caractérisé par Nair et coll., et de façon analogue à la situation chez *B. subtilis*, il a été montré que les gènes *clpE*, *clpP* ainsi que l'opéron *clpC* sont réprimés par celui-ci et inductibles par le stress (Nair et coll., 2000a). L'analyse du génome complet de la souche EGD-e a révélé 3 nouvelles cibles potentielles pour ce régulateur, en amont des gènes *clpB*, *clpP2* et de l'opéron *dnaK* (Glaser et coll., 2001). Ce dernier présente également le motif hautement conservé CIRCE, suggérant une double régulation par HrcA et CtsR. Par contre, à l'inverse de la situation chez *S. pneumoniae*, l'opéron *groESL* ne présente que le motif CIRCE, suggérant une régulation indépendante de CtsR.

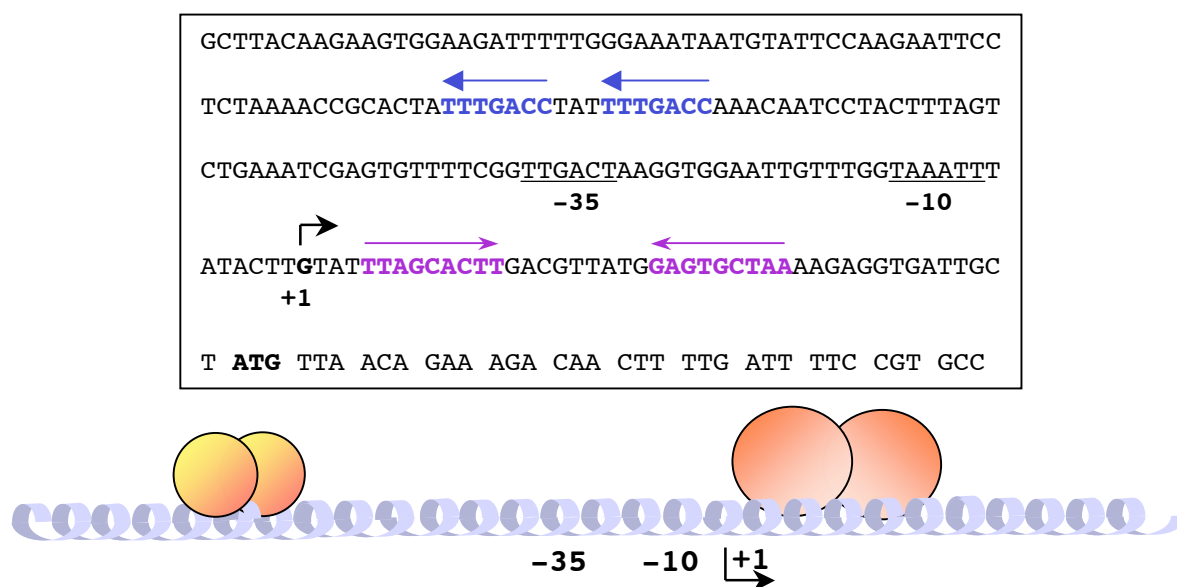
Nous avons entrepris la caractérisation de la régulation de l'opéron *dnaK* de *L. monocytogenes* en utilisant les approches *in vitro* et *in vivo* précédemment décrites pour l'étude de *S. aureus*. Chez *B. subtilis*, l'expression d'une fusion *dnaK-bgaB* est efficacement réprimée lorsque l'on induit l'expression du gène *hrcA* de *L. monocytogenes*, suggérant que celui-ci participe à la répression de l'opéron. Par contre, la présence de CtsR n'entraîne pas

d'effet significatif sur son expression, bien que les expériences *in vitro* montrent une fixation efficace de la protéine CtsR purifiée de *Listeria* sur ce promoteur. La détermination du site de démarrage de la transcription de *dnaK* a révélé qu'il se trouvait à 75 pb en aval du motif de reconnaissance de CtsR, ce qui explique sans doute pourquoi la répression n'a pas lieu (Fig. 20).

Il est difficile de savoir si ce motif joue effectivement un rôle *in vivo*, mais nos résultats semblent plutôt montrer le contraire, malgré l'excellente conservation de ce motif. Il est possible que ce motif soit un élément cryptique qu'un évènement génétique récent ait rendu obsolète, ce qui explique que la séquence ait pu être conservée.

Cet exemple est intéressant car c'est l'unique cas connu où seul l'opéron *dnaK* présente simultanément les deux motifs de régulation, et parce qu'il démontre que la présence d'un opérateur potentiel dans la séquence promotrice d'un gène n'est pas automatiquement preuve de sa fonction dans la régulation de ce gène.

Ces résultats regroupent des données non publiées ainsi que les travaux parus dans l'article situé en annexe n°2 : Chastanet *et al.*, J. Bacteriol., (2001) 183(24), 7295-7307.



**Figure 20. Structure du promoteur de l'opéron *dnaK* de *L. monocytogenes***

L'opérateur CtsR (en bleu) est situé à 75 pb en amont du site de démarrage de la transcription (+1). Le motif CIRCE reconnu par HrcA est indiqué en violet.

## **C-*clpP* de *S. salivarius* est un nouveau membre de la classe des gènes de stress sous le double contrôle de CtsR et HrcA**

Le séquençage des régions encadrant le locus *fff* de *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 a révélé la présence d'un gène hautement similaire à *clpP* de *E. coli* (Giffard et coll., 1993). L'analyse de la séquence promotrice de ce gène a montré qu'il existait, comme chez *B. subtilis* ou *L. monocytogenes*, un motif de reconnaissance parfaitement conservé pour CtsR, mais aussi un motif CIRCE atypique. La présence de ce motif était surprenante à double titre : d'une part, parce qu'il n'existe aucun exemple de gène *clp* contrôlé par HrcA, et d'autre part, parce que les deux séquences répétées inversées de ce palindrome ne sont séparées que par 8 pb au lieu des 9 trouvées sans aucune exception dans les 70 autres motifs CIRCE répertoriés à ce jour. Il était donc possible que, de façon analogue à la situation de l'opéron *dnaK* de *L. monocytogenes*, cet IR ne soit qu'une séquence cryptique.

La séquence génomique de *S. salivarius* n'étant pas disponible, nous avons décidé de caractériser la régulation de ce gène par des approches *in vitro* et *in vivo*, mais en utilisant les régulateurs de *B. subtilis*. Nous avons ainsi montré que CtsR de *B. subtilis* se fixe très efficacement *in vitro* à la séquence promotrice de *clpP*, en amont du site de démarrage de la transcription, masquant ainsi la séquence putative correspondant au motif -35 du promoteur. De plus, chez *B. subtilis*, la fusion *clpP'*-*bgaB* est réprimée 16 fois en présence de CtsR et 2 fois en présence de HrcA, indiquant la double régulation de ce gène *in vivo*. Par ailleurs, le séquençage de ce promoteur lors des étapes préliminaires de clonage a révélé quelques différences entre la séquence publiée de la souche 25975 et celle de la souche 9758 que nous avons utilisée. En particulier, nous avons noté la présence d'un espacement canonique de 9 pb entre les deux séquences répétées inversées composant le motif CIRCE.

Ceci constitue donc le premier exemple d'un gène *clp* sous contrôle de HrcA, et sous le double contrôle décrit précédemment pour les opérons *dnaK* et *groESL* de *S. aureus*. L'effet répresseur relativement faible de HrcA par rapport à CtsR tient certainement à deux causes. D'une part, la répression par HrcA pourrait être moins efficace dans le système reconstitué chez *B. subtilis* qu'elle ne l'est chez *S. salivarius*. En effet, nous avons pu observer dans le cas de *S. aureus*, que CtsR et HrcA réprimaient chacun d'un facteur 3 l'expression de *groESL*, alors que dans le système reconstitué chez *B. subtilis*, CtsR réprimait beaucoup plus efficacement la fusion *groE'*-*bgaB* que HrcA. D'autre part, l'éloignement du motif CIRCE par rapport au site supposé du démarrage de la transcription (17 pb entre le motif CIRCE et la séquence putative -35 du promoteur), diminue probablement l'efficacité de la répression par

**Table 6 Le régulateur CtsR est largement répandu  
chez les bactéries Gram-positives**

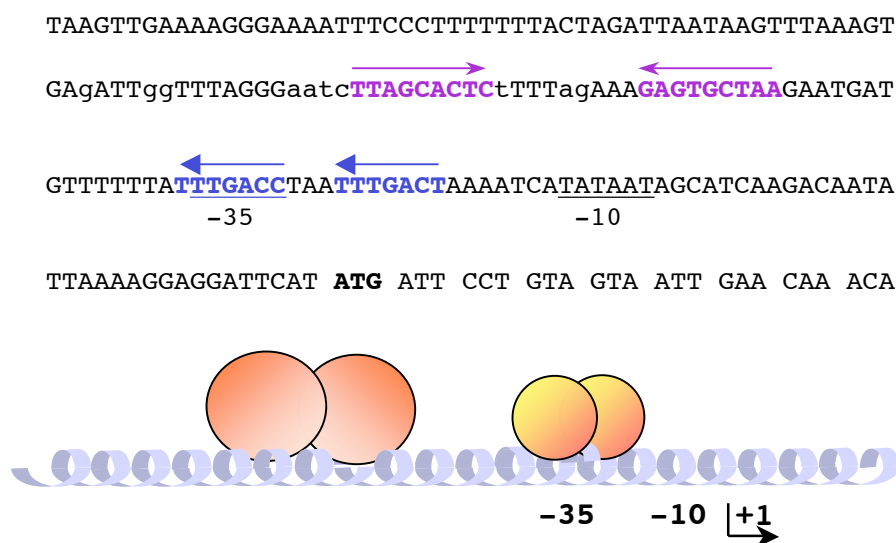
Espèces	Homologue	opérateur putatif					
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>ctsR</i>	AGTCAA GAT AGTCAA		<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	<i>ctsR-(clpC)</i>	AGTCAA GAT AGTCAA	
	<i>clpB</i>	GGTCAA GAA AGTCAA			<i>clpP</i>	TTTGACC TTT ATTGACC	
	<i>clpP1</i>	TTTGACC TTT ATTGACC	R		<i>clpE</i>	AGTCAA ATA GGTGAGA	
<i>Bacillus cereus</i>	<i>clpB</i>	GGTCAA GAA AGTCAA		"	AGTCAA GAT AGTCAA		
	<i>clpP</i>	TTTGACC TTT ATTGACC	R	<i>Oenococcus oeni</i>	<i>hsp18</i>	TTTGACC TTT CTTGACT	R
<i>Bacillus halodurans</i>	<i>ctsR-(clpC)</i>	GGTCAA GAT AGTCAA		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>ctsR-(clpC)</i>	AGTCAA GAA GGTCAA	
	<i>clpE</i>	AGTCAA GAT AGTCAA			<i>clpB</i>	GGTCAA GAA AGTCAA	
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>clpP</i>	TTTGACC TTC TTTGACC	R	<i>clpP</i>	TTTGACC AAA TTTGACT	R	
	<i>clpB</i>	GGTCAA GAA GGTCAA		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>ctsR-(clpC)</i>	GGTCAA GAT GGTGATA	
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>ctsR-(clpC)</i>	GGTCAA TAT AGTCAA			"	AGTCAA GAA GGTCAA	
	<i>ctsR-(clpC)</i>	AGTCAA TAT AGTCAA		<i>clpP</i>	TTTGACC ATT TTTGACT	R	
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>clpP</i>	TTTGACC TTT ATTGACC	R	<i>clpB</i>	GGTCAA GAA AGTCAA		
	<i>clpE</i>	TTTGACC TTC TTTGACT	R	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>clpE</i>	AGTCAA TAT AGTCAA	
	"	TTTGACT ATC TTTGACC	R		<i>clpL</i>	ATTGACC TTT ACTGACT	R
	"	TCTGACT ATC TTTGACT	R	<i>clpP</i>	GGTCAAC AAA GGTCAA		
<i>Carboxydotherrmus hydrogenoformans</i>	<i>clpP1</i>	TTTGACC TTT ATTGACC	R	<i>groESL</i>	TTTGACT ATA ACTGACT	R	
	<i>seq IS</i>	GGTCAA AAA GGTCAAC		<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>groESL</i>	CTTGACT ATT TCTGACC	R
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>ctsR-(clpC)</i>	AGTCAA CAA AGTCAGA			<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>groESL</i>	CTTGACT ATT TCTGACC
	<i>hsp18</i>	TTTGACT TTC TTTGACT	R	<i>Streptococcus equi</i>	<i>ctsR-(clpC)</i>	AGTCAGT TTT AGTCAA	
<i>Clostridium botulinum</i>	<i>ctsR-(clpC)</i>	AGTCAA GAA AGACAAA		<i>clpL</i>	AGTCAGT TTT AGTCAA		
<i>Clostridium difficile</i>	<i>ctsR-(clpC)</i>	AGTCAA GAA AGTCAA		<i>groESL</i>	CTTGACT ATT TTTGACC	R	
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>ctsR-(clpC)</i>	AGTCAA GAA AGTCAA		<i>groESL</i>	CTTGACT ATT TCTGACC	R	
<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>clpB</i>	TTTGACC TTT ACTGACC		<i>Streptococcus mutans</i>	<i>ctsR-(clpC)</i>	TTTGACT ATA ACTGACC	R
	<i>ctsR-(clpC)</i>	GGTCAA GAA AGTCAA		<i>clpE</i>	GGTCAAT AAT GGTCAA		
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>ctsR-(clpC)</i>	GGTCAA GAA AGTCAA		<i>clpP</i>	GGTCAA AAA GGTCAA		
	<i>clpB</i>	ATTGACC TTT ACTGACC		<i>groESL</i>	GGTCAA AAT AGTCAAG		
	<i>clpP</i>	GTTGACC TTT ATTGACC		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>ctsR-(clpC)</i>	CTTGACC TTG TTTGACT	R
<i>clpE</i>	GGTCAA AAT GGTCAAG		<i>clpL</i>		GGTCAGT TAA AGTCAA		
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>clpP</i>	TTTGACC TTT TTTGACC	R	"	GGTCAA GAT AGTCAAT		
	<i>clpB</i>	TTTGACC AAA ATTGACC	R	"	CTTGACC TTT TCTGACC	R	
<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>clpP</i>	TTTGACT ATC TTTGACC	R	<i>clpP</i>	TTTGACC TTT TTTGACC	R	
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>clpE</i>	GGTCAA AAT AGTCAA		<i>clpE</i>	GGTCAA AAT AGTCAA		
	<i>ctsR-(clpC)</i>	AGTCAGT AAT AGTCAA		<i>groESL</i>	GGTCAGA AAT AGTCAAG		
<i>Listeria innocua</i>	<i>clpE</i>	GGTCAA TAT GGTCAA		<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>ctsR-(clpC)</i>	AGTCAGT TTT AGTCAA	
	<i>clpP</i>	GGTCAA AAA GGTCAA			<i>clpP</i>	TTTGACC TTT ATTGACC	R
	<i>clpB</i>	GGTCAGT AAT GGTCAA		<i>clpL</i>	GGTCAGT AAA GGTCAA		
	<i>groESL</i>	CTTGACT AAA TCTGACC	R	<i>clpE</i>	TTTGACC ATT TTTGACT	R	
	<i>ctsR-(clpC)</i>	AGTCAA AAT AGTCAA		<i>groESL</i>	GGTCAA AAT AGTCAAG		
	<i>clpE</i>	TTTGACT ATC TTTGACC	R	<i>groESL</i>	CTTGACT ATT TCTGACC	R	
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>clpB</i>	TCTGACC TTT TTTGACC	R	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>groESL</i>	AGTCAGT TAT AGTCAA	
	<i>clpP1</i>	TTTGACC TAA TTTGACC	R		<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>ctsR-(clpC)</i>	TTTGACC TTT TTTGACC
	<i>clpP2</i>	TTTGACC ATT TTCGACC	R	<i>clpE</i>	TTTGACC TTT TTTGACC	R	
	<i>hrcA-(dnaK)</i>	GGTCAA AAA GGTCAA		<i>clpL</i>	GGTCAA TAA GATCATA		
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>ctsR-(clpC)</i>	AGTCAA AAT AGTCAA		"	GGTCAA AAA AGTCAA		
	<i>clpE</i>	TTTGACT ATC TTTGACC	R	"	ATTGACC AAT ACTGACC	R	
	<i>clpB</i>	TCTGACC TTT TTTGACC	R	<i>clpP</i>	TTTGACC TAA TTTGACT	R	
	<i>clpP1</i>	TTTGACC TAG TTTGACC	R	<i>groESL</i>	CTTGACT ATT TTTGACT	R	
	<i>clpP2</i>	TTTGACC ATT TTCGACC	R	<i>hsp16.4</i>	AGTCAA AAA GGTGAGT		
<i>hrcA-(dnaK)</i>	TTTGACC TAT TTTGACC	R	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	<i>groESL</i>	ACTGACT TTT TTTGACT	R	
				<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	<i>ctsR-(clpC)</i>	TTTGACT TTC TTTGACT	R

R = la séquence est complémentaire inverse du consensus

HrcA, lequel pourrait jouer le rôle d'un modulateur de l'expression de *clpP* chez *S. salivarius* (Fig. 21).

Enfin, ces résultats ont été récemment renforcés par l'analyse de la séquence de *S. salivarius* sous-espèce *thermophilus*, dans laquelle nous avons trouvé les homologues des gènes spécifiant les régulateurs CtsR et HrcA ainsi que la présence en tandem des motifs consensus pour ces régulateurs en amont du gène *clpP*, mais aussi de l'opéron *groESL*.

Ces résultats correspondent aux travaux parus dans l'article situé en annexe n°3 : Chastanet *et al.*, J. Bacteriol., (2003) 185(2), 683-687.



**Figure 21. *clpP* de *S. salivarius* est réprimé par CtsR et HrcA**

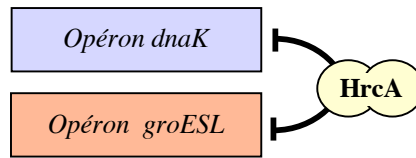
L'opérateur CtsR (en bleu) chevauche le motif -35 putatif du promoteur. Le motif palindromique CIRCE est indiqué en violet.

## D-La double régulation par CtsR et HrcA est largement répandue chez les bactéries à Gram-positif

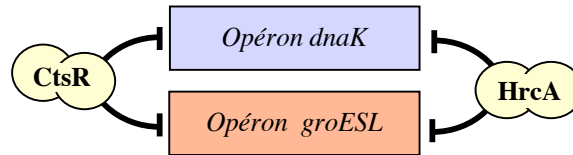
Nous avons effectué une analyse comparative des séquences génomiques disponibles en Mars 2003 afin d'évaluer l'étendue de la présence des régulateurs CtsR et HrcA d'une part, et celle de la double régulation des gènes de stress par ces deux régulateurs, d'autre part.

Cette analyse révèle la présence d'orthologues de *ctsR* dans chacun des 14 génomes de bactéries Gram-positives à faible GC % entièrement séquencés (Firmicutes), à l'exception des mycoplasmes, ainsi que dans 13 génomes partiellement séquencés. La présence du régulateur est également suspectée dans 6 autres espèces du fait de la détection de motifs de liaison à l'ADN de CtsR, toujours retrouvés en association avec des gènes probables de choc

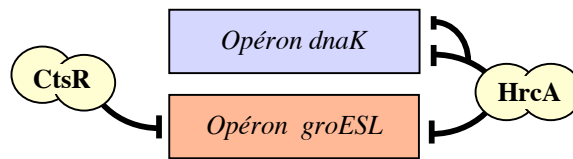
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i> <i>anthracis</i> <i>stearotherophilus</i>
<i>Clostridium</i>	<i>halodurans</i> <i>acetobutylicum</i> <i>difficile</i>
<i>Listeria</i>	<i>perfringens</i> <i>innocua</i> <i>monocytogenes</i>



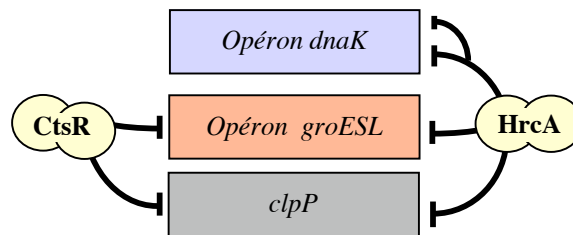
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>epidermidis</i>
--



<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>mutans</i> <i>pneumoniae</i> <i>pyogenes</i>
<i>Lactococcus lactis</i>



<i>Streptococcus salivarius</i>
---------------------------------



**Figure 22. La double régulation CtsR/HrcA est largement répandue chez les bactéries Gram-positives**

thermique. CtsR est donc un élément de la réponse au choc thermique extrêmement bien conservé au sein des bactéries Gram-positives à bas GC % (voir Table 6).

D'autre part, une recherche dans les banques de données (février 2003) indique la présence de CIRCE dans 190 promoteurs et près de 140 espèces bactériennes à Gram-positif et négatif. La présence du motif CIRCE ou du gène *hrcA* dans la plupart des génomes bactériens, fait de HrcA un régulateur de choc thermique bactérien quasi universel (voir Annexe 5). De plus, cette analyse révèle que si celui-ci est généralement trouvé en association avec les opérons *groESL* et *dnaK*, d'autres gènes de choc thermique comme *htpG*, *lon*, *tig*, *hsp20*, *clpL*, *clpB*, *clpP* ou encore *rpoH* pourraient également être réprimés par HrcA.

Enfin, cette analyse nous a permis de prédire l'existence dans de nombreuses bactéries à Gram-positif de situations de recouvrement entre les régulons CtsR et HrcA, que l'on peut grouper en trois classes. En effet, chez *B. subtilis* et les espèces les plus proches comme *B. anthracis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *B. halodurans*, *Clostridium acetobutylicum*, *C. difficile* et *C. perfringens*, les régulons sont totalement dissociés (Fig. 22), alors que chez les staphylocoques comme *S. aureus* ou *Staphylococcus epidermidis*, le régulon HrcA est entièrement inclus dans le régulon CtsR. Par contre, chez les streptocoques comme *S. pneumoniae*, *S. salivarius* sp *thermophilus*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. mutans*, et chez *L. lactis*, les régulons se recouvrent partiellement puisque seul l'opéron *groESL* présente, et de façon systématique, un arrangement en tandem des deux sites opérateurs pour CtsR et HrcA, indiquant probablement une double régulation. Il est intéressant de noter que si les opérons *dnaK* de ces bactéries sont dépourvus de motif de reconnaissance pour CtsR, ils présentent en revanche deux sites opérateurs CIRCE en tandem, peut-être pour compenser l'absence de la double régulation. Enfin, en marge de ces trois groupes existent des exemples sporadiques de gènes doublement contrôlés comme *clpP* de *S. salivarius* et peut-être *dnaK* de *L. monocytogenes*.



## CHAPITRE II-Analyse fonctionnelle des gènes *clp* chez les bactéries pathogènes à Gram-positif

### A-Le rôle des gènes *clp* dans la résistance aux stress, la virulence et le développement de la compétence naturelle chez *S. pneumoniae*

Les gènes *clp* sont impliqués dans divers processus physiologiques, parfois différents d'une espèce à l'autre, mais fréquemment caractérisés pour leur rôle dans la résistance aux stress et plus récemment la virulence. Chez *S. pneumoniae*, seul le gène *clpE* avait été identifié lors d'une recherche par STM de gènes impliqués dans la virulence (Polissi et coll., 1998). Nous avons donc entrepris une étude systématique des gènes *clp* de *S. pneumoniae*, ce qui nous a conduit à une collaboration avec d'une part, le groupe de J.-P. Claverys à Toulouse dans le cadre de l'étude de la compétence, et d'autre part, avec le groupe de E. Azoulay-Dupuis à Paris, pour l'étude du rôle des gènes *clp* dans la pathogénicité.

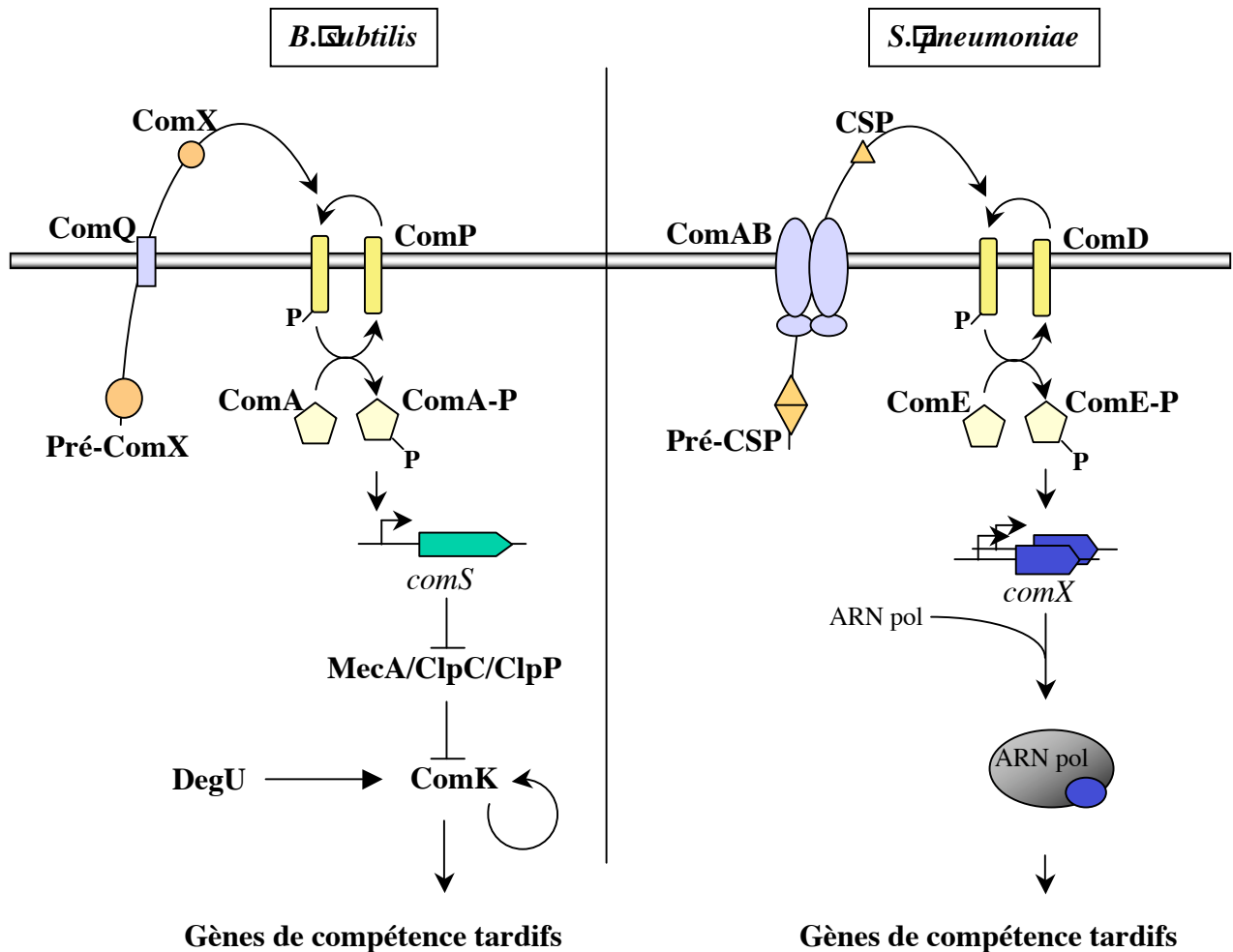
#### 1-Analyse du génome de la souche TIGR4 de *S. pneumoniae*

La recherche systématique des gènes *clp* dans le génome alors partiellement séquencé de la souche TIGR4 (un isolat clinique), a révélé la présence de gènes monocistroniques homologues de *clpP* et *clpE* ainsi que celle de l'opéron *ctsR-clpC*. Afin de déterminer la fonction de chacun de ces gènes, des mutants d'inactivation ont été construits par remplacement des gènes par une cassette de résistance à la kanamycine. Pour cela, la souche R6 a été naturellement transformée par des fragments d'ADN linéaires, puis les événements de double recombinaison dans le génome ont été sélectionnés en présence de l'antibiotique.

#### 2-ClpP est impliquée dans le contrôle de la compétence

Les mécanismes permettant le développement de la compétence naturelle chez *B. subtilis* et *S. pneumoniae* présentent de nombreuses similitudes, depuis les gènes de compétence dits tardifs, permettant la liaison et l'import de l'ADN, aux mécanismes de régulation par quorum-sensing qui impliquent l'accumulation d'un peptide extracellulaire. Pourtant, bien que la protéase ClpCP joue un rôle fondamental dans le contrôle de la compétence chez *B. subtilis*, une fonction éventuelle des gènes *clp* dans la compétence de *S. pneumoniae* ne pouvait être simplement extrapolée de la situation chez ce modèle. En effet, non seulement le système à deux composants qui permet de percevoir l'accumulation du peptide extracellulaire n'est pas homologue entre *B. subtilis* et *S. pneumoniae*, mais les

cascades d'activation qu'il induit sont différentes. Ainsi, le facteur de compétence ComK, qui est responsable de l'induction des gènes de compétence tardifs et qui est dégradé par la protéase ClpCP chez *B. subtilis*, n'a pas d'homologue chez *S. pneumoniae* (Fig. 23).

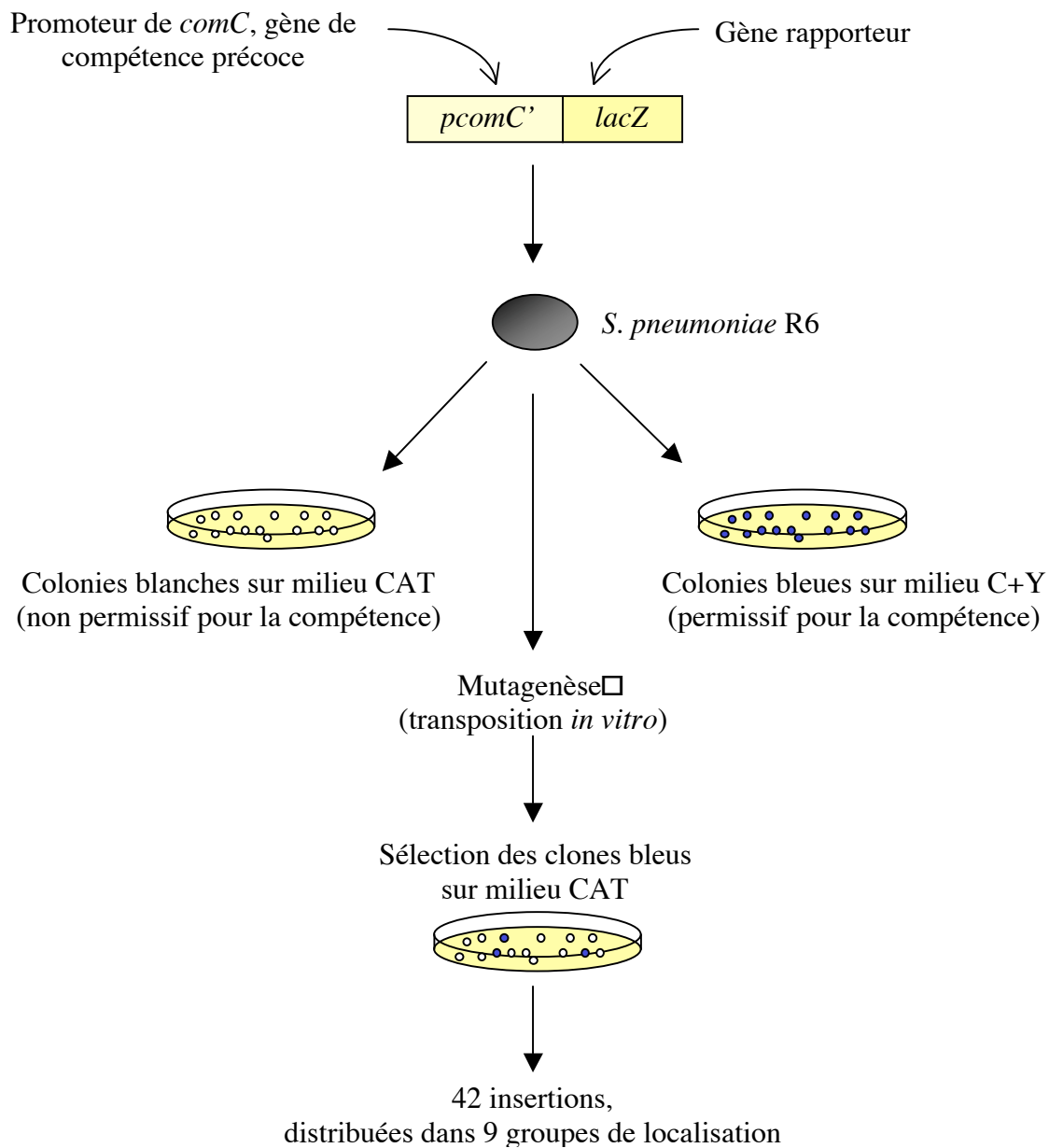


**Figure 23. Comparaison des voies d'induction des systèmes de compétence de *B. subtilis* et *S. pneumoniae***

Les voies d'induction de la compétence chez *B. subtilis* et *S. pneumoniae* présentent d'évidentes analogies, bien qu'il ne sembl pas exister de similarité de séquence entre les protéines équivalentes. Les deux systèmes de Quorum-sensing sont particulièrement semblables au niveau de leurs étapes précoces, tant dans leur mode de fonctionnement que dans l'organisation structurale des opérons *comQXPA* de *B. subtilis* et *comCDE* de *S. pneumoniae*.

Le gène *clpP* a été identifié au cours d'une mutagenèse *in vitro* par insertion de transposon de type *mariner*, dans le laboratoire du Dr J.-P. Claverys. Les mutants sélectionnés présentaient un phénotype *cup* (contraction de *comCDE<sup>up</sup>*), c'est-à-dire qu'ils montraient une surexpression d'une fusion transcriptionnelle *comC'-lacZ* sur milieu non permissif. En effet,

l'expression des gènes de compétence est subordonnée à certaines conditions, comme la concentration en sel, le pH de même que la densité de population. Ainsi, la fusion réalisée entre le gène rapporteur *lacZ* et le promoteur de l'opéron de compétence précoce *comCDE*, ne s'exprime pas sur milieu non permissif dans la souche sauvage (Fig. 24). L'analyse du mutant a révélé l'insertion du transposon dans la séquence promotrice du gène *clpP*, entre les séquences -35 et -10 du site de démarrage de la transcription.



**Figure 24. Isolement de mutants dont l'expression des gènes de compétence précoce est augmentée, par mutagenèse transpositionnelle *in vitro***

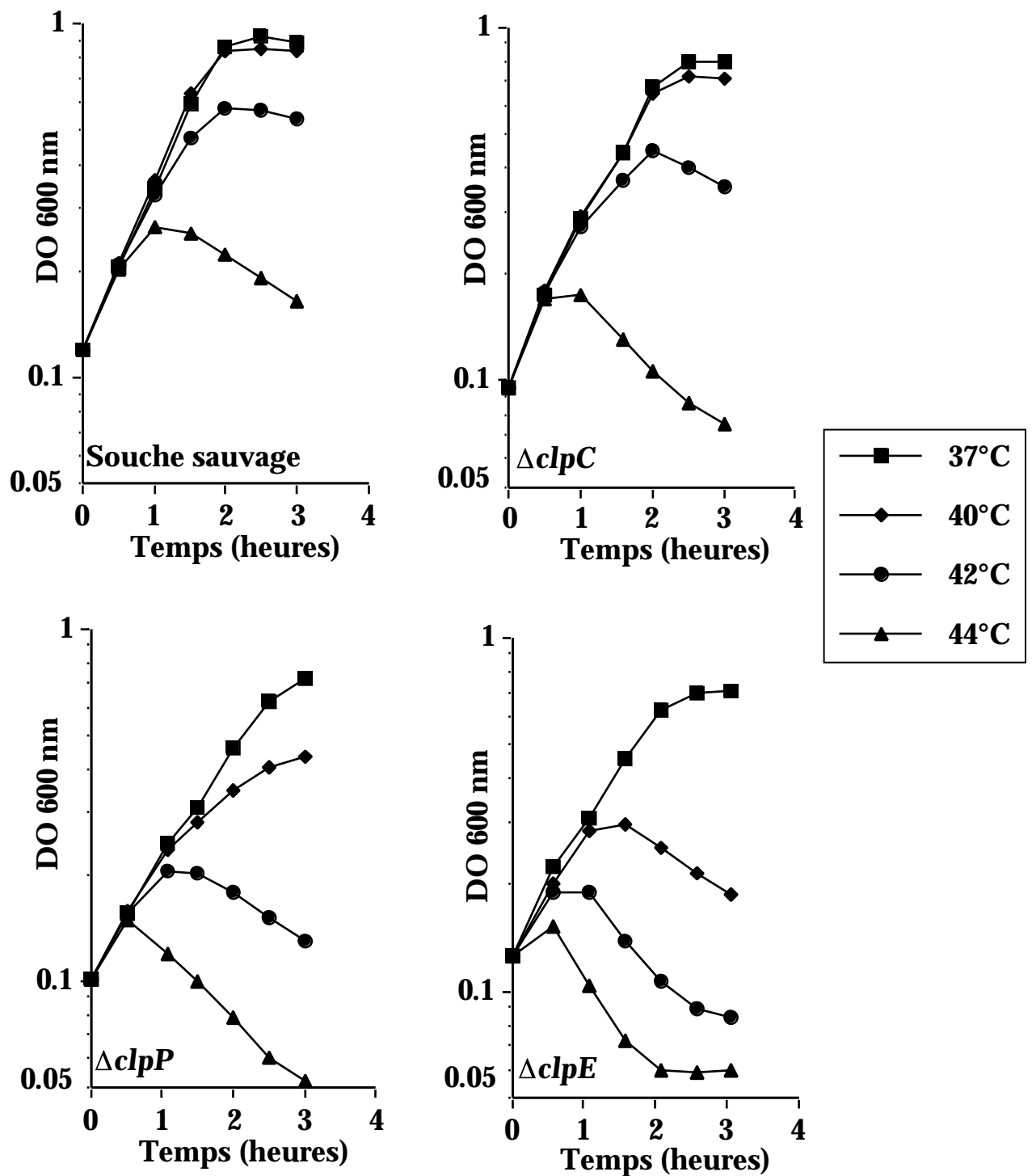
Afin de déterminer si l'expression du gène dans ce mutant était abolie ou augmentée, nous avons réalisé une expérience d'extension d'amorce qui a révélé la perte d'expression du gène. Puis, pour vérifier le rôle négatif de ClpP sur l'expression de l'opéron *comCDE*, le gène *clpP* a été interrompu dans une souche présentant la fusion *comC'-lacZ*. Le dosage de cette fusion a révélé que l'expression des gènes de compétence précoces était augmentée d'un facteur 24 dans le mutant *clpP* par rapport à la souche sauvage. Par contre, l'inactivation des gènes *clpC* ou *clpE* s'est révélée sans effet sur l'expression de *comC'-lacZ*.

Enfin, afin d'examiner l'effet des gènes *clpP*, *clpC* et *clpE* sur l'expression des gènes de compétence tardifs, qui reflète le développement de la compétence naturelle, les mutations ont été transférées dans des souches présentant une fusion *ssbB'-luc*. Celle-ci correspond à une fusion transcriptionnelle entre le promoteur de *ssbB* (*cilA*), dont l'expression dépend du facteur sigma de compétence ComX, et le gène *luc* de *Photinus pyralis* codant une luciférase. Le suivi de l'expression de cette fusion a révélé que les gènes de compétence tardifs sont normalement exprimés sur milieu permissif dans tous les mutants, mais que seule l'inactivation du gène *clpP* permet son expression sur milieu non permissif.

### **3-Les Clp sont des HSPs impliquées dans la résistance au stress thermique**

L'analyse de la région promotrice du gène *clpP* a révélé la présence d'un motif opérateur pour le régulateur CtsR. Comme nous l'avons précédemment décrit (Résultats I-B-1), des expériences *in vivo* et *in vitro* ont permis de démontrer que CtsR est le répresseur transcriptionnel des gènes *clpE* et *clpP* ainsi que de l'opéron *ctsR-clpC*. Au cours de cette étude, nous avons également montré que cette répression est thermosensible puisque ces gènes sont déréprimés lorsque la croissance est réalisée à haute température.

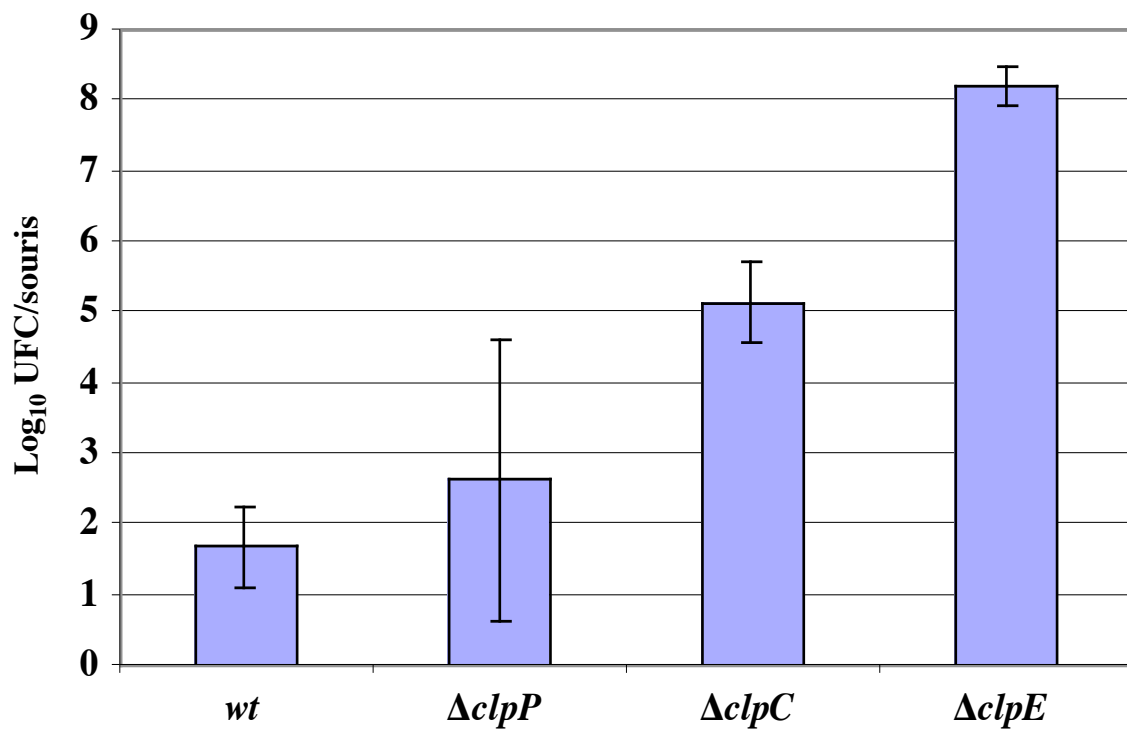
Ces protéines étant des HSPs généralement pourvues d'une activité protéolytique ou chaperon, nous avons voulu évaluer leur rôle dans la résistance au stress thermique. Dans ce dessein, des cinétiques de croissance de la souche sauvage et des différents mutants ont été réalisées à différentes températures (Fig. 25). Cette expérience montre que le mutant *clpC* et le mutant *ctsR* se comportent comme la souche sauvage et poussent normalement jusqu'à 40°C, plus faiblement à 42°C et lysent rapidement à 44°C. Par contre, la croissance des mutants *clpP* et *clpE* est affectée dès 40°C suggérant que tous deux sont essentiels pour l'adaptation aux hautes températures.



**Figure 25. *clpP* et *clpE* de *S. pneumoniae* sont requis pour la croissance à haute température**

Après croissance à 37° C jusqu'en phase exponentielle, les cultures des différentes souches sont divisées (temps 0) et incubées à différentes températures. La croissance est alors suivie par mesure de la DO pendant 3 heures.

## DL 50



**Figure 26. *clpE*, *clpC* et dans une moindre mesure *clpP*, sont impliqués dans la virulence de *S. pneumoniae* dans un modèle murin d'infection**

Des souris Swiss sont infectées, par voie intrapéritonéale, par des inoculums variants de  $10^3$  à  $10^8$  UFC de chacune des souches inactivées pour *clpP*, *clpC*, *clpE*, ou *ctsR* et de la souche 23477 virulente pénicilline sensible de sérotype B.

#### 4-Le rôle des gènes *clp* dans la virulence de *S. pneumoniae*

Les mutants d'inactivation des gènes *clp* ont été réalisés dans une dérivée de la souche de laboratoire R6. Cette souche est largement utilisée pour l'étude génétique du streptocoque pour des raisons pratiques et historiques (Cf. Introduction-I-B), mais est totalement avirulente du fait de l'absence de capsule. En collaboration avec l'équipe du Dr E. Azoulay-Dupuis, nous avons transféré les mutations inactivant les gènes *ctsR*, *clpC*, *clpE* et *clpP* dans un isolat clinique capsulé et virulent de *S. pneumoniae*. La capacité de développement de ces mutants a été évaluée dans un modèle murin d'infection par injection intra-péritonéale (Fig. 26). Ce test révèle que le mutant *clpE* et dans une moindre mesure le mutant *clpC* sont tous deux gravement déficients dans leur capacité à entraîner une septicémie, suggérant un rôle important dans le développement du pouvoir pathogène de *S. pneumoniae*. Le mutant *clpP* présente, par comparaison à la souche sauvage, une légère augmentation de sa DL<sub>50</sub>, qui pourrait s'expliquer par le défaut de croissance observé même en conditions optimales (milieu riche à 37°C) et la sensibilité aux stress. Ce résultat a été confirmé récemment par Robertson et coll., par l'inactivation de *clpP* dans une autre souche issue d'un isolat clinique (Robertson et coll., 2002). Ce mutant présente une augmentation de 4 ordres de grandeur de la DL<sub>50</sub> ce qui suggère d'après les auteurs que *clpP* pourrait être impliqué de manière plus spécifique dans le développement de la pathogénicité.

#### 5-L'inactivation de *clpC* dans la souche R6 n'a pas d'effet pléiotrope

Le gène *clpC* a été identifié par Charpentier et coll. dans une banque de mutants lors d'une recherche de clones capables de survivre en présence de pénicilline. De façon surprenante, l'inactivation du gène a été décrite comme augmentant la tolérance aux hautes températures, phénotype inverse de celui généralement rencontré avec ces mutants, et ce mutant serait capable de croître à des températures allant jusqu'à 44°C. De plus, ce mutant forme de longues chaînes, il ne lyse pas en présence de vancomycine, de pénicilline ou de DOC (le deoxycholate est un inducteur de l'autolysine *LytA*, qui entraîne la lyse cellulaire rapide de *S. pneumoniae*) et présente une adhérence atténuée pour les cellules alvéolaires humaines de type II. Ces phénotypes trouveraient leur origine dans la perte d'expression de plusieurs protéines de surface associées à la choline (Choline-binding proteins) dont *LytA*, *CbpA*, *CbpE*, *CbpF* et *CbpJ*. Enfin, le mutant serait non compétent et déficient pour l'expression de la pneumolysine (Charpentier et coll., 2000).

L'analyse phénotypique du mutant *clpC* construit au laboratoire n'a pas révélé la formation de chaînettes en microscopie, ni de résistance au stress thermique et présente un phénotype sauvage pour la transformation, bien qu'il ait été réalisé dans le même fond

génétique. L'observation de colonies sur boîte au sang de cheval révèle la présence d'un halo de lyse suggérant que la pneumolysine est exprimée normalement. Enfin, l'addition de DOC dans le milieu de culture entraîne une lyse très rapide du mutant, qui ne présente par ailleurs aucune différence de sensibilité avec la souche sauvage vis-à-vis de la pénicilline, suggérant que la production de l'autolysine majeure LytA n'est pas affectée.

## 6-Bilan

Nous avons montré que la protéine ClpP est requise pour la répression du système de compétence du streptocoque, au niveau des étapes précoces de son développement dans la boucle d'induction du système de quorum-sensing, mais que ni ClpE ni ClpC ne semblent impliquées dans ce mécanisme. CtsR, ClpC, ClpP et ClpE sont des protéines de choc thermique dont l'expression est réprimée à basse température par le régulateur CtsR, et les protéines ClpE et ClpP sont requises pour la croissance à haute température ainsi que pour le développement du streptocoque chez l'hôte.

Par contre, la protéine ClpC ne semble pas présenter de phénotype particulier dans la souche R6, contrairement aux résultats précédemment publiés. La publication récente de la séquence complète de cette souche a révélé la présence d'un codon stop qui tronque la région carboxy-terminale de la protéine, et qui pourrait expliquer l'absence de phénotype de ce mutant (Hoskins et coll., 2001). A la lumière de ce nouvel élément, les effets pléiotropes observés dans le mutant *clpC* par Charpentier et coll. en sont d'autant moins convaincants et s'ajoutent à la longue liste de leurs résultats controversés. En effet, une étude indépendante réalisée par Robertson et coll. sur les *clp* de *S. pneumoniae* (Robertson et coll., 2002), a confirmé l'ensemble de nos résultats, y compris l'absence de phénotype du mutant *clpC*.

Ces résultats regroupent des données non publiées ainsi que les travaux parus dans l'article situé en annexe n°2 : Chastanet *et al.*, J. Bacteriol., (2001) 183(24), 7295-7307.

## **B-ClpB est requise pour la virulence mais pas pour la résistance générale aux stress chez *L. monocytogenes***

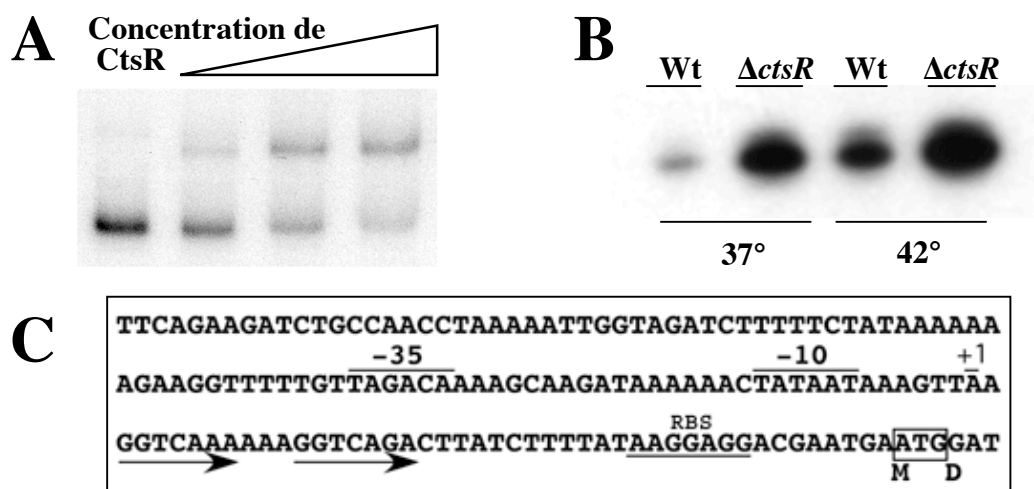
Les travaux de Berche et coll. ont montré que les gènes *clpC*, *clpE* et *clpP* de *L. monocytogenes* sont requis à la fois pour la résistance aux stress, mais aussi au cours de certaines étapes clés du processus infectieux (Gaillot et coll., 2001; Gaillot et coll., 2000; Nair et coll., 1999; Nair et coll., 2000b; Rouquette et coll., 1998; Rouquette et coll., 1996). De plus, tous trois sont sous le contrôle du répresseur transcriptionnel CtsR (Nair et coll., 2000a).



Le début du séquençage de la souche EGD-e de *L. monocytogenes* avait révélé la présence d'un nouveau membre de la famille Clp-HSP100 dans ce génome. Une collaboration fut engagée avec l'équipe du Pr P. Berche à Paris, afin de caractériser ce gène.

### 1-ClpB, un nouveau membre de la famille Clp-HSP100 de *L. monocytogenes*

L'analyse de la séquence déduite de cette protéine Clp a révélé la présence d'un long domaine central séparant les deux motifs de liaison à l'ATP, d'environ 130 acides aminés, caractéristique de la famille ClpB. Cela signifie que *L. monocytogenes* est dotée d'une ATPase qui n'existe pas chez son proche parent *B. subtilis*, puisque celui-ci ne présente que les ATPases ClpC, ClpE, ClpX et ClpY. De plus, cette protéine est dépourvue de la séquence IGF requise pour l'interaction avec les sous-unités protéolytiques ClpP, suggérant à l'instar de ClpB de *E. coli*, qu'elle ne puisse agir que comme un chaperon moléculaire.



**Figure 27. ClpB de *L. monocytogenes* est une protéine de choc thermique dont l'expression est sous le contrôle de CtsR**

A. Expérience de retard de migration sur gel, démontrant la fixation spécifique de CtsR de *L. monocytogenes* sur un fragment d'ADN linéaire correspondant à la région promotrice du gène *clpB*.

B. Expérience d'extension d'amorces sur des ARN de *L. monocytogenes*. Wt : souche sauvage LO28;  $\Delta$ *ctsR* : souche inactivée pour *ctsR*.

C. Région promotrice du gène *clpB* de *L. monocytogenes*. L'opérateur CtsR (indiqué par des flèches) est présent en aval du site de démarrage de la transcription (+1).

## 2-ClpB est une HSP dont l'expression est sous le contrôle de CtsR

L'analyse de la séquence promotrice de *clpB* a révélé la présence d'un motif de liaison potentiel pour le régulateur CtsR. Afin de caractériser la régulation de ce gène, une fusion *clpB'-bgaB* a été introduite dans une souche de *B. subtilis*. Celle-ci possédait également une fusion *PxylA-ctsR* permettant l'expression inductible du gène *ctsR* de *L. monocytogenes*. Nous avons ainsi montré que l'expression de *clpB'-bgaB* est réprimée d'un facteur 15 en présence de CtsR chez *B. subtilis*, et que l'effet répressif est supprimé à haute température. Une approche complémentaire *in vitro* a permis de montrer, par des expériences d'empreintes à la DNase I et de retard de migration sur gel, que la protéine purifiée CtsR de *L. monocytogenes* se fixe spécifiquement au niveau de la région promotrice de *clpB* (Fig. 27).

Enfin, l'expression du gène *clpB* a été analysée chez *L. monocytogenes* dans des expériences d'extension d'amorces. Celles-ci ont révélé que le site de démarrage de la transcription est précédé d'un promoteur de type végétatif dont l'expression est inductible par la température. Un mutant d'inactivation de *ctsR* a été construit dans la souche L028, afin de comparer l'expression de *clpB* dans ce mutant et dans la souche sauvage. Il a ainsi été montré que l'inactivation de *ctsR* entraîne l'expression forte et constitutive de *clpB*, supérieure à l'expression du gène dans la souche sauvage lors d'un stress thermique à 42°C (Fig. 27).

## 3-Rôle de ClpC dans l'expression des gènes *clp* de *L. monocytogenes*

Précédemment, les travaux de Nair et coll. ont montré que l'expression de *clpE* était fortement induite dans un mutant d'inactivation de *clpC*. Les auteurs ont formulé l'hypothèse que ClpC pourrait agir indirectement sur l'expression de *clpE*, et que la surexpression de *clpE* pourrait être un mécanisme compensatoire à l'absence de ClpC.

Afin de mettre en évidence un éventuel rôle de ClpC dans le contrôle de l'expression du gène *clpB*, l'expression de ce gène a été comparée entre la souche L028 sauvage et le mutant *clpC*, par une expérience d'extension d'amorce. Celle-ci a révélé la dérepression du gène dans ce mutant, suggérant que ClpC pourrait participer à la régulation de tous les gènes dépendants de CtsR. Pour confirmer cette hypothèse, des extensions d'amorces comparatives ont également été réalisées sur les deux autres membres du régulon CtsR : *clpP* et *ctsR* lui-même. Nous avons montré que tout l'ensemble du régulon CtsR est exprimé constitutivement dans le mutant *clpC*, à l'exception de l'opéron *ctsR-clpC* dont les ARNm n'ont pu être mis en évidence. Ce résultat suggère fortement que l'effet observé dans le mutant *clpC* est dû à l'absence d'expression du régulateur CtsR, peut-être à la suite d'une déstabilisation de l'ARNm dans ce mutant.

#### **4-ClpB est requise pour la virulence de *L. monocytogenes***

Les trois gènes *clp* de *L. monocytogenes* caractérisés à ce jour étant impliqués dans son pouvoir pathogène, nous avons voulu déterminer le rôle de ClpB dans la virulence de ce microorganisme.

Pour cela, un mutant d'inactivation du gène *clpB* a été réalisé dans la souche de référence L028 à l'aide du plasmide pMAD, un nouveau vecteur développé au laboratoire (M. Débarbouillé et M. Arnaud, données non publiées). Nous avons alors examiné la capacité de ce mutant à provoquer une infection systémique dans un modèle murin, qui a révélé que la  $DL_{50}$  est 100 fois plus importante dans le mutant *clpB* que dans la souche sauvage. Des expériences complémentaires sont en cours, afin d'évaluer la capacité de développement du mutant dans les organes ainsi que l'impact éventuel de la mutation sur l'expression des gènes de virulence.

#### **5-ClpB n'est pas requise pour la résistance générale aux stress, mais est nécessaire pour la thermotolérance induite**

L'analyse fonctionnelle du mutant *clpB* a été entreprise afin d'évaluer son rôle dans la résistance aux stress. La résistance du mutant a été testée en conditions de stress thermique de 37°C à 55°C, et en présence de sel, de détergent (SDS) et de puromycine. Aucune de ces conditions, connues pour entraîner l'accumulation de protéines tronquées ou dénaturées, n'a permis de mettre en évidence une sensibilité du mutant par rapport à la souche sauvage, suggérant que ClpB n'est pas requise pour la tolérance aux stress. Par ailleurs, l'induction du gène *clpB* de *L. monocytogenes* lors d'un stress à basse température a été récemment rapportée (Liu et coll., 2002), et son homologue chez *Synechococcus* sp. est connu pour être impliqué dans la résistance au froid (Porankiewicz et Clarke, 1997). La capacité de croissance à basse température étant une des caractéristiques faisant de *L. monocytogenes* un problème de santé publique, nous avons évalué l'effet de l'inactivation de *clpB* sur sa croissance à 5°C et à 10°C, mais aucun effet n'a pu être observé.

Par contre, le mutant présente une capacité réduite dans la thermotolérance induite. En effet, on sait que *L. monocytogenes* a un meilleur taux de survie aux températures létales lorsqu'elle a été préalablement exposée à un stress thermique intermédiaire. Or l'inactivation de *clpB* abolit l'effet protecteur de la pré-exposition à la température non létale, entraînant la mort rapide du mutant à 60°C.

## 6-Bilan

Nous avons caractérisé une nouvelle protéine Clp dont l'expression est sous contrôle du régulateur CtsR. Cependant, bien que son expression soit inductible par le stress, elle n'est pas nécessaire pour la résistance générale aux stress. Cette thermoinduction pourrait être requise pour l'adaptation induite aux températures létales dont ClpB semble être un élément clé. La résistance induite aux hautes températures semble d'ailleurs participer à la capacité de résistance de *L. monocytogenes* à certains procédés de pasteurisation (Doyle et coll., 1987; Fleming et coll., 1985).

De plus, cette protéine est impliquée dans le pouvoir pathogène de *L. monocytogenes*, probablement de manière indépendante de sa capacité de résistance aux stress, ce qui suggère que ClpB pourrait jouer un rôle spécifique dans l'activation d'un facteur de virulence.

Ainsi, ClpB serait doublement impliquée dans la menace que constitue cette bactérie, d'une part, en permettant sa survie lors des processus de stérilisation, et d'autre part, en augmentant sa capacité de développement chez l'hôte.

Ces résultats regroupent des données qui ont été soumises pour publication au Journal of Bacteriology tels que présentés en annexe n°4, ainsi que des données complémentaires.

## **DISCUSSION et PERSPECTIVES**

Au cours de ces travaux, nous nous sommes intéressés aux modes de régulation des principaux gènes de choc thermique chez les bactéries Gram-positives, ainsi qu'à la caractérisation des protéines de la famille Clp. En nous appuyant sur les connaissances acquises chez le modèle *B. subtilis* d'une part, et en utilisant ce dernier comme outil d'autre part, nous avons pu mettre en évidence les similitudes et les différences existantes entre les espèces généralement considérées comme proches de ce modèle, les bactéries Gram-positives à bas GC %.

## **I-La double régulation CtsR/HrcA-dépendante des gènes de stress**

Au cours de cette étude nous avons montré que la classification des gènes de stress de *B. subtilis* en 4 groupes n'est pas applicable à l'ensemble des bactéries à Gram-positives à bas GC %, et qu'il existe une diversité de régulation insoupçonnée malgré la présence des mêmes régulateurs dans les différents génomes.

En effet, nous avons découvert que chez *S. aureus*, les deux opérons *dnaK* et *groESL* sont sous le contrôle transcriptionnel du régulateur CtsR, alors que leur expression avait préalablement été montrée comme étant dépendante du régulateur HrcA. Ces deux régulateurs peuvent se fixer simultanément sur les promoteurs des deux opérons *dnaK* et *groESL*, malgré la proximité des motifs, et ainsi agissent de manière synergique et indépendante pour éteindre l'expression de ces gènes.

### **Le régulateur CtsR**

Nos résultats montrent que CtsR est un régulateur du stress extrêmement bien conservé chez les Firmicutes, et confirment les hypothèses émises par Derré et coll. lors de la mise en évidence de ce régulateur chez *B. subtilis*. En effet, CtsR semble présent chez toutes les espèces bactériennes Gram-positives à bas GC %, et sa séquence en acides aminés est bien conservée, particulièrement au niveau du motif hélice-tour-hélice permettant son interaction avec l'ADN. La séquence du site opérateur reconnu par CtsR est d'ailleurs remarquablement conservée, et toujours trouvée en association avec des gènes de stress.

Bien qu'il s'agisse dans la majorité des cas de gènes de la famille *clp*, ou d'opérons codant les chaperons GroESL, on note cependant qu'il existe une variabilité de la structure du régulon CtsR d'une espèce à l'autre. Ceci est dû, d'une part, à la variabilité entre espèces du nombre d'ATPases Clp de Classe I (voir ci-dessous, II), dont les gènes sont, à de très rares exceptions près, sous contrôle de CtsR. D'autre part, à l'extension du régulon CtsR aux



opérons *dnaK* et/ou *groESL* dans les cas de doubles régulations par CtsR et HrcA, ainsi qu'à des gènes codant de petites protéines de choc thermique de fonctions inconnues (Hsp16, Hsp18).

Contrairement au motif CIRCE, dont la position dans la région promotrice est très variable (séquence non transcrite, transcrite mais non traduite, traduite), celle du motif de liaison de CtsR dans les promoteurs présente une très faible variabilité et se situe toujours à proximité immédiate (amont ou aval) du site de démarrage de la transcription. On note ainsi que la première heptade reconnue par CtsR (TTTGACC) dans les gènes *clpP* de *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* et *L. monocytogenes* se trouve systématiquement au niveau de la boîte -35 du promoteur. L'excellente conservation de ce positionnement suggère un mécanisme commun de répression à tous les régulateurs CtsR, probablement en empêchant l'interaction entre l'ARNP et son promoteur.

### **Le régulateur HrcA**

La fixation de HrcA au niveau du motif CIRCE constitue la première mise en évidence biochimique de l'interaction directe entre HrcA et CIRCE. Nos résultats montrent que la protéine n'interagit pas avec les 9 pb séparant les deux IR, contrairement à de précédents résultats obtenus par microscopie à force atomique. Ceux-ci suggéraient un positionnement du répresseur au niveau de la boucle (non conservée) de la structure en tige et boucle formée par l'interaction des séquences répétées-inversées du palindrome (Ohta et coll., 1996). En effet, les 9 pb centrales se trouvent partiellement non protégées de la dégradation dans l'expérience d'empreinte à la DNase I, ce qu'explique la faible conservation de cette séquence. HrcA protège deux zones successives, dont l'écartement les place à 2 tours d'hélice sur la même face de la double hélice d'ADN. La structure palindromique de la séquence CIRCE d'une part, et l'observation de deux zones distinctes de protection d'autre part, suggèrent que ce régulateur agit sous forme de dimère. Ceci est en accord avec les travaux de Martirani et coll. qui ont montré la présence d'homodimères en solution de l'homologue de HrcA de *Streptococcus thermophilus* (Martirani et coll., 2001). Ainsi, deux protéines pourraient interagir de manière symétrique avec chacun des deux bras de l'IR, ce qui est caractéristique des protéines de liaison à l'ADN ayant un motif de type Hélice-Tour-Hélice. Bien qu'aucun motif HTH canonique n'ait pu être détecté, on remarque qu'il existe des similitudes entre la seconde hélice du motif HTH de la famille DeoR, celle qui pénètre au niveau du grand sillon de l'ADN pour interagir avec le motif de reconnaissance, et le domaine amino-terminal de HrcA. Ce domaine est le seul qui soit bien conservé entre les protéines HrcA, qui présentent par ailleurs entre elles de faibles similitudes (Fig. 28). Récemment, après analyse



informatique de 5 prédictions de structure secondaire de la protéine HrcA de *Bacillus thermoglucosidasius*, Hitomi et coll. ont également proposé l'existence d'un motif HTH dans ce domaine amino-terminal (Hitomi et coll., 2003), recouvrant partiellement la région similaire au motif HTH de DeoR (Fig. 28). L'alignement de ces motifs HTH putatifs de différentes protéines HrcA avec ceux de GlpR, GutR et FucR de *E. coli*, a révélé la présence de trois résidus T-I-R parfaitement conservés dans la seconde hélice. Le remplacement de l'arginine de ce triplet par une asparagine diminue d'un facteur 16 l'affinité de la protéine pour le motif CIRCE, ce qui renforce l'hypothèse d'un rôle de ce domaine dans la reconnaissance et l'interaction avec le motif CIRCE.

On peut supposer que les résultats récents ayant conduit à l'obtention de formes solubles des protéines HrcA de *S. aureus* et de *B. thermoglucosidasius* permettront dans un avenir proche l'obtention de données structurales de ce répresseur bactérien ubiquitaire.

### **Structure des promoteurs**

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence plusieurs gènes de réponse aux stress sous le contrôle de répresseurs transcriptionnels, dont les promoteurs présentent des structures que l'on peut classer en trois catégories.

Ainsi, le premier groupe correspond aux promoteurs présentant une ou plusieurs répétitions du même motif, et donc sous le contrôle d'un seul régulateur. Par exemple, les promoteurs des gènes *clp* présentent le plus souvent un seul motif de fixation pour CtsR, mais il existe plusieurs exemples de promoteurs présentant une demi boîte supplémentaire ou 2 boîtes de fixation, comme c'est le cas respectivement pour les gènes *clpB* et *clpC* de *S. aureus*. On peut supposer que l'accumulation de séquences opératrices permette une meilleure répression de l'expression du gène cible. Bien qu'aucune étude ne se soit focalisée sur cet aspect, cette hypothèse est renforcée par les travaux de Derré et coll. sur *clpE* de *B. subtilis*. L'expression basale de ce gène, qui présente 5 motifs de liaison pour CtsR, est particulièrement faible en absence de stress puisque indétectable par extension d'amorce, et son induction après un stress est transitoire et totalement éteinte après quelques minutes seulement. Ainsi, la variabilité du nombre de motifs de répression pourrait permettre l'expression des divers gènes d'un même régulon à différents taux de base, et autoriser une induction plus ou moins importante à la suite d'un stress.

De même, nous avons vu que chez les streptocoques, lactocoques et entérocoques les opérons *dnaK* sont précédés de deux motifs CIRCE en tandem. Cette organisation avait déjà été observée pour les opérons *groESL2* chez les mycobactéries, pour les opérons *groESL2* et *groES-groEL1* chez *S. coelicolor*, ainsi que dans le promoteur *groESL* de *Leptospira*

*interrogans* (Segal et Ron, 1996b). A une exception près, tous ces promoteurs présentent un seul site de démarrage de la transcription, situé à proximité de l'un des motifs CIRCE, le second motif étant positionné très en amont de ce site. Les travaux réalisés par Schumann et coll. chez *B. subtilis* montrent que l'effet répresseur du motif CIRCE décroît avec la distance le séparant du site de démarrage de la transcription, ce qui suggère que l'effet répresseur du motif distal soit donc relativement faible dans ces promoteurs. Cependant, des expériences de mutagenèse dirigée seraient nécessaires pour déterminer la part de chacun des motifs dans le contrôle de ces gènes.

La seconde catégorie de promoteurs correspond à ceux présentant deux types d'opérateurs différents, et donc sous le contrôle indépendant de deux régulateurs. C'est le cas par exemple des gènes *clpC* et *clpP* de *B. subtilis*, qui sont sous le double contrôle du répresseur CtsR et de l'activateur <sup>B</sup>. Il semble cependant que dans ces deux cas, le rôle de <sup>B</sup> soit mineur par rapport à l'effet répresseur de CtsR. Mais jusqu'à présent, il n'existait pas d'exemple de gènes de stress sous le contrôle indépendant de deux répresseurs.

La double régulation par CtsR et HrcA, observée tout d'abord pour les opérons *dnaK* et *groESL* de *S. aureus* puis étendue à plusieurs espèces de bactéries Gram-positives (Annexe1), constitue donc une nouvelle classe de promoteurs inductibles par le stress. La proximité de chacun des sites de fixation pour CtsR ou HrcA avec le site de démarrage de la transcription suggère que les deux régulateurs agissent de manière similaire en empêchant, par encombrement stérique, la formation du complexe binaire entre l'ARNP et le promoteur.

L'opéron *dnaK* de *L. monocytogenes* et le gène *clpP* de *S. salivarius* sont deux cas intéressants car atypiques parmi les gènes doublement régulés par CtsR/HrcA. Chez *Listeria*, la position éloignée du site de fixation de CtsR rend peu probable l'hypothèse de l'inhibition par encombrement stérique. Cependant, l'effet répresseur peut se manifester de différentes façons comme par la formation d'une courbure de l'ADN ou l'inhibition de la transition du complexe fermé vers le complexe ouvert du système binaire ARNP/promoteur (Rojo, 1999). Il est donc possible que l'expression de l'opéron *dnaK* de *L. monocytogenes* soit également, mais d'une façon différente des autres gènes, sous la dépendance de CtsR. Il s'agit en tout cas, à ce jour, du seul promoteur présentant un motif de fixation de CtsR aussi distant du site de fixation de l'ARNP.

La situation est exactement inverse dans le cas de *clpP* de *S. salivarius*, qui présente un motif de répression pour CtsR au niveau de la boîte -35 du promoteur, ce qui est caractéristique des gènes *clpP*, et un motif CIRCE distal situé plus en amont. Nous avons montré que ce dernier est fonctionnel et que HrcA participe à la répression de *clpP*, même s'il est probable que son activité soit relativement faible par rapport à celle de CtsR. Il est

intéressant de noter que la position de ce motif est identique à celle du motif CIRCE distal présent dans les promoteurs des opérons *dnaK* chez les streptocoques, ce qui suggère une fonction analogue de ce motif ou tout au moins que ce motif soit potentiellement fonctionnel dans ces derniers. L'analyse systématique des banques de séquences n'a, pour le moment, révélé qu'un seul autre gène *clp* présentant un motif CIRCE chez les bactéries à bas GC %, *clpL*, et aucun autre *clp* présentant une double régulation CtsR/HrcA dépendante.

### La perception du signal

L'ensemble de ces résultats soulève de multiples questions quant à ces deux régulateurs : quels signaux reconnaissent-ils ? Pourquoi un promoteur est-il sous contrôle de deux répresseurs répondant aux mêmes signaux ? Comment sont-ils perçus ?

Le problème de la perception du stress vient du fait qu'il existe extrêmement peu de données chez les bactéries Gram-positives et que, même chez *B. subtilis*, les modèles concernant CtsR comme HrcA sont largement controversés. Cependant, l'absence chez les streptocoques, lactocoques et entérocoques de deux gènes de l'opéron *clpC* supposés responsables de l'activation et de l'inhibition de CtsR chez *B. subtilis*, suggère soit une remise en cause du modèle chez celui-ci, soit un mécanisme de contrôle différent pour les premiers. On peut tout de même, avec une quasi certitude, exclure la possibilité que l'un de ces régulateurs soit directement un thermosenseur, du fait de la capacité de réponse de chacun d'eux à une large gamme de stress, en tout cas chez *S. aureus*.

En ce qui concerne les signaux, l'étude de ces régulateurs chez *B. subtilis* indique que CtsR est inductible par une plus grande diversité de stress que HrcA, lequel répond principalement à l'élévation de température. Il est cependant difficile d'évaluer l'influence des différents stress sur ces deux répresseurs chez les autres bactéries Gram-positives, du fait d'un manque d'études systématiques dans la littérature. Chez *S. aureus*, notre analyse a révélé le même spectre de réponse aux stress (sensibilité aux stress thermique, éthanolique, et SDS, et insensibilité aux stress salin, alcalin, et acide) pour HrcA et CtsR suggérant une réponse différente de celle de *B. subtilis*. Il est donc très probable que les bactéries vivant dans des biotopes distincts et soumises à des stress différents, aient développé des réponses spécifiques. La recherche systématique des stress induisant spécifiquement chacun de ces régulateurs serait donc nécessaire, et mettrait sans doute en évidence de nombreuses différences même entre espèces proches.

Il est cependant possible que les mécanismes de répression par CtsR et HrcA chez *S. aureus* ne soient pas totalement redondants et plusieurs hypothèses peuvent expliquer le maintien de ce double système au cours de l'évolution. D'une part, on ne peut écarter

l'hypothèse de l'existence de stress induisant spécifiquement l'un des régulateurs, et qui n'auraient pas encore été identifiés. D'autre part, ces régulateurs pourraient répondre à des stress identiques mais avec des cinétiques de réponses différentes ou des niveaux d'induction différents, et avoir dans ce cas une action complémentaire. D'une manière générale, la double régulation par CtsR et HrcA pose le problème de sa signification biologique.

### **Signification biologique**

Il est d'autant plus difficile d'émettre une hypothèse sur la fonction de la double régulation des gènes de stress, que l'on ne maîtrise pas les paramètres d'induction de chacune des voies.

Cependant, on peut noter que, d'une part, l'extension du régulon CtsR aux opérons *dnaK* et *groESL* implique une synchronisation de l'expression des principaux chaperons cytoplasmiques : DnaK, GroESL et Clp. Et d'autre part, que ce système permet l'induction des chaperons doublement régulés à différents niveaux d'expression : basal (double répression), moyenne (simple répression) et forte (pleine induction). Ceci implique l'hypothèse de l'existence de stimuli spécifiques de CtsR ou de HrcA. De manière plus spéculative, on pourrait rapprocher le besoin de moduler finement l'expression des chaperons moléculaires avec le dilemme posé aux bactéries pathogènes : surexprimer ses chaperons pendant l'infection pour résister aux stress tout en limitant l'induction des défenses de l'hôte.

## II-Analyse fonctionnelle des *clp* chez les bactéries Gram-positives

Au cours de ces travaux, nous avons réalisé une analyse fonctionnelle de plusieurs gènes *clp* de *S. pneumoniae* ainsi que du gène *clpB* de *L. monocytogenes*. Nous avons ainsi montré que chez ce streptocoque, les Clp sont impliquées dans diverses fonctions dont la résistance aux stress, l'inhibition de la compétence ou le développement du pouvoir pathogène tandis que ClpB de *Listeria* est nécessaire à la résistance induite aux stress thermiques extrêmes et la virulence. De façon générale, nos résultats apportent de nouveaux éléments concernant les fonctions des *clp* et leur répartition chez les bactéries Gram-positives.

### La répartition des gènes *clp* chez les bactéries Gram-positives

De notre étude, portant sur plusieurs bactéries à Gram-positif, est ressorti le fait que si certains gènes *clp* étaient toujours présents comme *clpP* et *clpC*, d'autres semblaient apparaître de façon sporadique comme *clpB*, présent chez *L. monocytogenes* ou *clpL*, présent chez *S. pneumoniae*. La présence et l'absence de ces paralogues de *clpC* nous ont poussé à nous demander comment sont répartis ces gènes chez ces microorganismes. L'analyse systématique des génomes bactériens séquencés ou en cours de séquençage, nous a permis de mettre en évidence plusieurs caractéristiques de cette répartition (Table 3).

Tout d'abord, il apparaît que *clpC*, *clpP* et *clpX* sont les trois seuls gènes ubiquitaires des bactéries Gram-positives. En plus de ce lot minimum, on retrouve plusieurs paralogues dont la distribution est spécifique d'un groupe bactérien : *clpB*, *clpE* chez les Clostridies, *clpE*, *clpL* chez les Streptocoques, *clpY*, *clpQ* chez les Bacilli, Staphylocoques et *Listeria*. Enfin, on note la présence ou l'absence de gène de manière atypique pour le groupe bactérien. Ainsi, la présence de *clpB* chez *S. mutans* et *clpA* chez *S. agalactiae* est probablement due à des acquisitions récentes par transfert horizontal, tandis que l'absence chez les Bacilli tantôt du gène *clpE* (*B. anthracis*) tantôt du gène *clpB* (*B. subtilis*) révèle peut-être la perte secondaire de ces gènes. Cette grande variabilité du nombre de gènes *clp* par génome ne semble pas suivre un schéma évolutif simple, mais suppose plutôt de nombreux événements indépendants de remaniement dans chacun des groupes bactériens. De même que la conservation de *clpC*, *clpP* et *clpX* semble indiquer la possibilité qu'ils soient associés à des fonctions clés du processus cellulaire, l'inconstance de la présence des autres gènes suggère soit que les fonctions qu'ils portent sont accessoires, soit qu'il existe une flexibilité due à une possible redondance d'action entre les ATPases Clp.

### La fonction des Clp

Comme nous l'avons illustré dans la partie introductive de cette thèse (Cf. Intro Fonction), il est difficile de relier la fonction des gènes *clp*, qui est généralement déduite du phénotype du mutant, avec l'activité biochimique de la protéine dans la cellule vis-à-vis d'un substrat particulier.

Mais il semble tout aussi difficile d'associer spécifiquement une ou des fonctions à un type de gène *clp* donné, puisque d'une bactérie à l'autre deux gènes orthologues peuvent avoir des fonctions différentes. Ainsi, ClpB chez *L. monocytogenes* est requise pour la résistance induite aux stress létaux mais pas pour la résistance basale aux stress, ce qui est exactement l'inverse de la situation chez *E. coli*. Pourtant, ce phénotype n'est pas restreint aux bactéries Gram-positives, puisque des fonctions similaires ont été mises en évidence pour ClpB de *Synechococcus* sp et la forme eucaryote Hsp104 chez le maïs. De même, la comparaison des fonctions des gènes *clp* de *B. subtilis* et *S. pneumoniae* ne permet pas de mettre en évidence une véritable conservation de la fonction. En effet, à l'inverse de la situation chez *B. subtilis*, *clpC* de *S. pneumoniae* n'est impliqué ni dans la division cellulaire, ni dans la compétence et ne présente pas de phénotype particulier (hormis son rôle dans le développement de la pathogénicité), tandis que le gène *clpE* joue un rôle essentiel dans l'adaptation au stress. De plus, si chez ces deux espèces les gènes *clpP* sont impliqués dans le développement de la compétence, les différences entre les deux systèmes sont tels qu'elles suggèrent davantage une convergence évolutive qu'une conservation de la fonction.

Mais au sein d'une cellule, existe-t-il une redondance de fonction entre les Clp ?

La réponse est positive en ce qui concerne le traitement aspécifique des protéines, c'est-à-dire celles qui ont été dénaturées. En effet, ClpAP, ClpXP et ClpYQ chez *E. coli* et ClpCP, ClpXP chez *B. subtilis* participent à l'élimination des protéines dénaturées après un stress. Des données contradictoires concernant l'élimination des protéines étiquetées par le système SsrA chez *E. coli* semblent indiquer cependant l'implication redondante de ClpAP et de ClpXP. Par contre, l'étude de la courte liste des substrats spécifiquement reconnus par les Clp (Table 4) indique qu'il n'existe à ce jour aucun substrat commun à plusieurs ATPases Clp d'une même espèce.

Tout se passe donc comme si les Clp présentaient une double activité. D'une part, une action commune non spécifique de contrôle qualité, fonction indispensable pour la survie lors d'un stress, et d'autre part, une activité propre à chacune vis-à-vis d'un certain nombre de substrats.

### Les Clp de *S. pneumoniae*

Nos résultats montrent que les gènes *clp* de *S. pneumoniae* sont associés à plusieurs fonctions cellulaires : *clpE* et *clpP* dans la résistance au stress thermique, *clpP* dans la compétence et enfin *clpE* et *clpC* dans le développement du pouvoir pathogène. Cependant, chacun de ces résultats soulève de nouvelles questions, qui pourront être abordées dans le cadre de la poursuite de ce projet.

Tout d'abord, notre analyse de la réponse au stress s'est focalisée sur le stress thermique. Il serait donc intéressant de connaître quels sont les différents stress susceptibles d'induire une réponse CtsR-dépendante chez le pneumocoque. La conservation du régulateur CtsR suggère que les gènes *clp* placés sous son contrôle soient, comme chez *B. subtilis* ou *S. aureus*, inductibles par de multiples stress. Cependant, nous avons vu qu'il existait une certaine probabilité que le mécanisme d'induction de CtsR chez les streptocoques soit différent de celui du modèle *B. subtilis*, du fait de l'absence des gènes *mcsAB*, ce qui pourrait impliquer un spectre d'induction original.

D'autre part, il n'existe pas systématiquement de lien entre l'induction du gène par un stress et sa fonction dans la résistance à ce même stress. Ainsi, le gène *clpE* de *B. subtilis* est inductible par une large gamme de stress car placé sous le contrôle transcriptionnel de CtsR, mais le mutant d'inactivation de ce gène ne présente aucun phénotype évident. On ne peut donc exclure pour le moment que le gène *clpC* de *S. pneumoniae* ne soit requis pour la résistance à un stress autre que le choc thermique. L'analyse fonctionnelle systématique de ces gènes devra donc être poursuivie.

Le gène *clpC* est particulièrement intéressant car la présence d'une mutation non-sens dans ce gène dans la souche R6 pourrait être apparue lors des multiples processus de sélection subits par celle-ci. Il serait donc nécessaire dans un premier temps de déterminer si cette interruption est silencieuse, ou si elle entraîne un gain ou une perte de fonction. L'inactivation de ce gène n'ayant entraîné aucun phénotype apparent dans cette souche, deux approches seront utilisées. Premièrement, le gène *clpC* sera inactivé dans une souche « naïve » ne présentant pas la mutation non-sens, par exemple la souche parentale D39. En effet, on peut imaginer que la mutation du gène *clpC* dans la souche R6 se soit accompagnée d'une mutation compensatoire dans un autre locus, et donc que l'inactivation de *clpC* dans le fond génétique « sauvage » présente un phénotype différent. Deuxièmement, une copie sauvage du gène sera introduite dans la souche R6. En effet, si le codon stop présent dans *clpC* entraîne son inactivation, la fonction de ce gène pourrait être mise en évidence par la réintroduction du gène natif.

Par ailleurs, l'étude du rôle des gènes *clp* dans la compétence sera poursuivie. En effet, l'étude de l'activité biochimique de ClpP de *E. coli* montre que l'activité protéolytique de celle-ci requiert la présence de sous-unités ATPasiques. Ceci suggère que l'activité répresseur de ClpP dans le développement de la compétence requiert son association avec une ATPase Clp. Cependant, nos résultats montrent que ni ClpC, ni ClpE ne sont impliqués dans ce processus. Le rôle des deux autres ATPases Clp présentes chez *S. pneumoniae*, sera donc évalué.

En effet, deux nouveaux gènes *clp* codant des ATPases ont été identifiés. Le premier présente d'importantes similitudes avec le gène *clpX* de *S. aureus*, lequel avait été mis en évidence lors d'un crible pour de nouveaux gènes de virulence par STM. Récemment, ce gène a été décrit comme un gène essentiel de *S. pneumoniae* (Robertson et coll., 2003), suggérant son implication dans une fonction clé du développement cellulaire. Le second est un homologue du gène *clpL* de *L. lactis*, et a été mis en évidence au cours d'une recherche de type STM (Hava et Camilli, 2002). L'analyse de sa séquence promotrice a révélé la présence de plusieurs motifs de liaison pour le régulateur CtsR, séparés par une courte phase ouverte de lecture précédant celle codant ClpL. La structure de ce promoteur n'est pas conservée dans les gènes *clpL* des autres streptocoques suggérant une spécificité de *S. pneumoniae*. L'analyse du mode de régulation de ces deux gènes *clp* sera entreprise et leur rôle potentiel, dans le développement de la compétence naturelle, de la résistance aux stress et de la virulence, sera évalué.

### **Les Clp de *L. monocytogenes***

Contrairement à *clpC*, *clpP* et *clpE* de *L. monocytogenes*, *clpB* n'est pas requis pour la résistance générale aux stress, bien que comme eux il soit impliqué dans le développement du pouvoir pathogène. Tandis que sa fonction exacte reste inconnue, son rôle dans la tolérance induite aux stress thermiques létaux le rapproche phénotypiquement de *clpB* de *Synechococcus* sp. La poursuite de l'analyse phénotypique du mutant  $\Delta clpB$  sera réalisée, en particulier par l'évaluation de sa capacité de multiplication *in vivo* dans différents organes (foie, rate, poumons) et *in vitro* dans les lignées cellulaires (adhésion, invasion). Ceci pourrait révéler les étapes du processus infectieux perturbées par l'absence de ce gène, et suggérer des pistes quant aux cibles potentielles de ClpB.

D'autre part, l'analyse du génome complet de la souche EGD-e a révélé la présence d'une seconde copie du gène *clpP*. L'étude de sa séquence promotrice indique qu'il pourrait appartenir au régulon CtsR. Il existe peu d'exemples dans la littérature d'espèces présentant plusieurs copies de *clpP*, et une seule chez les bactéries Gram-positives à bas GC %



(*B. thuringiensis*) (Fedhila et coll., 2002). Cependant, la recherche systématique des *clp* dans les génomes des bactéries Gram-positives révèle que cette situation est relativement fréquente dans l'ordre des Bacillales (Table 3). A ce jour, l'étude des différents *clpP* d'une même bactérie a toujours mis en évidence des fonctions spécifiques pour chacun, indiquant une non-redondance de fonction. Il serait donc intéressant d'évaluer le rôle de *clpP2* de *L. monocytogenes*, tant dans l'adaptation aux stress, que dans la virulence de ce pathogène.

De manière générale, bien que les connaissances sur les *clp* des bactéries Gram-positives aient augmenté de manière très importante ces dernières années, leur étude est globalement limitée à des approches exclusivement génétiques. En effet, seules les protéines Clp présentes chez les bactéries Gram-négatives, comme ClpA, ClpB, ClpY de *E. coli* et *Thermus thermophilus*, sont aujourd'hui l'objet d'études biochimiques avancées. Bien que ces résultats permettent certaines extrapolations à leurs orthologues des bactéries Gram-positives, il est probable que ces dernières aient acquis des caractéristiques spécifiques. D'autres part, plusieurs protéines ne sont présentes que chez les bactéries Gram-positives, comme ClpC, ClpE et ClpL, et leur rôle demeure pour le moment largement méconnu.

## **Références bibliographiques**

## A

1. **Ades, S.E., Connolly, L.E., Alba, B.M., et Gross, C.A. 1999.** The *Escherichia coli* sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-sigma factor. *Genes Dev* 13:2449-2461.
2. **Ahmad, S., Selvapandiyan, A., Gasbarri, M., et Bhatnagar, R.K. 1999.** Molecular cloning of the *dnaK* gene region from *Bacillus sphaericus* in the context of genomic comparisons. *Microb Comp Genomics* 4:47-58.
3. **Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., et Glaser, G. 1996.** An *Escherichia coli* chromosomal "addiction module" regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6059-6063.
4. **Akbar, S., Gaidenko, T.A., Kang, C.M., O'Reilly, M., Devine, K.M., et Price, C.W. 2001.** New family of regulators in the environmental signaling pathway which activates the general stress transcription factor sigma(B) of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183:1329-1338.
5. **Akbar, S., Kang, C.M., Gaidenko, T.A., et Price, C.W. 1997.** Modulator protein RsbR regulates environmental signalling in the general stress pathway of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 24:567-578.
6. **Alba, B.M., Leeds, J.A., Onufryk, C., Lu, C.Z., et Gross, C.A. 2002.** DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response. *Genes Dev* 16:2156-2168.
7. **Alba, B.M., Zhong, H.J., Pelayo, J.C., et Gross, C.A. 2001.** *degS* (*hhoB*) is an essential *Escherichia coli* gene whose indispensable function is to provide sigma (E) activity. *Mol Microbiol* 40:1323-1333.
8. **Allan, E., Mullany, P., et Tabaqchali, S. 1998.** Construction and characterization of a *Helicobacter pylori clpB* mutant and role of the gene in the stress response. *J Bacteriol* 180:426-429.
9. **Alper, S., Dufour, A., Garsin, D.A., Duncan, L., et Losick, R. 1996.** Role of adenosine nucleotides in the regulation of a stress-response transcription factor in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 260:165-177.
10. **Anagnostopoulos, C., et Spizizen, J. 1961.** Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 81:741-746.
11. **Antelmann, H., Engelmann, S., Schmid, R., et Hecker, M. 1996.** General and oxidative stress responses in *Bacillus subtilis*: cloning, expression, and mutation of the alkyl hydroperoxide reductase operon. *J Bacteriol* 178:6571-6578.
12. **Arvidson, S. 2000.** Extracellular enzymes. In *Gram-Positive Pathogens*. Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A. et Rood, J.I. (eds). Washington, DC: ASM Press.

13. **Arvidson, S., et Tegmark, K. 2001.** Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 291:159-170.

14. **Avery, O.T. 1944.** Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types *in vitro*. *J. Exp. Med.* 79:137-157.

## B

15. **Babst, M., Hennecke, H., et Fischer, H.M. 1996.** Two different mechanisms are involved in the heat-shock regulation of chaperonin gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Microbiol* 19:827-839.

16. **Badger, J.L., Young, B.M., Darwin, A.J., et Miller, V.L. 2000.** *Yersinia enterocolitica* ClpB affects levels of invasins and motility. *J Bacteriol* 182:5563-5571.

17. **Barnett, M.E., Zolkiewska, A., et Zolkiewski, M. 2000.** Structure and activity of ClpB from *Escherichia coli*. Role of the amino- and -carboxyl-terminal domains. *J Biol Chem* 275:37565-37571.

18. **Bartley, J. 2002.** First case of VRSA identified in Michigan. *Infect Control Hosp Epidemiol* 23:480.

19. **Benson, A.K., et Haldenwang, W.G. 1992.** Characterization of a regulatory network that controls sigma B expression in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 174:749-757.

20. **Benson, A.K., et Haldenwang, W.G. 1993a.** The sigma B-dependent promoter of the *Bacillus subtilis sigB* operon is induced by heat shock. *J Bacteriol* 175:1929-1935.

21. **Benson, A.K., et Haldenwang, W.G. 1993b.** *Bacillus subtilis* sigma B is regulated by a binding protein (RsbW) that blocks its association with core RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2330-2334.

22. **Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J., et Hopwood, D.A. 2002.** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417:141-147.

23. **Benvenisti, L., Koby, S., Rutman, A., Giladi, H., Yura, T., et Oppenheim, A.B. 1995.** Cloning and primary sequence of the *rpoH* gene from *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 155:73-76.

24. **Binnie, C., Lampe, M., et Losick, R. 1986.** Gene encoding the sigma 37 species of RNA polymerase sigma factor from *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:5943-5947.

25. **Blaszczak, A., Georgopoulos, C., et Liberek, K. 1999.** On the mechanism of FtsH-dependent degradation of the sigma 32 transcriptional regulator of *Escherichia coli* and the role of the DnaK chaperone machine. *Mol Microbiol* 31:157-166.

26. **Blaszczak, A., Zylicz, M., Georgopoulos, C., et Liberek, K. 1995.** Both ambient temperature and the DnaK chaperone machine modulate the heat shock response in *Escherichia coli* by regulating the switch between sigma 70 and sigma 32 factors assembled with RNA polymerase. *Embo J* 14:5085-5093.
27. **Bochtler, M., Hartmann, C., Song, H.K., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., et Huber, R. 2000.** The structures of HsIU and the ATP-dependent protease HsIU-HsIV. *Nature* 403:800-805.
28. **Bohach, G.A., et Foster, T.J. 2000.** *Staphylococcus aureus* exotoxins. In *Gram-Positive Pathogens*. Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A. et Rood, J.I. (eds). Washington, DC: ASM Press.
29. **Borézée, E., Pellegrini, E., Beretti, J.L., et Berche, P. 2001.** SvpA, a novel surface virulence-associated protein required for intracellular survival of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* 147:2913-2923.
30. **Boylan, S.A., Rutherford, A., Thomas, S.M., et Price, C.W. 1992.** Activation of *Bacillus subtilis* transcription factor sigma B by a regulatory pathway responsive to stationary-phase signals. *J Bacteriol* 174:3695-3706.
31. **Brody, M.S., Vijay, K., et Price, C.W. 2001.** Catalytic function of an alpha/beta hydrolase is required for energy stress activation of the sigma(B) transcription factor in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183:6422-6428.
32. **Brown, J.S., et Holden, D.W. 2002.** Iron acquisition by Gram-positive bacterial pathogens. *Microbes Infect* 4:1149-1156.
33. **Bucca, G., Brassington, A.M., Schonfeld, H.J., et Smith, C.P. 2000.** The HspR regulon of *Streptomyces coelicolor*: a role for the DnaK chaperone as a transcriptional co-repressordagger. *Mol Microbiol* 38:1093-1103.
34. **Bucca, G., Ferina, G., Puglia, A.M., et Smith, C.P. 1995.** The *dnaK* operon of *Streptomyces coelicolor* encodes a novel heat-shock protein which binds to the promoter region of the operon. *Mol Microbiol* 17:663-674.
35. **Buchmeier, N.A., et Heffron, F. 1990.** Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages. *Science* 248:730-732.
36. **Bukau, B. 1993.** Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol Microbiol* 9:671-680.
37. **Burkholder, P.R., et Giles Jr., N.H. 1947.** Induced biochemical mutations in *Bacillus subtilis*. *Am. J. Bot.* 34:345-348.

## C

38. **Chan, P.F., Foster, S.J., Ingham, E., et Clements, M.O. 1998.** The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor sigmaB controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. *J Bacteriol* 180:6082-6089.

39. **Charpentier, E., Novak, R., et Tuomanen, E. 2000.** Regulation of growth inhibition at high temperature, autolysis, transformation and adherence in *Streptococcus pneumoniae* by *clpC*. *Mol Microbiol* 37:717-726.
40. **Cheung, A.L., Chien, Y.T., et Bayer, A.S. 1999.** Hyperproduction of alpha-hemolysin in a *sigB* mutant is associated with elevated SarA expression in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 67:1331-1337.
41. **Claverys, J.P., et Havarstein, L.S. 2002.** Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in. *Front Biosci* 7:d1798-1814.
42. **Claverys, J.P., Prudhomme, M., Mortier-Barriere, I., et Martin, B. 2000.** Adaptation to the environment: *Streptococcus pneumoniae*, a paradigm for recombination-mediated genetic plasticity? *Mol Microbiol* 35:251-259.
43. **Clos, J., Klaholz, L., Kroemer, M., Krobitsch, S., et Lindquist, S. 2001.** Heat shock protein 100 and the amastigote stage-specific A2 proteins of *Leishmania donovani*. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 190:47-50.
44. **Collinet, B., Yuzawa, H., Chen, T., Herrera, C., et Missiakas, D. 2000.** RseB binding to the periplasmic domain of RseA modulates the RseA:sigmaE interaction in the cytoplasm and the availability of sigmaE.RNA polymerase. *J Biol Chem* 275:33898-33904.
45. **Cossart, P., et Lecuit, M. 1998.** Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *Embo J* 17:3797-3806.

## D

46. **Danese, P.N., et Silhavy, T.J. 1997.** The sigma(E) and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 11:1183-1193.
47. **Darmon, E., Noone, D., Masson, A., Bron, S., Kuipers, O.P., Devine, K.M., et van Dijl, J.M. 2002.** A novel class of heat and secretion stress-responsive genes is controlled by the autoregulated CsxRS two-component system of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 184:5661-5671.
48. **Dartigalongue, C., Loferer, H., et Raina, S. 2001a.** EcfE, a new essential inner membrane protease: its role in the regulation of heat shock response in *Escherichia coli*. *Embo J* 20:5908-5918.
49. **Dartigalongue, C., Missiakas, D., et Raina, S. 2001b.** Characterization of the *Escherichia coli* sigma E regulon. *J Biol Chem* 276:20866-20875.
50. **de Crecy-Lagard, V., Servant-Moisson, P., Viala, J., Grandvalet, C., et Mazodier, P. 1999.** Alteration of the synthesis of the Clp ATP-dependent protease affects morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. *Mol Microbiol* 32:505-517.

51. **De Las Penas, A., Connolly, L., et Gross, C.A. 1997.** The sigmaE-mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of sigmaE. *Mol Microbiol* 24:373-385.
52. **Deora, R., Tseng, T., et Misra, T.K. 1997.** Alternative transcription factor sigmaSB of *Staphylococcus aureus*: characterization and role in transcription of the global regulatory locus *sar*. *J Bacteriol* 179:6355-6359.
53. **Derré, I., Rapoport, G., Devine, K., Rose, M., et Msadek, T. 1999a.** ClpE, a novel type of HSP100 ATPase, is part of the CtsR heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 32:581-593.
54. **Derré, I., Rapoport, G., et Msadek, T. 1999b.** CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 31:117-131.
55. **Derré, I., Rapoport, G., et Msadek, T. 2000.** The CtsR regulator of stress response is active as a dimer and specifically degraded in vivo at 37 degrees C. *Mol Microbiol* 38:335-347.
56. **Deuerling, E., Paeslack, B., et Schumann, W. 1995.** The *ftsH* gene of *Bacillus subtilis* is transiently induced after osmotic and temperature upshift. *J Bacteriol* 177:4105-4112.
57. **Doyle, M.P., Glass, K.A., Beery, J.T., Garcia, G.A., Pollard, D.J., et Schultz, R.D. 1987.** Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. *Appl Environ Microbiol* 53:1433-1438.
58. **Dubnau, D. 1999.** DNA uptake in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 53:217-244.
59. **Duchene, A.M., Thompson, C.J., et Mazodier, P. 1994.** Transcriptional analysis of *groEL* genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Gen Genet* 245:61-68.
60. **Dufour, A., et Haldenwang, W.G. 1994.** Interactions between a *Bacillus subtilis* anti-sigma factor (RsbW) and its antagonist (RsbV). *J Bacteriol* 176:1813-1820.
61. **Duncan, M.L., Kalman, S.S., Thomas, S.M., et Price, C.W. 1987.** Gene encoding the 37,000-dalton minor sigma factor of *Bacillus subtilis* RNA polymerase: isolation, nucleotide sequence, chromosomal locus, and cryptic function. *J Bacteriol* 169:771-778.

## E

62. **Ekaza, E., Guilloteau, L., Teyssier, J., Liautard, J.P., et Kohler, S. 2000.** Functional analysis of the ClpATPase ClpA of *Brucella suis*, and persistence of a knockout mutant in BALB/c mice. *Microbiology* 146 ( Pt 7):1605-1616.
63. **Ekaza, E., Teyssier, J., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J.P., et Kohler, S. 2001.** Characterization of *Brucella suis* *clpB* and *clpAB* mutants and participation of the genes in stress responses. *J Bacteriol* 183:2677-2681.
64. **Engelmann, S., et Hecker, M. 1996.** Impaired oxidative stress resistance of *Bacillus subtilis* *sigB* mutants and the role of *katA* and *katE*. *FEMS Microbiol Lett* 145:63-69.

65. **Erickson, J.W., et Gross, C.A. 1989.** Identification of the sigma E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate sigma factor involved in high-temperature gene expression. *Genes Dev* 3:1462-1471.
66. **Erickson, J.W., Vaughn, V., Walter, W.A., Neidhardt, F.C., et Gross, C.A. 1987.** Regulation of the promoters and transcripts of *rpoH*, the *Escherichia coli* heat shock regulatory gene. *Genes Dev* 1:419-432.
67. **Eriksson, M.J., et Clarke, A.K. 1996.** The heat shock protein ClpB mediates the development of thermotolerance in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* 178:4839-4846.

## F

68. **Fedhila, S., Msadek, T., Nel, P., et Lereclus, D. 2002.** Distinct *clpP* genes control specific adaptive responses in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol* 184:5554-5562.
69. **Ferrero, R.L., Thiberge, J.M., Kansau, I., Wuscher, N., Huerre, M., et Labigne, A. 1995.** The GroES homolog of *Helicobacter pylori* confers protective immunity against mucosal infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6499-6503.
70. **Flanagan, J.M., Wall, J.S., Capel, M.S., Schneider, D.K., et Shanklin, J. 1995.** Scanning transmission electron microscopy and small-angle scattering provide evidence that native *Escherichia coli* ClpP is a tetradecamer with an axial pore. *Biochemistry* 34:10910-10917.
71. **Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., et et al. 1995.** Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269:496-512.
72. **Fleming, D.W., Cochi, S.L., MacDonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Plikaytis, B.D., Holmes, M.B., Audurier, A., Broome, C.V., et Reingold, A.L. 1985.** Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N Engl J Med* 312:404-407.
73. **Foster, J.W. 1999.** When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. *Curr Opin Microbiol* 2:170-174.
74. **Frank, E.G., Ennis, D.G., Gonzalez, M., Levine, A.S., et Woodgate, R. 1996.** Regulation of SOS mutagenesis by proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10291-10296.
75. **Frees, D., et Ingmer, H. 1999.** ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* 31:79-87.

## G

76. **Gahan, C.G., O'Mahony, J., et Hill, C. 2001.** Characterization of the *groESL* operon in *Listeria monocytogenes*: utilization of two reporter systems (*gfp* and *hly*) for evaluating in vivo expression. *Infect Immun* 69:3924-3932.



77. **Gaidenko, T.A., Yang, X., Lee, Y.M., et Price, C.W. 1999.** Threonine phosphorylation of modulator protein RsbR governs its ability to regulate a serine kinase in the environmental stress signaling pathway of *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 288:29-39.
78. **Gaillot, O., Bregenholt, S., Jaubert, F., Di Santo, J.P., et Berche, P. 2001.** Stress-induced ClpP serine protease of *Listeria monocytogenes* is essential for induction of listeriolysin O-dependent protective immunity. *Infect Immun* 69:4938-4943.
79. **Gaillot, O., Pellegrini, E., Bregenholt, S., Nair, S., et Berche, P. 2000.** The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 35:1286-1294.
80. **Gamer, J., Bujard, H., et Bukau, B. 1992.** Physical interaction between heat shock proteins DnaK, DnaJ, and GrpE and the bacterial heat shock transcription factor sigma 32. *Cell* 69:833-842.
81. **Gamer, J., Multhaup, G., Tomoyasu, T., McCarty, J.S., Rudiger, S., Schonfeld, H.J., Schirra, C., Bujard, H., et Bukau, B. 1996.** A cycle of binding and release of the DnaK, DnaJ and GrpE chaperones regulates activity of the *Escherichia coli* heat shock transcription factor sigma32. *Embo J* 15:607-617.
82. **Garcia, E., Arrecubieta, C., Munos, R., Mollerach, M., et Rubens, L. 2000.** A functional analysis of the *Streptococcus pneumoniae* genes involved in the synthesis of type 1 and 3 Capsular polysaccharides. In *Streptococcus pneumoniae - Molecular biology and mechanisms of disease*. Tomasz, A. (ed). New York, pp. 139-154.
83. **Garvin, L.D., et Hardies, S.C. 1989.** Nucleotide sequence for the *htpR* gene from *Citrobacter freundii*. *Nucleic Acids Res* 17:4889.
84. **Gerth, U., Kruger, E., Derre, I., Msadek, T., et Hecker, M. 1998.** Stress induction of the *Bacillus subtilis clpP* gene encoding a homologue of the proteolytic component of the Clp protease and the involvement of ClpP and ClpX in stress tolerance. *Mol Microbiol* 28:787-802.
85. **Gerth, U., Wipat, A., Harwood, C.R., Carter, N., Emmerson, P.T., et Hecker, M. 1996.** Sequence and transcriptional analysis of *clpX*, a class-III heat-shock gene of *Bacillus subtilis*. *Gene* 181:77-83.
86. **Gertz, S., Engelmann, S., Schmid, R., Ziebandt, A.K., Tischler, K., Scharf, C., Hacker, J., et Hecker, M. 2000.** Characterization of the sigma(B) regulon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 182:6983-6991.
87. **Giffard, P.M., Rathsam, C., Kwan, E., Kwan, D.W., Bunny, K.L., Koo, S.P., et Jacques, N.A. 1993.** The *fff* gene encoding the cell-bound fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 is preceded by an insertion sequence and followed by *FUR1* and *clpP* homologues. *J Gen Microbiol* 139 ( Pt 5):913-920.
88. **Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couve, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Dominguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K.D., Fsihi, H., Portillo, F.G., Garrido, P., Gautier,**

- L., Goebel, W., Gomez-Lopez, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L.M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Vicente, J.M., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Perez-Diaz, J.C., Purcell, R., Rimmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vazquez-Boland, J.A., Voss, H., Wehland, J., et Cossart, P. 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294:849-852.
89. Glaser, P., Rusniok, C., Buchrieser, C., Chevalier, F., Frangeul, L., Msadek, T., Zouine, M., Couve, E., Lalioui, L., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., et Kunst, F. 2002. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Mol Microbiol* 45:1499-1513.
90. Glover, J.R., et Lindquist, S. 1998. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 94:73-82.
91. Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A.P., Tomoyasu, T., et Bukau, B. 1999. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13732-13737.
92. Gottesman, S., Clark, W.P., de Crecy-Lagard, V., et Maurizi, M.R. 1993. ClpX, an alternative subunit for the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Sequence and in vivo activities. *J Biol Chem* 268:22618-22626.
93. Gottesman, S., Clark, W.P., et Maurizi, M.R. 1990. The ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Sequence of *clpA* and identification of a Clp-specific substrate. *J Biol Chem* 265:7886-7893.
94. Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y., et Sauer, R.T. 1998. The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev* 12:1338-1347.
95. Grandvalet, C., de Crecy-Lagard, V., et Mazodier, P. 1999. The ClpB ATPase of *Streptomyces albus G* belongs to the HspR heat shock regulon. *Mol Microbiol* 31:521-532.
96. Grandvalet, C., Rapoport, G., et Mazodier, P. 1998. *hrcA*, encoding the repressor of the *groEL* genes in *Streptomyces albus G*, is associated with a second *dnaJ* gene. *J Bacteriol* 180:5129-5134.
97. Grandvalet, C., Servant, P., et Mazodier, P. 1997. Disruption of *hspR*, the repressor gene of the *dnaK* operon in *Streptomyces albus G*. *Mol Microbiol* 23:77-84.
98. Gray, C.G., Cowley, S.C., Cheung, K.K., et Nano, F.E. 2002. The identification of five genetic loci of *Francisella novicida* associated with intracellular growth. *FEMS Microbiol Lett* 215:53-56.
99. Gross, C.A. 1996. Function and regulation of heat shock proteins. In *Escherichia coli and Salmonella : Cellular and Molecular Biology*. Vol. 1382-1389. Neidhardt, F.C., Curtiss, R.r., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanic, B., Reznicoff, W.F., Riley, M., Schaechter, M. et Umberger, H.E. (eds). Washington, D.C.: ASM Press.
100. Grossman, A.D., Erickson, J.W., et Gross, C.A. 1984. The *htpR* gene product of *E. coli* is a sigma factor for heat-shock promoters. *Cell* 38:383-390.

101. **Guglielmi, G., Duchêne, A.-M., Thompson, C., et Mazodier, P. 1993.** Transcriptional analysis of two different *Streptomyces albus groEL*-like genes. In *Industrial microorganism: basic and applied molecular genetics*. Baltz, R.H., Hegeman, G.D. et Skatrud, P.L. (eds). Washington, D. C.: ASM, pp. 17-24.

102. **Guo, F., Maurizi, M.R., Esser, L., et Xia, D. 2002.** Crystal structure of ClpA, an Hsp100 chaperone and regulator of ClpAP protease. *J Biol Chem* 277:46743-46752.

## H

103. **Haldenwang, W.G., et Losick, R. 1979.** A modified RNA polymerase transcribes a cloned gene under sporulation control in *Bacillus subtilis*. *Nature* 282:256-260.

104. **Hava, D.L., et Camilli, A. 2002.** Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol Microbiol* 45:1389-1406.

105. **Hecker, M., Schumann, W., et Volker, U. 1996.** Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 19:417-428.

106. **Helmann, J.D., Wu, M.F., Kobel, P.A., Gamo, F.J., Wilson, M., Morshedi, M.M., Navre, M., et Paddon, C. 2001.** Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. *J Bacteriol* 183:7318-7328.

107. **Hensel, M., Shea, J.E., Gleeson, C., Jones, M.D., Dalton, E., et Holden, D.W. 1995.** Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* 269:400-403.

108. **Herman, C., Thevenet, D., D'Ari, R., et Bouloc, P. 1995.** Degradation of sigma 32, the heat shock regulator in *Escherichia coli*, is governed by HflB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3516-3520.

109. **Hiratsu, K., Amemura, M., Nashimoto, H., Shinagawa, H., et Makino, K. 1995.** The *rpoE* gene of *Escherichia coli*, which encodes sigma E, is essential for bacterial growth at high temperature. *J Bacteriol* 177:2918-2922.

110. **Hitomi, M., Nishimura, H., Tsujimoto, Y., Matsui, H., et Watanabe, K. 2003.** Identification of a helix-turn-helix motif of *Bacillus thermoglucosidasius* HrcA essential for binding to the CIRCE element and thermostability of the HrcA-CIRCE complex, indicating a role as a thermosensor. *J Bacteriol* 185:381-385.

111. **Homuth, G., Domm, S., Kleiner, D., et Schumann, W. 2000.** Transcriptional analysis of major heat shock genes of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 182:4257-4263.

112. **Homuth, G., Masuda, S., Mogk, A., Kobayashi, Y., et Schumann, W. 1997.** The *dnaK* operon of *Bacillus subtilis* is heptacistronic. *J Bacteriol* 179:1153-1164.

113. **Homuth, G., Mogk, A., et Schumann, W. 1999.** Post-transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis dnaK* operon. *Mol Microbiol* 32:1183-1197.

114. **Höök, M., et Foster, T.J. 2000.** Staphylococcal surface proteins. In *Gram-Positive Pathogens*. Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A. et Rood, J.I. (eds). Washington, DC: ASM Press.
115. **Horsburgh, M.J., Aish, J.L., White, I.J., Shaw, L., Lithgow, J.K., et Foster, S.J. 2002.** sigmaB modulates virulence determinant expression and stress resistance: characterization of a functional *rsbU* strain derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J Bacteriol* 184:5457-5467.
116. **Horsburgh, M.J., Clements, M.O., Crossley, H., Ingham, E., et Foster, S.J. 2001.** PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 69:3744-3754.
117. **Hoskins, J., Alborn, W.E., Jr., Arnold, J., Blaszcak, L.C., Burgett, S., DeHoff, B.S., Estrem, S.T., Fritz, L., Fu, D.J., Fuller, W., Geringer, C., Gilmour, R., Glass, J.S., Khoja, H., Kraft, A.R., Lagace, R.E., LeBlanc, D.J., Lee, L.N., Lefkowitz, E.J., Lu, J., Matsushima, P., McAhren, S.M., McHenney, M., McLeaster, K., Mundy, C.W., Nicas, T.I., Norris, F.H., O'Gara, M., Peery, R.B., Robertson, G.T., Rockey, P., Sun, P.M., Winkler, M.E., Yang, Y., Young-Bellido, M., Zhao, G., Zook, C.A., Baltz, R.H., Jaskunas, S.R., Rosteck, P.R., Jr., Skatrud, P.L., et Glass, J.I. 2001.** Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol* 183:5709-5717.
118. **Hoskins, J.R., Pak, M., Maurizi, M.R., et Wickner, S. 1998.** The role of the ClpA chaperone in proteolysis by ClpAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12135-12140.
119. **Hoskins, J.R., Singh, S.K., Maurizi, M.R., et Wickner, S. 2000.** Protein binding and unfolding by the chaperone ClpA and degradation by the protease ClpAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8892-8897.
120. **Huang, D.C., Huang, X.F., Novel, G., et Novel, M. 1993.** Two genes present on a transposon-like structure in *Lactococcus lactis* are involved in a Clp-family proteolytic activity. *Mol Microbiol* 7:957-965.
121. **Hubel, A., Brandau, S., Dresel, A., et Clos, J. 1995.** A member of the ClpB family of stress proteins is expressed during heat shock in *Leishmania* spp. *Mol Biochem Parasitol* 70:107-118.
122. **Hubel, A., Krobitsch, S., Horauf, A., et Clos, J. 1997.** *Leishmania major* Hsp100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite. *Mol Cell Biol* 17:5987-5995.
123. **Hung, D.Y., et Shapiro, L. 2002.** A signal transduction protein cues proteolytic events critical to *Caulobacter* cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13160-13165.
124. **Hurme, R., Berndt, K.D., Normark, S.J., et Rhen, M. 1997.** A proteinaceous gene regulatory thermometer in *Salmonella*. *Cell* 90:55-64.
125. **Hyyrylainen, H.L., Bolhuis, A., Darmon, E., Muukkonen, L., Koski, P., Vitikainen, M., Sarvas, M., Pragai, Z., Bron, S., van Dijl, J.M., et Kontinen, V.P. 2001.** A novel two-component regulatory system in *Bacillus subtilis* for the survival of severe secretion stress. *Mol Microbiol* 41:1159-1172.

## I

126. **Igo, M., Lampe, M., Ray, C., Schafer, W., Moran, C.P., Jr., et Losick, R. 1987.** Genetic studies of a secondary RNA polymerase sigma factor in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 169:3464-3469.

## J

127. **Jayaraman, G.C., Penders, J.E., et Burne, R.A. 1997.** Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans* *hrcA*, *grpE* and *dnaK* genes and regulation of expression in response to heat shock and environmental acidification. Mol Microbiol 25:329-341.

128. **Jedrzejak, M.J. 2001.** Pneumococcal virulence factors: structure and function. Microbiol Mol Biol Rev 65:187-207 ; first page, table of contents.

129. **Jenal, U., et Fuchs, T. 1998.** An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. Embo J 17:5658-5669.

130. **Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., et Cossart, P. 2002.** An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. Cell 110:551-561.

131. **Jones, J.M., Welty, D.J., et Nakai, H. 1998.** Versatile action of *Escherichia coli* ClpXP as protease or molecular chaperone for bacteriophage Mu transposition. J Biol Chem 273:459-465.

## K

132. **Kallipolitis, B.H., et Valentin-Hansen, P. 1998.** Transcription of *rpoH*, encoding the *Escherichia coli* heat-shock regulator sigma32, is negatively controlled by the cAMP-CRP/CytR nucleoprotein complex. Mol Microbiol 29:1091-1099.

133. **Kalman, S., Duncan, M.L., Thomas, S.M., et Price, C.W. 1990.** Similar organization of the *sigB* and *spoIIA* operons encoding alternate sigma factors of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. J Bacteriol 172:5575-5585.

134. **Kamath-Loeb, A.S., et Gross, C.A. 1991.** Translational regulation of sigma 32 synthesis: requirement for an internal control element. J Bacteriol 173:3904-3906.

135. **Kanehara, K., Ito, K., et Akiyama, Y. 2002.** YaeL (EcfE) activates the sigma(E) pathway of stress response through a site-2 cleavage of anti-sigma(E), RseA. Genes Dev 16:2147-2155.

136. **Kanemori, M., Nishihara, K., Yanagi, H., et Yura, T. 1997.** Synergistic roles of HslVU and other ATP-dependent proteases in controlling *in vivo* turnover of sigma32 and abnormal proteins in *Escherichia coli*. J Bacteriol 179:7219-7225.

137. **Kanemori, M., Yanagi, H., et Yura, T. 1999a.** Marked instability of the sigma(32) heat shock transcription factor at high temperature. Implications for heat shock regulation. *J Biol Chem* 274:22002-22007.
138. **Kanemori, M., Yanagi, H., et Yura, T. 1999b.** The ATP-dependent HslVU/ClpQY protease participates in turnover of cell division inhibitor SulA in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181:3674-3680.
139. **Kang, C.M., Brody, M.S., Akbar, S., Yang, X., et Price, C.W. 1996.** Homologous pairs of regulatory proteins control activity of *Bacillus subtilis* transcription factor sigma(b) in response to environmental stress. *J Bacteriol* 178:3846-3853.
140. **Kang, C.M., Vijay, K., et Price, C.W. 1998.** Serine kinase activity of a *Bacillus subtilis* switch protein is required to transduce environmental stress signals but not to activate its target PP2C phosphatase. *Mol Microbiol* 30:189-196.
141. **Katayama, T., Kubota, T., Takata, M., Akimitsu, N., et Sekimizu, K. 1996.** Disruption of the *hslU* gene, which encodes an ATPase subunit of the eukaryotic 26S proteasome homolog in *Escherichia coli*, suppresses the temperature-sensitive *dnaA46* mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 229:219-224.
142. **Katayama, Y., Gottesman, S., Pumphrey, J., Rudikoff, S., Clark, W.P., et Maurizi, M.R. 1988.** The two-component, ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Purification, cloning, and mutational analysis of the ATP-binding component. *J Biol Chem* 263:15226-15236.
143. **Katayama-Fujimura, Y., Gottesman, S., et Maurizi, M.R. 1987.** A multiple-component, ATP-dependent protease from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 262:4477-4485.
144. **Kessel, M., Maurizi, M.R., Kim, B., Kocsis, E., Trus, B.L., Singh, S.K., et Steven, A.C. 1995.** Homology in structural organization between *E. coli* ClpAP protease and the eukaryotic 26 S proteasome. *J Mol Biol* 250:587-594.
145. **Kessel, M., Wu, W., Gottesman, S., Kocsis, E., Steven, A.C., et Maurizi, M.R. 1996.** Six-fold rotational symmetry of ClpQ, the *E. coli* homolog of the 20S proteasome, and its ATP-dependent activator, ClpY. *FEBS Lett* 398:274-278.
146. **Khattar, M.M. 1997.** Overexpression of the *hslVU* operon suppresses SOS-mediated inhibition of cell division in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 414:402-404.
147. **Kilstrup, M., Jacobsen, S., Hammer, K., et Vogensen, F.K. 1997.** Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 63:1826-1837.
148. **Kim, K.I., Cheong, G.W., Park, S.C., Ha, J.S., Woo, K.M., Choi, S.J., et Chung, C.H. 2000a.** Heptameric ring structure of the heat-shock protein ClpB, a protein-activated ATPase in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 303:655-666.
149. **Kim, K.I., Woo, K.M., Seong, I.S., Lee, Z.W., Baek, S.H., et Chung, C.H. 1998.** Mutational analysis of the two ATP-binding sites in ClpB, a heat shock protein with protein-activated ATPase activity in *Escherichia coli*. *Biochem J* 333 ( Pt 3):671-676.

150. **Kim, S.N., Kim, S.W., Pyo, S.N., et Rhee, D.K. 2001a.** Molecular cloning and characterization of *groESL* operon in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Cells* 11:360-368.
151. **Kim, Y.I., Burton, R.E., Burton, B.M., Sauer, R.T., et Baker, T.A. 2000b.** Dynamics of substrate denaturation and translocation by the ClpXP degradation machine. *Mol Cell* 5:639-648.
152. **Kim, Y.I., Levchenko, I., Fraczkowska, K., Woodruff, R.V., Sauer, R.T., et Baker, T.A. 2001b.** Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase. *Nat Struct Biol* 8:230-233.
153. **Kormanec, J., Sevcikova, B., Halgasova, N., Knirschova, R., et Rezuchova, B. 2000.** Identification and transcriptional characterization of the gene encoding the stress-response sigma factor sigma(H) in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol Lett* 189:31-38.
154. **Kreiswirth, B.N., Lofdahl, S., Betley, M.J., O'Reilly, M., Schlievert, P.M., Bergdoll, M.S., et Novick, R.P. 1983.** The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature* 305:709-712.
155. **Krobitsch, S., Brandau, S., Hoyer, C., Schmetz, C., Hubel, A., et Clos, J. 1998.** *Leishmania donovani* heat shock protein 100. Characterization and function in amastigote stage differentiation. *J Biol Chem* 273:6488-6494.
156. **Krobitsch, S., et Clos, J. 1999.** A novel role for 100 kD heat shock proteins in the parasite *Leishmania donovani*. *Cell Stress Chaperones* 4:191-198.
157. **Kruger, E., et Hecker, M. 1998.** The first gene of the *Bacillus subtilis* *clpC* operon, *ctsR*, encodes a negative regulator of its own operon and other class III heat shock genes. *J Bacteriol* 180:6681-6688.
158. **Kruger, E., Msadek, T., et Hecker, M. 1996.** Alternate promoters direct stress-induced transcription of the *Bacillus subtilis* *clpC* operon. *Mol Microbiol* 20:713-723.
159. **Kruger, E., Msadek, T., Ohlmeier, S., et Hecker, M. 1997.** The *Bacillus subtilis* *clpC* operon encodes DNA repair and competence proteins. *Microbiology* 143 ( Pt 4):1309-1316.
160. **Kruger, E., Volker, U., et Hecker, M. 1994.** Stress induction of *clpC* in *Bacillus subtilis* and its involvement in stress tolerance. *J Bacteriol* 176:3360-3367.
161. **Kruger, E., Witt, E., Ohlmeier, S., Hanschke, R., et Hecker, M. 2000.** The *clp* proteases of *Bacillus subtilis* are directly involved in degradation of misfolded proteins. *J Bacteriol* 182:3259-3265.
162. **Kruger, E., Zuhlke, D., Witt, E., Ludwig, H., et Hecker, M. 2001.** Clp-mediated proteolysis in Gram-positive bacteria is autoregulated by the stability of a repressor. *Embo J* 20:852-863.
163. **Krukltis, R., Welty, D.J., et Nakai, H. 1996.** ClpX protein of *Escherichia coli* activates bacteriophage Mu transposase in the strand transfer complex for initiation of Mu DNA synthesis. *Embo J* 15:935-944.

164. Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Danchin, A., et al. 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature 390:249-256.

165. Kuroda, M., Kobayashi, D., Honda, K., Hayashi, H., et Ohta, T. 1999. The *hsp* operons are repressed by the *hrc37* of the *hsp70* operon in *Staphylococcus aureus*. Microbiol Immunol 43:19-27.

## L

166. Landick, R., Vaughn, V., Lau, E.T., VanBogelen, R.A., Erickson, J.W., et Neidhardt, F.C. 1984. Nucleotide sequence of the heat shock regulatory gene of *E. coli* suggests its protein product may be a transcription factor. Cell 38:175-182.

167. Lau, G.W., Haataja, S., Lonetto, M., Kensit, S.E., Marra, A., Bryant, A.P., McDevitt, D., Morrison, D.A., et Holden, D.W. 2001. A functional genomic analysis of type 3 *Streptococcus pneumoniae* virulence. Mol Microbiol 40:555-571.

168. Lee, C.Y., et Lee, J.C. 2000. Staphylococcal capsule. In *Gram-Positive Pathogens*. Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A. et Rood, J.I. (eds). Washington, DC: ASM Press.

169. Lehnerr, H., et Yarmolinsky, M.B. 1995. Addiction protein Phd of plasmid prophage P1 is a substrate of the ClpXP serine protease of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 92:3274-3277.

170. Lemos, J.A., et Burne, R.A. 2002. Regulation and Physiological Significance of ClpC and ClpP in *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 184:6357-6366.

171. Levchenko, I., Luo, L., et Baker, T.A. 1995. Disassembly of the Mu transposase tetramer by the ClpX chaperone. Genes Dev 9:2399-2408.

172. Levchenko, I., Seidel, M., Sauer, R.T., et Baker, T.A. 2000. A specificity-enhancing factor for the ClpXP degradation machine. Science 289:2354-2356.

173. Li, M., et Wong, S.L. 1992. Cloning and characterization of the *groESL* operon from *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 174:3981-3992.

174. Liberek, K., Galitski, T.P., Zylicz, M., et Georgopoulos, C. 1992. The DnaK chaperone modulates the heat shock response of *Escherichia coli* by binding to the sigma 32 transcription factor. Proc Natl Acad Sci U S A 89:3516-3520.

175. Liberek, K., et Georgopoulos, C. 1993. Autoregulation of the *Escherichia coli* heat shock response by the DnaK and DnaJ heat shock proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 90:11019-11023.



176. **Liberek, K., Wall, D., et Georgopoulos, C. 1995.** The DnaJ chaperone catalytically activates the DnaK chaperone to preferentially bind the sigma 32 heat shock transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6224-6228.
177. **Lin, J., et Ficht, T.A. 1995.** Protein synthesis in *Brucella abortus* induced during macrophage infection. *Infect Immun* 63:1409-1414.
178. **Lindquist, S., et Kim, G. 1996.** Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5301-5306.
179. **Liu, J., Cosby, W.M., et Zuber, P. 1999.** Role of lon and ClpX in the post-translational regulation of a sigma subunit of RNA polymerase required for cellular differentiation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 33:415-428.
180. **Liu, J., et Zuber, P. 1998.** A molecular switch controlling competence and motility: competence regulatory factors ComS, MecA, and ComK control sigmaD-dependent gene expression in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 180:4243-4251.
181. **Liu, J., et Zuber, P. 2000.** The ClpX protein of *Bacillus subtilis* indirectly influences RNA polymerase holoenzyme composition and directly stimulates sigma-dependent transcription. *Mol Microbiol* 37:885-897.
182. **Liu, S., Graham, J.E., Bigelow, L., Morse, P.D., 2nd, et Wilkinson, B.J. 2002.** Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Appl Environ Microbiol* 68:1697-1705.
183. **Lorenz, M.G., et Wackernagel, W. 1994.** Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev* 58:563-602.
184. **Lowy, F.D. 2000.** *Staphylococcus aureus*-Eukaryotic Cell Interactions. In *Gram-Positive Pathogens*. Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A. et Rood, J.I. (eds). Washington, DC: ASM Press.
185. **Lynch, M., et Kuramitsu, H. 2000.** Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria. *Microbes Infect* 2:1245-1255.

## M

186. **Manganelli, R., Voskuil, M.I., Schoolnik, G.K., et Smith, I. 2001.** The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigmaE: role in global gene expression and survival in macrophages. *Mol Microbiol* 41:423-437.
187. **Martirani, L., Raniello, R., Naclerio, G., Ricca, E., et De Felice, M. 2001.** Identification of the DNA-binding protein, HrcA, of *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol Lett* 198:177-182.
188. **Maurizi, M.R., Clark, W.P., Katayama, Y., Rudikoff, S., Pumphrey, J., Bowers, B., et Gottesman, S. 1990.** Sequence and structure of Clp P, the proteolytic component of the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 265:12536-12545.

189. **Meccas, J., Rouviere, P.E., Erickson, J.W., Donohue, T.J., et Gross, C.A. 1993.** The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev* 7:2618-2628.
190. **Mei, J.M., Nourbakhsh, F., Ford, C.W., et Holden, D.W. 1997.** Identification of *Staphylococcus aureus* virulence genes in a murine model of bacteraemia using signature-tagged mutagenesis. *Mol Microbiol* 26:399-407.
191. **Merrell, D.S., et Camilli, A. 2002.** Acid tolerance of gastrointestinal pathogens. *Curr Opin Microbiol* 5:51-55.
192. **Mhammedi-Alaoui, A., Pato, M., Gama, M.J., et Toussaint, A. 1994.** A new component of bacteriophage Mu replicative transposition machinery: the *Escherichia coli* ClpX protein. *Mol Microbiol* 11:1109-1116.
193. **Minder, A.C., Fischer, H.M., Hennecke, H., et Narberhaus, F. 2000.** Role of HrcA and CIRCE in the heat shock regulatory network of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 182:14-22.
194. **Misra, N., Habib, S., Ranjan, A., Hasnain, S.E., et Nath, I. 1996.** Expression and functional characterisation of the *clpC* gene of *Mycobacterium leprae*: ClpC protein elicits human antibody response. *Gene* 172:99-104.
195. **Missiakas, D., Mayer, M.P., Lemaire, M., Georgopoulos, C., et Raina, S. 1997.** Modulation of the *Escherichia coli* sigmaE (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins. *Mol Microbiol* 24:355-371.
196. **Missiakas, D., Schwager, F., Betton, J.M., Georgopoulos, C., et Raina, S. 1996.** Identification and characterization of HsIV HsIU (ClpQ ClpY) proteins involved in overall proteolysis of misfolded proteins in *Escherichia coli*. *Embo J* 15:6899-6909.
197. **Mogk, A., Homuth, G., Scholz, C., Kim, L., Schmid, F.X., et Schumann, W. 1997.** The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *Embo J* 16:4579-4590.
198. **Mogk, A., et Schumann, W. 1997.** Cloning and sequencing of the *hrcA* gene of *Bacillus stearothermophilus*. *Gene* 194:133-136.
199. **Moreno, M., Audia, J.P., Bearson, S.M., Webb, C., et Foster, J.W. 2000.** Regulation of sigma S degradation in *Salmonella enterica* var *typhimurium*: *in vivo* interactions between sigma S, the response regulator MviA(RssB) and ClpX. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2:245-254.
200. **Morita, M., Kanemori, M., Yanagi, H., et Yura, T. 1999a.** Heat-induced synthesis of sigma32 in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of rpoH mRNA secondary structure. *J Bacteriol* 181:401-410.
201. **Morita, M.T., Kanemori, M., Yanagi, H., et Yura, T. 2000.** Dynamic interplay between antagonistic pathways controlling the sigma 32 level in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5860-5865.

202. **Morita, M.T., Tanaka, Y., Kodama, T.S., Kyogoku, Y., Yanagi, H., et Yura, T. 1999b.** Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes Dev* 13:655-665.
203. **Motohashi, K., Watanabe, Y., Yohda, M., et Yoshida, M. 1999.** Heat-inactivated proteins are rescued by the DnaK.J-GrpE set and ClpB chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7184-7189.
204. **Msadek, T. 1999.** When the going gets tough: survival strategies and environmental signaling networks in *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol* 7:201-207.
205. **Msadek, T., Dartois, V., Kunst, F., Herbaud, M.L., Denizot, F., et Rapoport, G. 1998.** ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol Microbiol* 27:899-914.
206. **Msadek, T., Kunst, F., et Rapoport, G. 1994.** MecB of *Bacillus subtilis*, a member of the ClpC ATPase family, is a pleiotropic regulator controlling competence gene expression and growth at high temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5788-5792.

## N

207. **Naczynski, Z.M., Mueller, C., et Kropinski, A.M. 1995.** Cloning the gene for the heat shock response positive regulator (sigma 32 homolog) from *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Microbiol* 41:75-87.
208. **Nagai, H., Yano, R., Erickson, J.W., et Yura, T. 1990.** Transcriptional regulation of the heat shock regulatory gene *rpoH* in *Escherichia coli*: involvement of a novel catabolite-sensitive promoter. *J Bacteriol* 172:2710-2715.
209. **Nagai, H., Yuzawa, H., Kanemori, M., et Yura, T. 1994.** A distinct segment of the sigma 32 polypeptide is involved in DnaK-mediated negative control of the heat shock response in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10280-10284.
210. **Nagai, H., Yuzawa, H., et Yura, T. 1991.** Interplay of two cis-acting mRNA regions in translational control of sigma 32 synthesis during the heat shock response of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10515-10519.
211. **Nair, S., Derré, I., Msadek, T., Gaillot, O., et Berche, P. 2000a.** CtsR controls class III heat shock gene expression in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 35:800-811.
212. **Nair, S., Frehel, C., Nguyen, L., Escuyer, V., et Berche, P. 1999.** ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 31:185-196.
213. **Nair, S., Milohanic, E., et Berche, P. 2000b.** ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 68:7061-7068.
214. **Nair, S., Poyart, C., Beretti, J.L., Veiga-Fernandes, H., Berche, P., et Trieu-Cuot, P. 2003.** Role of the *Streptococcus agalactiae* ClpP serine protease in heat-induced stress defence and growth arrest. *Microbiology* 149:407-417.

215. **Nakahigashi, K., Ron, E.Z., Yanagi, H., et Yura, T. 1999.** Differential and independent roles of a sigma(32) homolog (RpoH) and an HrcA repressor in the heat shock response of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 181:7509-7515.
216. **Nakahigashi, K., Yanagi, H., et Yura, T. 1995.** Isolation and sequence analysis of rpoH genes encoding sigma 32 homologs from gram negative bacteria: conserved mRNA and protein segments for heat shock regulation. *Nucleic Acids Res* 23:4383-4390.
217. **Nakahigashi, K., Yanagi, H., et Yura, T. 1998.** Regulatory conservation and divergence of sigma32 homologs from gram-negative bacteria: *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 180:2402-2408.
218. **Nakahigashi, K., Yanagi, H., et Yura, T. 2001.** DnaK chaperone-mediated control of activity of a sigma(32) homolog (RpoH) plays a major role in the heat shock response of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 183:5302-5310.
219. **Nakano, M.M., Hajarizadeh, F., Zhu, Y., et Zuber, P. 2001.** Loss-of-function mutations in *yjbD* result in ClpX- and ClpP-independent competence development of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 42:383-394.
220. **Nakano, M.M., Nakano, S., et Zuber, P. 2002a.** Spx (YjbD), a negative effector of competence in *Bacillus subtilis*, enhances ClpC-MecA-ComK interaction. *Mol Microbiol* 44:1341-1349.
221. **Nakano, M.M., Zhu, Y., Liu, J., Reyes, D.Y., Yoshikawa, H., et Zuber, P. 2000.** Mutations conferring amino acid residue substitutions in the carboxy-terminal domain of RNA polymerase alpha can suppress *clpX* and *clpP* with respect to developmentally regulated transcription in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 37:869-884.
222. **Nakano, S., Zheng, G., Nakano, M.M., et Zuber, P. 2002b.** Multiple pathways of Spx (YjbD) proteolysis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 184:3664-3670.
223. **Nanamiya, H., Ohashi, Y., Asai, K., Moriya, S., Ogasawara, N., Fujita, M., Sadaie, Y., et Kawamura, F. 1998.** ClpC regulates the fate of a sporulation initiation sigma factor, sigmaH protein, in *Bacillus subtilis* at elevated temperatures. *Mol Microbiol* 29:505-513.
224. **Narberhaus, F. 1999.** Negative regulation of bacterial heat shock genes. *Mol Microbiol* 31:1-8.
225. **Narberhaus, F., et Bahl, H. 1992.** Cloning, sequencing, and molecular analysis of the *groESL* operon of *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* 174:3282-3289.
226. **Narberhaus, F., Giebeler, K., et Bahl, H. 1992.** Molecular characterization of the dnaK gene region of *Clostridium acetobutylicum*, including *grpE*, *dnaJ*, and a new heat shock gene. *J Bacteriol* 174:3290-3299.
227. **Narberhaus, F., Kaser, R., Nocker, A., et Hennecke, H. 1998a.** A novel DNA element that controls bacterial heat shock gene expression. *Mol Microbiol* 28:315-323.

228. Narberhaus, F., Kowarik, M., Beck, C., et Hennecke, H. 1998b. Promoter selectivity of the *Bradyrhizobium japonicum* RpoH transcription factors *in vivo* and *in vitro*. J Bacteriol 180:2395-2401.
229. Narberhaus, F., Krummenacher, P., Fischer, H.M., et Hennecke, H. 1997. Three disparately regulated genes for sigma 32-like transcription factors in *Bradyrhizobium japonicum*. Mol Microbiol 24:93-104.
230. Narberhaus, F., Weiglhofer, W., Fischer, H.M., et Hennecke, H. 1996. The *Bradyrhizobium japonicum* *rpoH1* gene encoding a sigma 32-like protein is part of a unique heat shock gene cluster together with *groESL1* and three small heat shock genes. J Bacteriol 178:5337-5346.
231. Nieto-Sotelo, J., Martinez, L.M., Ponce, G., Cassab, G.I., Alagon, A., Meeley, R.B., Ribaut, J.M., et Yang, R. 2002. Maize HSP101 plays important roles in both induced and basal thermotolerance and primary root growth. Plant Cell 14:1621-1633.
232. Nocker, A., Hausherr, T., Balsiger, S., Krstulovic, N.P., Hennecke, H., et Narberhaus, F. 2001a. A mRNA-based thermosensor controls expression of rhizobial heat shock genes. Nucleic Acids Res 29:4800-4807.
233. Nocker, A., Krstulovic, N.P., Perret, X., et Narberhaus, F. 2001b. ROSE elements occur in disparate rhizobia and are functionally interchangeable between species. Arch Microbiol 176:44-51.
234. Noone, D., Howell, A., Collery, R., et Devine, K.M. 2001. YkdA and YvtA, HtrA-like serine proteases in *Bacillus subtilis*, engage in negative autoregulation and reciprocal cross-regulation of *ykda* and *yvtA* gene expression. J Bacteriol 183:654-663.
235. Noone, D., Howell, A., et Devine, K.M. 2000. Expression of *ykda*, encoding a *Bacillus subtilis* homologue of HtrA, is heat shock inducible and negatively autoregulated. J Bacteriol 182:1592-1599.
236. Novick, R.P. 1993. Staphylococcus. In *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria*. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. et Losick, R.M. (eds). Washington, DC: ASM Press, pp. 17-33.
237. Novick, R.P. 2000. Pathogenicity factors and their regulation. In *Gram-Positive Pathogens*. Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A. et Rood, J.I. (eds). Washington, DC: ASM press.

## O

238. O'Toole, G.A., et Kolter, R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol Microbiol 28:449-461.
239. Ohta, T., Nettikadan, S., Tokumasu, F., Ideno, H., Abe, Y., Kuroda, M., Hayashi, H., et Takeyasu, K. 1996. Atomic force microscopy proposes a novel model for stem-loop structure that binds a heat shock protein in the *Staphylococcus aureus* HSP70 operon. Biochem Biophys Res Commun 226:730-734.

240. **Ohta, T., Saito, K., Kuroda, M., Honda, K., Hirata, H., et Hayashi, H. 1994.** Molecular cloning of two new heat shock genes related to the *hsp70* genes in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 176:4779-4783.

## P

241. **Pak, M., Hoskins, J.R., Singh, S.K., Maurizi, M.R., et Wickner, S. 1999.** Concurrent chaperone and protease activities of ClpAP and the requirement for the N-terminal ClpA ATP binding site for chaperone activity. *J Biol Chem* 274:19316-19322.

242. **Pan, Q., Garsin, D.A., et Losick, R. 2001.** Self-reinforcing activation of a cell-specific transcription factor by proteolysis of an anti-sigma factor in *B. subtilis*. *Mol Cell* 8:873-883.

243. **Parsell, D.A., Kowal, A.S., Singer, M.A., et Lindquist, S. 1994.** Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* 372:475-478.

244. **Pasteur, L. 1881.** Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Bull. Acad. Méd.* 10:94-103.

245. **Pederson, K.J., Carlson, S., et Pierson, D.E. 1997.** The ClpP protein, a subunit of the Clp protease, modulates *ail* gene expression in *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* 26:99-107.

246. **Persuh, M., Mandic-Mulec, I., et Dubnau, D. 2002.** A MecA paralog, YpbH, binds ClpC, affecting both competence and sporulation. *J Bacteriol* 184:2310-2313.

247. **Petersohn, A., Antelmann, H., Gerth, U., et Hecker, M. 1999a.** Identification and transcriptional analysis of new members of the *sigmaB* regulon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 145 ( Pt 4):869-880.

248. **Petersohn, A., Bernhardt, J., Gerth, U., Hoper, D., Koburger, T., Volker, U., et Hecker, M. 1999b.** Identification of sigma(B)-dependent genes in *Bacillus subtilis* using a promoter consensus-directed search and oligonucleotide hybridization. *J Bacteriol* 181:5718-5724.

249. **Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J.D., Volker, U., et Hecker, M. 2001.** Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183:5617-5631.

250. **Polissi, A., Pontiggia, A., Feger, G., Altieri, M., Mottl, H., Ferrari, L., et Simon, D. 1998.** Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 66:5620-5629.

251. **Porankiewicz, J., et Clarke, A.K. 1997.** Induction of the heat shock protein ClpB affects cold acclimation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* 179:5111-5117.

252. **Portnoy, D.A., Auerbuch, V., et Glomski, I.J. 2002.** The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *J Cell Biol* 158:409-414.

253. **Potocka, I., Thein, M., M, O.S., Jenal, U., et Alley, M.R. 2002.** Degradation of a *Caulobacter* soluble cytoplasmic chemoreceptor is ClpX dependent. *J Bacteriol* 184:6635-6641.
254. **Poyart, C., Pellegrini, E., Gaillot, O., Boumaila, C., Baptista, M., et Trieu-Cuot, P. 2001.** Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun* 69:5098-5106.
255. **Price, C.W. 2002.** General stress response. In *Bacillus subtilis and its closest relatives: from genes to cells*. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. et Losick, R. (eds). Washington: ASM press.
256. **Price, C.W., Fawcett, P., Ceremonie, H., Su, N., Murphy, C.K., et Youngman, P. 2001.** Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 41:757-774.
257. **Pummi, T., Leskela, S., Wahlstrom, E., Gerth, U., Tjalsma, H., Hecker, M., Sarvas, M., et Kontinen, V.P. 2002.** ClpXP protease regulates the signal peptide cleavage of secretory preproteins in *Bacillus subtilis* with a mechanism distinct from that of the Ecs ABC transporter. *J Bacteriol* 184:1010-1018.

## Q

258. **Qoronfleh, M.W., Bortner, C.A., Schwartzberg, P., et Wilkinson, B.J. 1998.** Enhanced levels of *Staphylococcus aureus* stress protein GroEL and DnaK homologs early in infection of human epithelial cells. *Infect Immun* 66:3024-3027.
259. **Queitsch, C., Hong, S.W., Vierling, E., et Lindquist, S. 2000.** Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12:479-492.

## R

260. **Raina, S., Missiakas, D., et Georgopoulos, C. 1995.** The *rpoE* gene encoding the sigma E (sigma 24) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *Embo J* 14:1043-1055.
261. **Ramachandran, R., Hartmann, C., Song, H.K., Huber, R., et Bochtler, M. 2002.** Functional interactions of HslV (ClpQ) with the ATPase HslU (ClpY). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7396-7401.
262. **Ratledge, C., et Dover, L.G. 2000.** Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 54:881-941.
263. **Reisenauer, A., Mohr, C.D., et Shapiro, L. 1996.** Regulation of a heat shock sigma32 homolog in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 178:1919-1927.
264. **Riethdorf, S., Volker, U., Gerth, U., Winkler, A., Engelmann, S., et Hecker, M. 1994.** Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus subtilis lon* gene. *J Bacteriol* 176:6518-6527.

265. **Roberts, R.C., Toochinda, C., Avedissian, M., Baldini, R.L., Gomes, S.L., et Shapiro, L. 1996.** Identification of a *Caulobacter crescentus* operon encoding *hrcA*, involved in negatively regulating heat-inducible transcription, and the chaperone gene *grpE*. *J Bacteriol* 178:1829-1841.
266. **Robertson, G.T., Ng, W.L., Foley, J., Gilmour, R., et Winkler, M.E. 2002.** Global transcriptional analysis of *clpP* mutations of type 2 *Streptococcus pneumoniae* and their effects on physiology and virulence. *J Bacteriol* 184:3508-3520.
267. **Robertson, G.T., Ng, W.L., Gilmour, R., et Winkler, M.E. 2003.** Essentiality of *clpX*, but Not *clpP*, *clpL*, *clpC*, or *clpE*, in *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Bacteriol* 185:2961-2966.
268. **Rohrwild, M., Coux, O., Huang, H.C., Moerschell, R.P., Yoo, S.J., Seol, J.H., Chung, C.H., et Goldberg, A.L. 1996.** HslV-HslU: A novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5808-5813.
269. **Rojo, F. 1999.** Repression of transcription initiation in bacteria. *J Bacteriol* 181:2987-2991.
270. **Rosen, R., Buttner, K., Becher, D., Nakahigashi, K., Yura, T., Hecker, M., et Ron, E.Z. 2002.** Heat shock proteome of *Agrobacterium tumefaciens*: evidence for new control systems. *J Bacteriol* 184:1772-1778.
271. **Rouquette, C., de Chastellier, C., Nair, S., et Berche, P. 1998.** The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages. *Mol Microbiol* 27:1235-1245.
272. **Rouquette, C., Ripio, M.T., Pellegrini, E., Bolla, J.M., Tascon, R.I., Vazquez-Boland, J.A., et Berche, P. 1996.** Identification of a ClpC ATPase required for stress tolerance and *in vivo* survival of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 21:977-987.

## S

273. **Sanchez, Y., et Lindquist, S.L. 1990.** HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* 248:1112-1115.
274. **Scharf, C., Riethdorf, S., Ernst, H., Engelmann, S., Volker, U., et Hecker, M. 1998.** Thioredoxin is an essential protein induced by multiple stresses in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 180:1869-1877.
275. **Schirmer, E.C., Glover, J.R., Singer, M.A., et Lindquist, S. 1996.** HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem Sci* 21:289-296.
276. **Schlech, W.F. 2000.** Epidemiology and clinical manifestations of *Listeria monocytogenes* infection. In *Gram-Positive Pathogens*. Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A. et Rood, J.I. (eds). Washington, DC: ASM press.



277. **Schlothauer, T., Mogk, A., Dougan, D.A., Bukau, B., et Turgay, K. 2003.** MecA, an adaptor protein necessary for ClpC chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2306-2311.
278. **Schmidt, A., Schiesswohl, M., Volker, U., Hecker, M., et Schumann, W. 1992.** Cloning, sequencing, mapping, and transcriptional analysis of the *groESL* operon from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 174:3993-3999.
279. **Schmidt, G., Hertel, C., et Hammes, W.P. 1999.** Molecular characterisation of the *dnaK* operon of *Lactobacillus sakei* LTH681. *Syst Appl Microbiol* 22:321-328.
280. **Schulz, A., Schwab, S., Homuth, G., Versteeg, S., et Schumann, W. 1997.** The *htpG* gene of *Bacillus subtilis* belongs to class III heat shock genes and is under negative control. *J Bacteriol* 179:3103-3109.
281. **Schulz, A., Tzschaschel, B., et Schumann, W. 1995.** Isolation and analysis of mutants of the *dnaK* operon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 15:421-429.
282. **Schumann, W., Hecker, M., et Msadek, T. 2002.** Regulation and function of heat-inducible genes in *Bacillus subtilis*. In *Bacillus subtilis and its closest relatives: from genes to cells*. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. et Losick, R. (eds). Washington, D.C.: ASM.
283. **Schweder, T., Lee, K.H., Lomovskaya, O., et Martin, A. 1996.** Regulation of *Escherichia coli* starvation sigma factor (sigma s) by ClpXP protease. *J Bacteriol* 178:470-476.
284. **Scott, J.M., et Haldenwang, W.G. 1999.** Obg, an essential GTP binding protein of *Bacillus subtilis*, is necessary for stress activation of transcription factor sigma(B). *J Bacteriol* 181:4653-4660.
285. **Segal, G., et Ron, E.Z. 1996a.** Heat shock activation of the *groESL* operon of *Agrobacterium tumefaciens* and the regulatory roles of the inverted repeat. *J Bacteriol* 178:3634-3640.
286. **Segal, R., et Ron, E.Z. 1996b.** Regulation and organization of the *groE* and *dnaK* operons in *Eubacteria*. *FEMS Microbiol Lett* 138:1-10.
287. **Servant, P., Grandvalet, C., et Mazodier, P. 2000.** The RheA repressor is the thermosensor of the HSP18 heat shock response in *Streptomyces albus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3538-3543.
288. **Servant, P., et Mazodier, P. 1996.** Heat induction of *hsp18* gene expression in *Streptomyces albus* G: transcriptional and posttranscriptional regulation. *J Bacteriol* 178:7031-7036.
289. **Servant, P., et Mazodier, P. 2001.** Negative regulation of the heat shock response in *Streptomyces*. *Arch Microbiol* 176:237-242.
290. **Servant, P., Rapoport, G., et Mazodier, P. 1999.** RheA, the repressor of *hsp18* in *Streptomyces albus* G. *Microbiology* 145 ( Pt 9):2385-2391.

291. **Shafer, W.M., et Iandolo, J.J. 1979.** Genetics of staphylococcal enterotoxin B in methicillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 25:902-911.
292. **Shen, H., Tato, C.M., et Fan, X. 1998.** *Listeria monocytogenes* as a probe to study cell-mediated immunity. *Curr Opin Immunol* 10:450-458.
293. **Slominska, M., Wahl, A., Wegrzyn, G., et Skarstad, K. 2003.** Degradation of mutant initiator protein DnaA204 by proteases ClpP, ClpQ and Lon is prevented when DNA is SeqA-free. *Biochem J* 370:867-871.
294. **Smejkal, R.M., Wolff, R., et Olenick, J.G. 1988.** *Leishmania braziliensis panamensis*: increased infectivity resulting from heat shock. *Exp Parasitol* 65:1-9.
295. **Smirnova, N., Scott, J., Voelker, U., et Haldenwang, W.G. 1998.** Isolation and characterization of *Bacillus subtilis sigB* operon mutations that suppress the loss of the negative regulator RsbX. *J Bacteriol* 180:3671-3680.
296. **Smith, C.K., Baker, T.A., et Sauer, R.T. 1999.** Lon and Clp family proteases and chaperones share homologous substrate-recognition domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6678-6682.
297. **Sobczyk, A., Bellier, A., Viala, J., et Mazodier, P. 2002.** The *lon* gene, encoding an ATP-dependent protease, is a novel member of the HAIR/HspR stress-response regulon in actinomycetes. *Microbiology* 148:1931-1937.
298. **Spizizen, J. 1958.** Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 44:1072-1078.
299. **Spohn, G., Delany, I., Rappuoli, R., et Scarlato, V. 2002.** Characterization of the HspR-mediated stress response in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 184:2925-2930.
300. **Spohn, G., et Scarlato, V. 1999.** The autoregulatory HspR repressor protein governs chaperone gene transcription in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 34:663-674.
301. **Sprengart, M.L., Fatscher, H.P., et Fuchs, E. 1990.** The initiation of translation in *E. coli*: apparent base pairing between the 16srRNA and downstream sequences of the mRNA. *Nucleic Acids Res* 18:1719-1723.
302. **Squires, C., et Squires, C.L. 1992.** The Clp proteins: proteolysis regulators or molecular chaperones? *J Bacteriol* 174:1081-1085.
303. **Squires, C.L., Pedersen, S., Ross, B.M., et Squires, C. 1991.** ClpB is the *Escherichia coli* heat shock protein F84.1. *J Bacteriol* 173:4254-4262.
304. **Sternberg, G.M. 1881.** A fatal form of septicemia in the rabbit produced by subcutaneous injection of human saliva: an experimental research. *Natl. Bd. Health Bull.* 2:781-783.
305. **Stevens, M.G., Olsen, S.C., Pugh, G.W., et Mayfield, J.E. 1997.** Role of immune responses to a GroEL heat shock protein in preventing brucellosis in mice vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 20:147-153.

306. **Stewart, G.R., Snewin, V.A., Walzl, G., Hussell, T., Tormay, P., O'Gaora, P., Goyal, M., Betts, J., Brown, I.N., et Young, D.B. 2001.** Overexpression of heat-shock proteins reduces survival of *Mycobacterium tuberculosis* in the chronic phase of infection. *Nat Med* 7:732-737.
307. **Stewart, G.R., Wernisch, L., Stabler, R., Mangan, J.A., Hinds, J., Laing, K.G., Young, D.B., et Butcher, P.D. 2002.** Dissection of the heat-shock response in *Mycobacterium tuberculosis* using mutants and microarrays. *Microbiology* 148:3129-3138.
308. **Straus, D., Walter, W., et Gross, C.A. 1990.** DnaK, DnaJ, and GrpE heat shock proteins negatively regulate heat shock gene expression by controlling the synthesis and stability of sigma 32. *Genes Dev* 4:2202-2209.
309. **Straus, D.B., Walter, W.A., et Gross, C.A. 1987.** The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of sigma 32. *Nature* 329:348-351.
310. **Straus, D.B., Walter, W.A., et Gross, C.A. 1989.** The activity of sigma 32 is reduced under conditions of excess heat shock protein production in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 3:2003-2010.

## T

311. **Tatsuta, T., Tomoyasu, T., Bukau, B., Kitagawa, M., Mori, H., Karata, K., et Ogura, T. 1998.** Heat shock regulation in the ftsH null mutant of *Escherichia coli*: dissection of stability and activity control mechanisms of sigma32 in vivo. *Mol Microbiol* 30:583-593.
312. **Taylor, B.L., et Zhulin, I.B. 1999.** PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:479-506.
313. **Testerman, T.L., Vazquez-Torres, A., Xu, Y., Jones-Carson, J., Libby, S.J., et Fang, F.C. 2002.** The alternative sigma factor sigmaE controls antioxidant defences required for *Salmonella virulence* and stationary-phase survival. *Mol Microbiol* 43:771-782.
314. **Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R.T., Haft, D.H., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Gwinn, M., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Peterson, J.D., Umayam, L.A., White, O., Salzberg, S.L., Lewis, M.R., Radune, D., Holtzapple, E., Khouri, H., Wolf, A.M., Utterback, T.R., Hansen, C.L., McDonald, L.A., Feldblyum, T.V., Angiuoli, S., Dickinson, T., Hickey, E.K., Holt, I.E., Loftus, B.J., Yang, F., Smith, H.O., Venter, J.C., Dougherty, B.A., Morrison, D.A., Hollingshead, S.K., et Fraser, C.M. 2001.** Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 293:498-506.
315. **Thomas, J.G., et Baneyx, F. 2000.** ClpB and HtpG facilitate de novo protein folding in stressed *Escherichia coli* cells. *Mol Microbiol* 36:1360-1370.
316. **Tilly, K., McKittrick, N., Zylicz, M., et Georgopoulos, C. 1983.** The dnaK protein modulates the heat-shock response of *Escherichia coli*. *Cell* 34:641-646.
317. **Tilly, K., Spence, J., et Georgopoulos, C. 1989.** Modulation of stability of the *Escherichia coli* heat shock regulatory factor sigma. *J Bacteriol* 171:1585-1589.

318. Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D., Venter, J.C., et al. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388:539-547.
319. Tomoyasu, T., Gamer, J., Bukau, B., Kanemori, M., Mori, H., Rutman, A.J., Oppenheim, A.B., Yura, T., Yamanaka, K., Niki, H., et al. 1995. *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor sigma 32. *Embo J* 14:2551-2560.
320. Tomoyasu, T., Ogura, T., Tatsuta, T., et Bukau, B. 1998. Levels of DnaK and DnaJ provide tight control of heat shock gene expression and protein repair in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 30:567-581.
321. Tsai, J.W., et Alley, M.R. 2001. Proteolysis of the *Caulobacter* McpA chemoreceptor is cell cycle regulated by a ClpX-dependent pathway. *J Bacteriol* 183:5001-5007.
322. Turgay, K., Hahn, J., Burghoorn, J., et Dubnau, D. 1998. Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *Embo J* 17:6730-6738.
323. Turgay, K., Hamoen, L.W., Venema, G., et Dubnau, D. 1997. Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 11:119-128.
324. Turner, A.K., Lovell, M.A., Hulme, S.D., Zhang-Barber, L., et Barrow, P.A. 1998. Identification of *Salmonella typhimurium* genes required for colonization of the chicken alimentary tract and for virulence in newly hatched chicks. *Infect Immun* 66:2099-2106.

## V

325. van Asseldonk, M., Simons, A., Visser, H., de Vos, W.M., et Simons, G. 1993. Cloning, nucleotide sequence, and regulatory analysis of the *Lactococcus lactis* *dnaJ* gene. *J Bacteriol* 175:1637-1644.
326. van der Straaten, T., van Diepen, A., Kwappenberg, K., van Voorden, S., Franken, K., Janssen, R., Kusters, J.G., Granger, D.L., et van Dissel, J.T. 2001. Novel *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* protein that is indispensable for virulence and intracellular replication. *Infect Immun* 69:7413-7418.
327. Varmanen, P., Ingmer, H., et Vogensen, F.K. 2000. *ctsR* of *Lactococcus lactis* encodes a negative regulator of *clp* gene expression. *Microbiology* 146 ( Pt 6):1447-1455.
328. Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., et Kreft, J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 14:584-640.

329. **Versteeg, S., Escher, A., Wende, A., Wiegert, T., et Schumann, W. 2003.** Regulation of the *Bacillus subtilis* heat shock gene *hspG* is under positive control. *J Bacteriol* 185:466-474.
330. **Viala, J., et Mazodier, P. 2002.** ClpP-dependent degradation of PopR allows tightly regulated expression of the *clpP3 clpP4* operon in *Streptomyces lividans*. *Mol Microbiol* 44:633-643.
331. **Viala, J., et Mazodier, P. 2003.** The ATPase ClpX is conditionally involved in the morphological differentiation of *Streptomyces lividans*. *Mol Genet Genomics* 268:563-569.
332. **Viala, J., Rapoport, G., et Mazodier, P. 2000.** The *clpP* multigenic family in *Streptomyces lividans*: conditional expression of the *clpP3 clpP4* operon is controlled by PopR, a novel transcriptional activator. *Mol Microbiol* 38:602-612.
333. **Vijay, K., Brody, M.S., Fredlund, E., et Price, C.W. 2000.** A PP2C phosphatase containing a PAS domain is required to convey signals of energy stress to the sigmaB transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 35:180-188.
334. **Viollier, P.H., Kelemen, G.H., Dale, G.E., Nguyen, K.T., Buttner, M.J., et Thompson, C.J. 2003a.** Specialized osmotic stress response systems involve multiple SigB-like sigma factors in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 47:699-714.
335. **Viollier, P.H., Weihofen, A., Folcher, M., et Thompson, C.J. 2003b.** Post-transcriptional regulation of the *Streptomyces coelicolor* stress responsive sigma factor, SigH, involves translational control, proteolytic processing, and an anti-sigma factor homolog. *J Mol Biol* 325:637-649.
336. **Voelker, U., Dufour, A., et Haldenwang, W.G. 1995a.** The *Bacillus subtilis* *rsbU* gene product is necessary for RsbX-dependent regulation of sigma B. *J Bacteriol* 177:114-122.
337. **Voelker, U., Voelker, A., et Haldenwang, W.G. 1996.** Reactivation of the *Bacillus subtilis* anti-sigma B antagonist, RsbV, by stress- or starvation-induced phosphatase activities. *J Bacteriol* 178:5456-5463.
338. **Voelker, U., Voelker, A., Maul, B., Hecker, M., Dufour, A., et Haldenwang, W.G. 1995b.** Separate mechanisms activate sigma B of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. *J Bacteriol* 177:3771-3780.
339. **Volker, U., Engelmann, S., Maul, B., Riethdorf, S., Volker, A., Schmid, R., Mach, H., et Hecker, M. 1994.** Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 140 ( Pt 4):741-752.
340. **Volker, U., Maul, B., et Hecker, M. 1999.** Expression of the sigmaB-dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 181:3942-3948.

## W

341. **Wang, J., Hartling, J.A., et Flanagan, J.M. 1997.** The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell* 91:447-456.

342. **Wang, J., Hartling, J.A., et Flanagan, J.M. 1998.** Crystal structure determination of *Escherichia coli* ClpP starting from an EM-derived mask. *J Struct Biol* 124:151-163.
343. **Wang, Q.P., et Kaguni, J.M. 1989a.** A novel sigma factor is involved in expression of the *rpoH* gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 171:4248-4253.
344. **Wang, Q.P., et Kaguni, J.M. 1989b.** DnaA protein regulates transcriptions of the *rpoH* gene of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 264:7338-7344.
345. **Watanabe, K., Yamamoto, T., et Suzuki, Y. 2001.** Renaturation of *Bacillus thermoglucosidasius* HrcA repressor by DNA and thermostability of the HrcA-DNA complex in vitro. *J Bacteriol* 183:155-161.
346. **Wawrzynow, A., Wojtkowiak, D., Marszalek, J., Banecki, B., Jonsen, M., Graves, B., Georgopoulos, C., et Zylicz, M. 1995.** The ClpX heat-shock protein of *Escherichia coli*, the ATP-dependent substrate specificity component of the ClpP-ClpX protease, is a novel molecular chaperone. *Embo J* 14:1867-1877.
347. **Webb, C., Moreno, M., Wilmes-Riesenberg, M., Curtiss, R., 3rd, et Foster, J.W. 1999.** Effects of DksA and ClpP protease on sigma S production and virulence in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 34:112-123.
348. **Weber-Ban, E.U., Reid, B.G., Miranker, A.D., et Horwich, A.L. 1999.** Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA. *Nature* 401:90-93.
349. **Weng, S.F., Tai, P.M., Yang, C.H., Wu, C.D., Tsai, W.J., Lin, J.W., et Tseng, Y.H. 2001.** Characterization of stress-responsive genes, *hrcA-grpE-dnaK-dnaJ*, from phytopathogenic *Xanthomonas campestris*. *Arch Microbiol* 176:121-128.
350. **Wetzstein, M., Volker, U., Dedio, J., Lobau, S., Zuber, U., Schiesswohl, M., Herget, C., Hecker, M., et Schumann, W. 1992.** Cloning, sequencing, and molecular analysis of the *dnaK* locus from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 174:3300-3310.
351. **Wickner, S., Gottesman, S., Skowyra, D., Hoskins, J., McKenney, K., et Maurizi, M.R. 1994.** A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12218-12222.
352. **Wiegert, T., et Schumann, W. 2001.** SsrA-mediated tagging in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183:3885-3889.
353. **Wise, A.A., et Price, C.W. 1995.** Four additional genes in the *sigB* operon of *Bacillus subtilis* that control activity of the general stress factor sigma B in response to environmental signals. *J Bacteriol* 177:123-133.
354. **Wojtkowiak, D., Georgopoulos, C., et Zylicz, M. 1993.** Isolation and characterization of ClpX, a new ATP-dependent specificity component of the Clp protease of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 268:22609-22617.
355. **Woo, K.M., Chung, W.J., Ha, D.B., Goldberg, A.L., et Chung, C.H. 1989.** Protease Ti from *Escherichia coli* requires ATP hydrolysis for protein breakdown but not for hydrolysis of small peptides. *J Biol Chem* 264:2088-2091.

356. **Woo, K.M., Kim, K.I., Goldberg, A.L., Ha, D.B., et Chung, C.H. 1992.** The heat-shock protein ClpB in *Escherichia coli* is a protein-activated ATPase. *J Biol Chem* 267:20429-20434.
357. **Wu, J., et Newton, A. 1996.** Isolation, identification, and transcriptional specificity of the heat shock sigma factor sigma32 from *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 178:2094-2101.
358. **Wu, J., et Newton, A. 1997.** The *Caulobacter* heat shock sigma factor gene *rpoH* is positively autoregulated from a sigma32-dependent promoter. *J Bacteriol* 179:514-521.
359. **Wu, W.F., Zhou, Y., et Gottesman, S. 1999.** Redundant *in vivo* proteolytic activities of *Escherichia coli* Lon and the ClpYQ (HslUV) protease. *J Bacteriol* 181:3681-3687.

## Y

360. **Yamamoto, T., Sashinami, H., Takaya, A., Tomoyasu, T., Matsui, H., Kikuchi, Y., Hanawa, T., Kamiya, S., et Nakane, A. 2001.** Disruption of the genes for ClpXP protease in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* results in persistent infection in mice, and development of persistence requires endogenous gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 69:3164-3174.
361. **Yang, X., Kang, C.M., Brody, M.S., et Price, C.W. 1996.** Opposing pairs of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor. *Genes Dev* 10:2265-2275.
362. **Yesilkaya, H., Kadioglu, A., Gingles, N., Alexander, J.E., Mitchell, T.J., et Andrew, P.W. 2000.** Role of manganese-containing superoxide dismutase in oxidative stress and virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 68:2819-2826.
363. **Yother, J. 2000.** Genetics of *Streptococcus pneumoniae*. In *Gram-Positive Pathogens*. Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A. et Rood, J.I. (eds). Washington, DC: ASM press.
364. **Young, D., Lathigra, R., Hendrix, R., Sweetser, D., et Young, R.A. 1988a.** Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:4267-4270.
365. **Young, D.B., Mehlert, A., Bal, V., Mendez-Samperio, P., Ivanyi, J., et Lamb, J.R. 1988b.** Stress proteins and the immune response to mycobacteria--antigens as virulence factors? *Antonie Van Leeuwenhoek* 54:431-439.
366. **Yuan, G., et Wong, S.L. 1995a.** Isolation and characterization of *Bacillus subtilis groE* regulatory mutants: evidence for *orf39* in the *dnaK* operon as a repressor gene in regulating the expression of both *groE* and *dnaK*. *J Bacteriol* 177:6462-6468.
367. **Yuan, G., et Wong, S.L. 1995b.** Regulation of *groE* expression in *Bacillus subtilis*: the involvement of the sigma A-like promoter and the roles of the inverted repeat sequence (CIRCE). *J Bacteriol* 177:5427-5433.

368. **Yura, T., Kanemori, M., et Morita, M. 2000.** The heat shock response: regulation and function. In *Bacterial stress responses*. Storz, G. et Hengge-Aronis, R. (eds). Washington, DC: ASM press.

## Z

369. **Zhang, W.W., et Matlashewski, G. 1997.** Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8807-8811.

370. **Zolkiewski, M. 1999.** ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation. A novel multi-chaperone system from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 274:28083-28086.

371. **Zuber, U., Drzewiecki, K., et Hecker, M. 2001.** Putative sigma factor SigI (YkoZ) of *Bacillus subtilis* is induced by heat shock. *J Bacteriol* 183:1472-1475.

372. **Zuber, U., et Schumann, W. 1994.** CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 176:1359-1363.

373. **Zugel, U., et Kaufmann, S.H. 1999.** Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 12:19-39.



# **Annexes**

**Annexe 1**

**Comparative genomics reveal novel heat shock regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria.**

Mol. Micro., (2003) 47(4), 1061-1073.

# Comparative genomics reveal novel heat shock regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria

Arnaud Chastanet, Juliette Fert and Tarek Msadek\*

Unité de Biochimie Microbienne, CNRS URA 2172,  
Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris  
Cedex 15, France.

## Summary

Multiple regulatory mechanisms for coping with stress co-exist in low G+C Gram-positive bacteria. Among these, the HrcA and CtsR repressors control distinct regulons in the model organism, *Bacillus subtilis*. We recently identified an orthologue of the CtsR regulator of stress response in the major pathogen, *Staphylococcus aureus*. Sequence analysis of the *S. aureus* genome revealed the presence of potential CtsR operator sites not only upstream from genes encoding subunits of the Clp ATP-dependent protease, as in *B. subtilis*, but also, unexpectedly, within the promoter regions of the *dnaK* and *groESL* operons known to be specifically controlled by HrcA. The tandem arrangement of the CtsR and HrcA operators suggests a novel mode of dual heat shock regulation by these two repressors. The *S. aureus ctsR* and *hrcA* genes were cloned under the control of the *PxylA* xylose-inducible promoter and used to demonstrate dual regulation of the *dnaK* and *groESL* operons by both CtsR and HrcA, using *B. subtilis* as a heterologous host. Direct binding by both repressors was shown *in vitro* by gel mobility shift and DNase I footprinting experiments using purified *S. aureus* CtsR and HrcA proteins.  $\Delta ctsR$ ,  $\Delta hrcA$  and  $\Delta ctsR \Delta hrcA$  mutants of *S. aureus* were constructed, indicating that the two repressors are not redundant but, instead, act together synergistically to maintain low basal levels of expression of the *dnaK* and *groESL* operons in the absence of stress. This novel regulatory mode appears to be specific to Staphylococci.

## Introduction

*Staphylococcus aureus* is a major human opportunistic pathogen responsible for a broad spectrum of infections ranging from food poisoning and superficial skin abscesses to more serious diseases such as pneumonia, meningitis, endocarditis, septicaemia or toxic shock syndrome. Several pathogenicity factors, such as cell surface proteins, invasins and exotoxins, have been characterized, yet it is the unique adaptive potential displayed by *S. aureus* that has made it one of the major causes of nosocomial infections. Its ubiquitous nature stems mostly from its ability to survive in a great variety of environmental extremes, such as nutrient starvation, a wide range of pH and growth temperatures, metal ion restriction, desiccation or high salt concentrations. An increasing amount of data indicates that the capacity to survive stress conditions, often involving increased expression of stress response genes, is highly correlated with virulence in both *S. aureus* (Clements and Foster, 1999) and other pathogens (Hübel *et al.*, 1997; Rouquette *et al.*, 1998).

Most stress-induced proteins are molecular chaperones or proteases, consistent with their role in protein folding and degradation (Gottesman *et al.*, 1997). Although some stress proteins, such as GroESL, are extremely well conserved among bacteria, heat shock regulatory mechanisms exhibit great diversity. In *Escherichia coli*, expression of most heat shock genes is under the control of two alternative sigma factors ( $\sigma^{32}$  and  $\sigma^E$ ) (Bukau, 1993). In the Gram-positive model organism *Bacillus subtilis*, four different classes of heat shock genes can be distinguished: class I genes, encoding classical chaperones (DnaK, GroES, GroEL), are controlled by the HrcA repressor, which recognizes the highly conserved CIRCE operator sequence (TTAGCACTC-N9-GAGTGCTAA); class II genes encode general stress proteins, and their expression requires the  $\sigma^B$  stress sigma factor; class III heat shock genes are repressed by CtsR (Class three stress gene Repressor), which recognizes a tandem heptanucleotide direct repeat (A/GGTCAAANANA/GGTCAA); and class IV genes are those that are not con-

Accepted 5 November, 2002. \*For correspondence. E-mail tmsadek@pasteur.fr; Tel. (+33) 1 45 68 88 09; Fax (+33) 1 45 68 89 38.

trolled by HrcA,  $\sigma^B$  or CtsR (Schumann *et al.*, 2002). The regulatory mechanisms controlling heat shock induction of the first three classes of stress response genes have been studied in some detail in *B. subtilis*. The GroE chaperonin machine has been shown to be required *in vivo* to allow HrcA to adopt its active conformation and repress class I heat shock genes efficiently. After heat shock, GroE is thought to be titrated through association with misfolded proteins in the cell, and HrcA becomes inactive and dissociates from its operator sequence, leading to induction of the HrcA regulon (Mogk *et al.*, 1997). Activity of the  $\sigma^B$  alternative  $\sigma$  factor controlling class II genes is regulated post-translationally by a complex signal transduction network involving multiple protein–protein interactions and serine/threonine phosphorylation (Price, 2002). Induction of class III genes is thought to involve targeted degradation of the CtsR repressor by the Clp ATP-dependent protease (Derré *et al.*, 2000; Krüger *et al.*, 2001).

Until recently, surprisingly little was known about stress response regulation in Gram-positive bacteria other than *B. subtilis*, despite the fact that many stress proteins play an important role in virulence, such as ClpX of *S. aureus* (Mei *et al.*, 1997), ClpE and ClpC of *Streptococcus pneumoniae* (Polissi *et al.*, 1998; Lau *et al.*, 2001) or ClpC, ClpE and ClpP of *Listeria monocytogenes* (Rouquette *et al.*, 1996; 1998; Nair *et al.*, 1999; 2000a; Gaillot *et al.*, 2000; 2001). Besides the subunits of the ubiquitous Clp ATP-dependent protease, classical chaperones such as DnaK or GroESL are also thought to play an important role in virulence. Indeed, the GroESL chaperonin was shown to be involved in cell adherence of *Clostridium difficile* and cell invasion by *Legionella pneumophila* (Garduno *et al.*, 1998; Hennequin *et al.*, 2001). In *L. monocytogenes*, expression of the *groESL* operon is induced during intracellular infection, and DnaK is required for efficient phagocytosis with macrophages (Hanawa *et al.*, 1999; Gahan *et al.*, 2001). Synthesis of the two major *S. aureus* chaperones, DnaK and GroESL, was shown to be induced during infection of human epithelial cells, and antibodies specifically directed against these proteins can be detected in sera from infected patients (Qoronfleh *et al.*, 1993; 1998). An understanding of the regulatory mechanisms controlling stress gene expression is therefore essential in studying the virulence of different pathogens.

An analysis of the complete *S. aureus* genome sequence (Kuroda *et al.*, 2001) and several recent reports indicate that, as originally defined in *B. subtilis*, at least four different types of heat shock response regulatory mechanisms may co-exist (Clements and Foster, 1999): class I and II genes were identified with the characterization of the *dnaK* and *groESL* operons (Kuroda *et al.*, 1999)

and the  $\sigma^B$  regulon (Gertz *et al.*, 2000), and many genes belonging to class IV of *B. subtilis* also have orthologues present in *S. aureus*.

We have recently identified the *ctsR* gene of *S. aureus* (Derré *et al.*, 1999a), strongly suggesting that class III regulation could be present. We have identified tandemly arranged CtsR and HrcA operator sites upstream from the *S. aureus dnaK* and *groESL* operons, suggesting a novel mode of dual heat shock regulation for these genes by both repressors. We show here that the *S. aureus dnaK* and *groESL* operons are repressed by both CtsR and HrcA, which act together synergistically to maintain low levels of expression in the absence of stress.

## Results

### *The S. aureus dnaK and groESL operons: novel members of the CtsR regulon*

A detailed DNA motif analysis of the complete *S. aureus* genome (Kuroda *et al.*, 2001) was carried out using the CtsR direct repeat heptad operator sequence (A/GGT CAAANANA/GGTCAAA) (Derré *et al.*, 1999a), indicating that there are only five likely CtsR binding sites. Three are next to genes encoding potential subunits of the Clp ATP-dependent protease, in agreement with the previously studied CtsR regulons, which essentially consist of *clp* genes (Derré *et al.*, 1999a,b; Nair *et al.*, 2000b; Varmanen *et al.*, 2000; Chastanet *et al.*, 2001).

Interestingly, the two remaining target sequences are located upstream from the *groESL* and *dnaK* operons, encoding the major cell chaperones. These operons are also preceded by the highly conserved HrcA operator, CIRCE, and were shown previously to be controlled by HrcA (Kuroda *et al.*, 1999). Among the more than 40 CtsR binding sites identified to date (Derré *et al.*, 1999a; Schumann *et al.*, 2002), none was previously found to be located upstream from a *dnaK* operon. This tandem operator arrangement suggests a novel mode of dual heat shock repression by both CtsR and HrcA. Furthermore, as HrcA is encoded by the first gene of the *dnaK* operon, this would indicate that HrcA synthesis in *S. aureus* is itself repressed by CtsR.

### *CtsR and HrcA of S. aureus both repress dnaK and groESL expression in the heterologous host, B. subtilis*

In order to test whether CtsR does indeed play a role in controlling expression of the *S. aureus dnaK* and *groESL* operons, *B. subtilis* was used as a heterologous host. Derivatives of *B. subtilis* strain QB8068, in which the endogenous *ctsR* gene is deleted (Chastanet *et al.*, 2001), were constructed in several steps. The resulting

**Table 1.** *B. subtilis* and *S. aureus* strains used in this study.

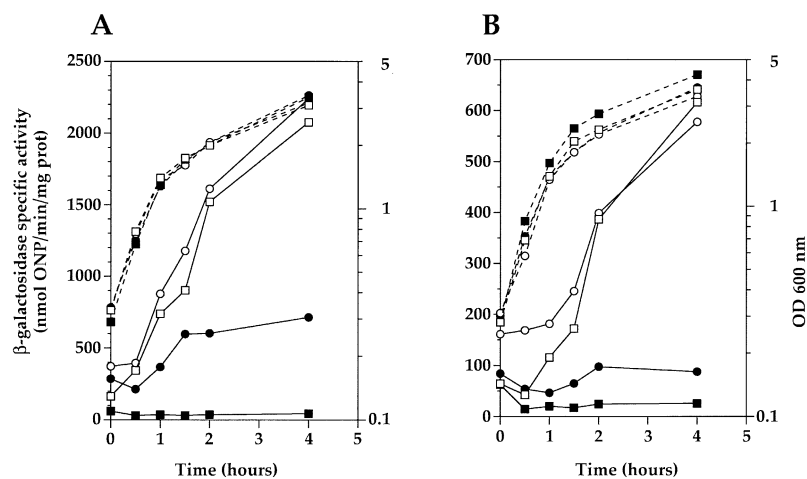
Strain	Genotype	Source or reference
<i>B. subtilis</i>		
AS02	$\Delta hrcA::cat$	Mogk <i>et al.</i> (1997)
QB4922	$trpC2 \Delta hrcA::cat$	AS02→168
QB8068	$trpC2 \Delta ctsR amyE::cat$	Chastanet <i>et al.</i> (2001)
QB8072	$trpC2 \Delta ctsR amyE::(dnaK'-bgaB aphA3)$	pDK <i>dnaKSau</i> →QB8068
QB8075	$trpC2 \Delta ctsR amyE::(dnaK'-bgaB aphA3) \Delta hrcA::cat$	QB4922→QB8072
QB8076	$trpC2 \Delta ctsR amyE::(dnaK'-bgaB aphA3) \Delta hrcA::cat$ $thrC::(pxylActsR sau)$	pXT <i>ctsRsau</i> →QB8075
QB8077	$trpC2 \Delta ctsR amyE::(dnaK'-bgaB aphA3) \Delta hrcA::cat$ $thrC::(pxylAhrcA sau)$	pXT <i>hrcAsau</i> →QB8075
QB8127	$trpC2 \Delta ctsR amyE::(groES'-bgaB aphA3)$	pDK <i>groEsau</i> →QB8068
QB8128	$trpC2 \Delta ctsR amyE::(groES'-bgaB aphA3) \Delta hrcA::cat$	QB4922→QB8127
QB8129	$trpC2 \Delta ctsR amyE::(groES'-bgaB aphA3) \Delta hrcA::cat$ $thrC::(pxylActsR sau)$	pXT <i>ctsRsau</i> →QB8128
QB8130	$trpC2 \Delta ctsR amyE::(groES'-bgaB aphA3) \Delta hrcA::cat$ $thrC::(pxylAhrcA sau)$	pXT <i>hrcAsau</i> →QB8128
<i>S. aureus</i>		
RN4220		Kreiswirth <i>et al.</i> (1983)
SA2000	$\Delta ctsR::spc$	pRN <i>ΔctsR</i> →RN4220
SA2001	$\Delta hrcA$	pMAD <i>ΔhrcA</i> →RN4220
SA2002	$\Delta ctsR::spc \Delta hrcA$	pMAD <i>ΔhrcA</i> →SA2000

strains carry transcriptional  $\beta$ -galactosidase fusions with the promoter regions of the *S. aureus dnaK* or *groESL* operons (*dnaK'-bgaB* or *groES'-bgaB*) integrated as single copies at the *amyE* locus, a deletion/replacement of the endogenous *hrcA* gene by the *cat* chloramphenicol resistance gene (Mogk *et al.*, 1997) as well as a copy of the *S. aureus ctsR* or *hrcA* gene integrated at the *thrC* locus under control of the xylose-inducible promoter PxyIA (Table 1 and *Experimental procedures*).

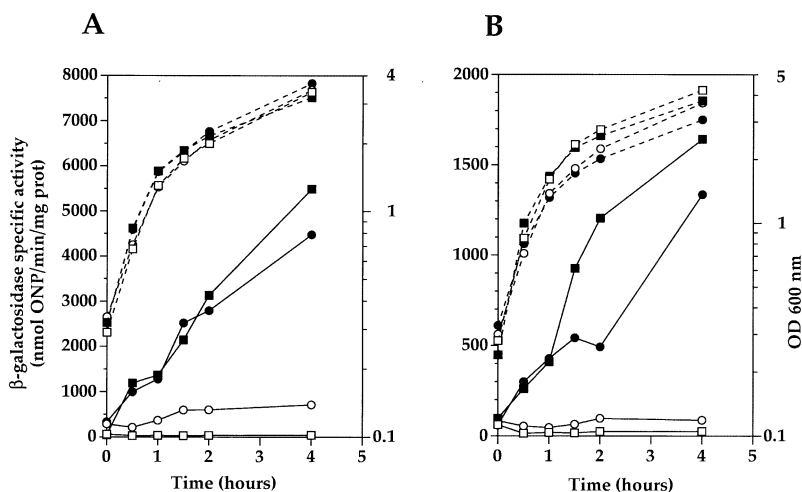
$\beta$ -Galactosidase assays were performed during growth at 37°C in the presence or absence of xylose (Fig. 1). Expression of *dnaK'-bgaB* was repressed up to 48-fold

by CtsR (strain QB8076, Fig. 1A) and 3.2-fold by HrcA (strain QB8077, Fig. 1A), whereas expression of *groES'-bgaB* was repressed 24-fold by CtsR and approximately sevenfold by HrcA (strains QB8129 and QB8130 respectively; Fig. 1B).

In order to test whether repression by CtsR or HrcA of *S. aureus* in the heterologous host *B. subtilis* was relieved during heat shock, expression was tested in these strains during growth in the presence of xylose at 37°C or 48°C. As shown in Fig. 2, expression of *dnaK'-bgaB* (Fig. 2A) and *groES'-bgaB* (Fig. 2B) was found to be fully derepressed in the presence of CtsR or HrcA during growth at



**Fig. 1.** CtsR and HrcA of *S. aureus* repress expression of *dnaK'-bgaB* and *groES'-bgaB* transcriptional fusions in *B. subtilis*. Expression of *dnaK'-bgaB* (A) and *groES'-bgaB* (B) was measured in cells expressing *ctsR* (squares) or *hrcA* (circles). Cells were grown in LB medium at 37°C until  $OD_{600} = 0.3$ , and xylose was added to half the culture at a final concentration of 20 mM. Cultures grown in the presence of xylose are represented by black symbols and in the absence of xylose by white symbols. Dotted lines indicate optical density at 600 nm, and solid lines indicate  $\beta$ -galactosidase specific activity expressed as nmol of ONP  $min^{-1} mg^{-1}$  protein.



**Fig. 2.** Repression of *dnaK'*-*bgaB* and *groES'*-*bgaB* fusions in *B. subtilis* by CtsR and HrcA of *S. aureus* is abolished by heat shock. Expression of *dnaK'*-*bgaB* (A) and *groES'*-*bgaB* (B) was measured in cells expressing *ctsR* (squares) or *hrcA* (circles). Cells were grown in LB medium at 37°C until  $OD_{600} = 0.3$ , 20 mM xylose was added, and half the culture was shifted to 48°C. Cultures grown at 37°C are represented by white symbols and at 48°C by black symbols. Dotted lines indicate optical density at 600 nm, and solid lines indicate  $\beta$ -galactosidase specific activity expressed as nmol of ONP  $min^{-1} mg^{-1}$  protein.

48°C. These results clearly demonstrate that the *S. aureus dnaK* and *groESL* operons are subjected to dual negative regulation by CtsR and HrcA, and that this repression no longer occurs during growth at high temperature, leading to heat shock induction of these operons.

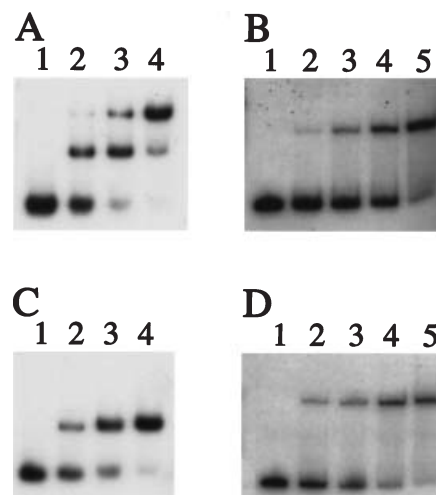
*Purified CtsR and HrcA of S. aureus bind specifically to upstream regions of the dnaK and groESL operons*

As shown above, both CtsR and HrcA control the *S. aureus dnaK* and *groESL* operons. In order to determine whether the two repressors bind simultaneously or in a mutually exclusive fashion, an *in vitro* approach based on gel mobility shift DNA-binding assays and DNase I footprinting was performed.

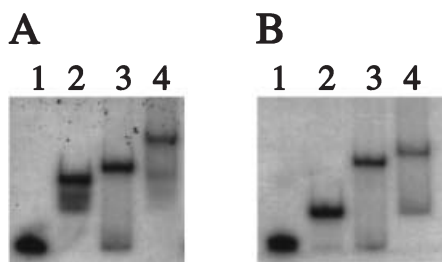
The *S. aureus* CtsR and HrcA proteins were overproduced and purified using plasmid pET28/16 (see *Experimental procedures*). HrcA was renatured to a soluble active form in the presence of poly-(dI-dC), without denaturing agents or additional chaperonin proteins such as GroESL (see *Experimental procedures*). The two purified proteins were then used in gel mobility shift DNA-binding assays (Fig. 3) with radiolabelled DNA fragments corresponding to the promoter regions of the *dnaK* or *groESL* operons, in the presence of an excess of non-specific competitor DNA [1  $\mu$ g of poly-(dI-dC)]. CtsR bound specifically, forming two protein-DNA complexes with the *dnaK* promoter region (Fig. 3A, lanes 2–4) and a single complex with the *groESL* DNA fragment (Fig. 3C, lanes 2–4). The HrcA protein is notoriously insoluble, and previous attempts at purifying it in an active form have met with limited success (Mogk *et al.*, 1997). As shown here, the purified *S. aureus* HrcA protein is highly active, binding specifically to the *dnaK* (Fig. 3B) and *groESL* (Fig. 3D) DNA fragments and forming a single complex in each case, with complete displacement of the radiolabelled

fragment to the slower migrating protein-DNA complex as protein concentrations are increased (Fig. 3B and D, lanes 2–5). Binding of HrcA was specific, as no shift in electrophoretic mobility was seen when HrcA was incubated with a radiolabelled DNA fragment carrying the upstream region of the *clpB* gene, which lacks the CIRCE sequence (data not shown).

When both CtsR and HrcA proteins were incubated together with the labelled fragments, a new protein-DNA complex was observed, migrating more slowly than those formed with CtsR or HrcA alone (Fig. 4A and B, lanes 2–4). These results clearly demonstrate that CtsR and HrcA



**Fig. 3.** Specific binding of CtsR or HrcA to the *dnaK* and *groESL* promoter regions. Gel mobility shift experiments were performed by incubating purified CtsR or HrcA proteins with radiolabelled DNA fragments (10 000 c.p.m.) corresponding to the promoter regions of the *dnaK* (positions -121 to +2) (A and B) or *groESL* operons (positions -136 to +1) (C and D). A and C. Lanes 1–4, 0, 20, 40 and 80 ng of CtsR. B and D. Lanes 1–5, 0, 125, 250, 500 and 1000 ng of HrcA. Positions are given with respect to the translation initiation codon.

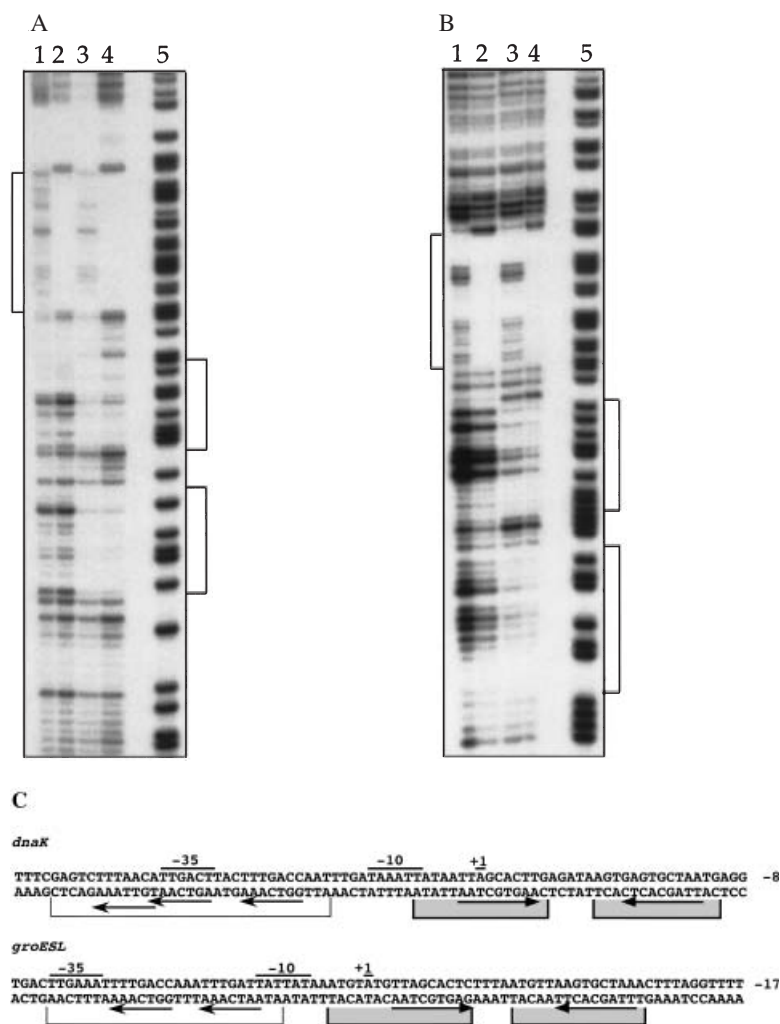


**Fig. 4.** Specific binding of both CtsR and HrcA to the *dnaK* and *groESL* promoter regions. Gel mobility shift experiments were performed by incubating purified CtsR and/or HrcA proteins with radio-labelled DNA fragments (10 000 c.p.m.) corresponding to the promoter regions of the *dnaK* (positions -121 to +2) (A) and *groESL* operons (positions -136 to +1) (B). Lane 1, no protein; lane 2, CtsR (1 μg); lane 3, HrcA (1 μg); lane 4, CtsR (1 μg) + HrcA (1 μg). Positions are given with respect to the translation initiation codon.

of *S. aureus* control the expression of these two operons by binding directly and specifically to their promoter regions. The two repressors can bind simultaneously and

independently, as each is able to bind without the other, with a complete displacement of the labelled fragment in each case. No co-operativity was observed for binding of CtsR and HrcA when varying the concentrations of one repressor once the other was bound (data not shown).

To determine precisely the extent of the CtsR and HrcA binding sites, DNase I footprinting assays were performed on DNA fragments carrying the *dnaK* and *groESL* promoter regions. As shown in Fig. 5, when the template strand was end-labelled, CtsR protected a region extending from positions -54 to -84 for *dnaK* (Fig. 5A, lane 2) and from -68 to -94 for *groESL* (Fig. 5B, lane 2). In each case, the region protected by CtsR contains the tandem heptanucleotide repeat recognition sequence and the -35 sequence of the promoter (Fig. 5C). Positions are given with respect to the translation initiation codon. A third potential heptanucleotide repeat is located within the *dnaK* promoter region, just upstream from the characteristic CtsR binding site (5'-TTTAACA-3'; Fig. 5C), which could



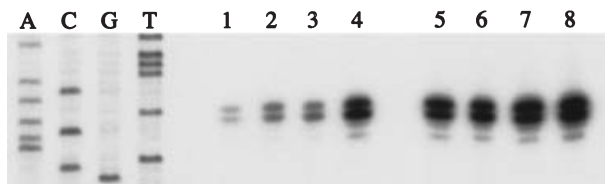
**Fig. 5.** DNase I footprinting analysis of CtsR and HrcA binding to the *hrcA* and *groESL* promoter regions. Each lane contains 50 000 c.p.m. of radiolabelled DNA fragment corresponding to the *dnaK* (A) or *groESL* (B) promoter regions incubated with 5 μg of purified CtsR and/or HrcA. Lane 1, no protein; lane 2, CtsR; lane 3, HrcA; lane 4, CtsR + HrcA; lane 5, G+A Maxam and Gilbert reaction of the corresponding DNA fragment (template strand). Regions protected from DNase I cleavage are indicated by brackets on the left-hand side for CtsR and the right-hand side for HrcA. C. Nucleotide sequences of the *dnaK* and *groESL* promoter regions. Consensus -35 and -10 sequences are overlined; transcriptional start points are indicated by +1; CtsR heptad direct repeat operator sequences are indicated by arrows; the CIRCE operator sequence is indicated by inverted arrows; regions protected in DNase I footprinting experiments by CtsR and HrcA are indicated by brackets or shaded brackets below the sequence respectively. Positions are numbered relative to the translation initiation codon.

explain the two distinct protein–DNA complexes seen in gel mobility shift experiments (Fig. 3A). A similar situation was reported for the *B. subtilis* *clpC* operon, in which the promoter region also carries three direct repeats, or one and a half CtsR binding sites, which also led to two protein–DNA complexes when incubated with CtsR in gel mobility shift experiments (Derré *et al.*, 1999a).

Owing to the insoluble nature of HrcA, no DNase I footprinting results have been reported to date. As shown here, HrcA protects two areas within each promoter region, extending from positions –11 to –24 and –30 to –44 for *dnaK* (Fig. 5A, lane 3) and from –28 to –42 and –47 to –62 for *groESL* (Fig. 5B, lane 3). These regions contain the two inverted repeat sequences of the CIRCE element and the transcription initiation site (Fig. 5C). When both proteins were added to the DNA, the regions protected by both HrcA and CtsR were observed (Fig. 5A and B, lanes 4), confirming that the two repressors can bind simultaneously to their specific operator sequences.

#### Repression by CtsR and HrcA of *S. aureus* is not redundant

CtsR and HrcA both repress the *dnaK* and *groESL* operons, known to be induced under heat shock conditions. In order to examine the *in vivo* contribution of each repressor, expression of the *groESL* operon was compared by primer extension experiments in *S. aureus* RN4220 and different mutant strains: SA2000 ( $\Delta$ *ctsR*), SA2001 ( $\Delta$ *hrcA*) and SA2002 ( $\Delta$ *ctsR*  $\Delta$ *hrcA*) (see *Experimental procedures*). As shown in Fig. 6, the *groESL* operon is expressed at a low basal level in strain RN4220 during growth in brain–heart infusion (BHI) at 37°C (Fig. 6, lane 1). Primer extension experiments carried out using RNA from strains SA2000 ( $\Delta$ *ctsR*) or SA2001 ( $\Delta$ *hrcA*) revealed transcription levels of *groESL* that were increased three- to fourfold in either of the mutants (Fig. 6, lanes 2 and 3). In the  $\Delta$ *ctsR*  $\Delta$ *hrcA* mutant (strain SA2002), however, *groESL* expression was increased 20-fold (Fig. 6, lane 4), indicating that the two repressors act together synergistically to maintain low expression levels in the absence of



**Fig. 6.** Primer extension analysis of *groESL* transcription in different genetic backgrounds, during growth at 37°C (lanes 1–4) or after a 10 min heat shock at 46°C (lanes 5–8). Total RNA (10 µg) isolated from the wild-type *S. aureus* strains RN4220 (lanes 1 and 5), SA2000 ( $\Delta$ *ctsR*) (lanes 2 and 6), SA2001 ( $\Delta$ *hrcA*) (lanes 3 and 7) or SA2002 ( $\Delta$ *ctsR*  $\Delta$ *hrcA*) (lanes 4 and 8) was used as a template for reverse transcriptase. The corresponding DNA sequence is shown on the left.

stress. As a control, primer extension experiments were performed in parallel on the *clpB* gene, which is only controlled by CtsR, and expression levels were identical in strain RN4220 and the  $\Delta$ *hrcA* mutant, or in the  $\Delta$ *ctsR* and  $\Delta$ *ctsR*  $\Delta$ *hrcA* mutants, as expected (data not shown). When cells were subjected to a 10 min heat shock at 46°C, full derepression of *groESL* transcription was observed in all strains (Fig. 6, lanes 5–8).

#### Discussion

Unlike the model organisms *B. subtilis* and *E. coli*, little was known until recently about the regulation of stress response in *S. aureus*. Analysis of the complete genome sequence (Kuroda *et al.*, 2001) and several recent reports indicate the existence of the  $\sigma^B$  (Gertz *et al.*, 2000) and HrcA (Kuroda *et al.*, 1999) regulons in *S. aureus*, and we recently identified an orthologue of the CtsR class III stress regulator, as well as several potential target genes (Derré *et al.*, 1999a).

However, the presence of potential CtsR binding sites in the promoter regions of the *dnaK* and *groESL* operons was rather unexpected, as their expression was known to be controlled by HrcA (Kuroda *et al.*, 1999). This finding suggested the existence of a regulatory overlap between class I and class III genes, with dual heat shock regulation by CtsR and HrcA.

Using three different approaches, we have shown that the *S. aureus* *dnaK* and *groESL* operons are indeed repressed by both CtsR and HrcA. Using *B. subtilis* as a heterologous host, we showed that transcription from the *dnaK* or *groESL* promoters was significantly decreased in the presence of *S. aureus* CtsR or HrcA. By constructing inactivation mutants of *S. aureus* ( $\Delta$ *hrcA*,  $\Delta$ *ctsR*,  $\Delta$ *hrcA*  $\Delta$ *ctsR*), we were able to show that CtsR and HrcA act synergistically to maintain low expression levels of *groESL* in the absence of stress.

An *in vitro* protein–DNA interaction approach using purified CtsR and HrcA proteins from *S. aureus* allowed us to show independent or simultaneous binding of both proteins to the *dnaK* and *groESL* promoter regions by gel mobility shift and DNase I footprinting. The CIRCE sequence is located downstream from the transcription start site (Fig. 5C), as is the case for most genes controlled by HrcA, whereas the CtsR direct repeat operator overlaps the –10 or –35 promoter sequences (Fig. 5C) in agreement with previously characterized CtsR binding sites (Derré *et al.*, 1999a; Schumann *et al.*, 2002).

Previous attempts at purifying HrcA in an active form have been hampered by the low solubility of this protein, which forms inclusion bodies in *E. coli* and aggregates rapidly in the absence of denaturing agents such as urea (Ohta *et al.*, 1996; Mogk *et al.*, 1997; Minder *et al.*, 2000; Martirani *et al.*, 2001). For this reason, DNase I footprint-

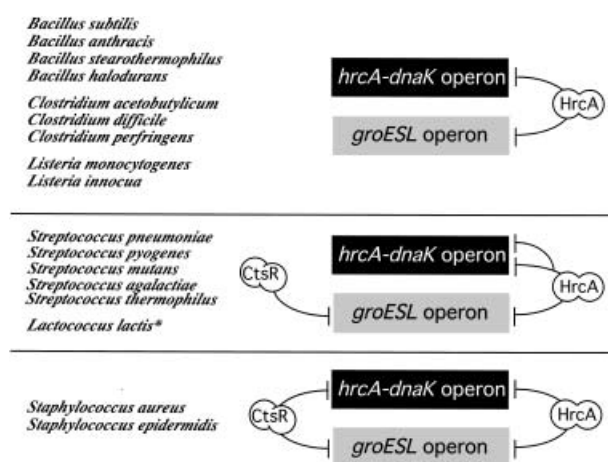


ing data for HrcA have been lacking until now. Previous *in vitro* gel mobility shift experiments used purified HrcA from either a Gram-negative bacterium, *Bradyrhizobium japonicum* (Minder *et al.*, 2000), or thermophilic organisms such as *Streptococcus thermophilus* or *Bacillus stearothermophilus*, under partially denaturing conditions or in the presence of purified GroEL (Mogk *et al.*, 1997; Martirani *et al.*, 2001). In each case, most of the HrcA protein was inactive, with only a small fraction of the radiolabelled DNA fragment sequestered in the protein–DNA complex, precluding more detailed analyses such as DNase I footprinting.

Recently, the HrcA protein from another thermophile, *Bacillus thermoglucosidarius*, was purified and renatured to an active form by solubilization in the presence of DNA containing the CIRCE element (Watanabe *et al.*, 2001). Based on a modification of this protocol, we purified active *S. aureus* HrcA in non-denaturing conditions without the addition of GroEL or of DNA containing the CIRCE element. This is the first report of active HrcA from a Gram-positive non-thermophilic organism, allowing us to carry out both gel mobility shift DNA-binding assays and DNase I footprinting experiments.

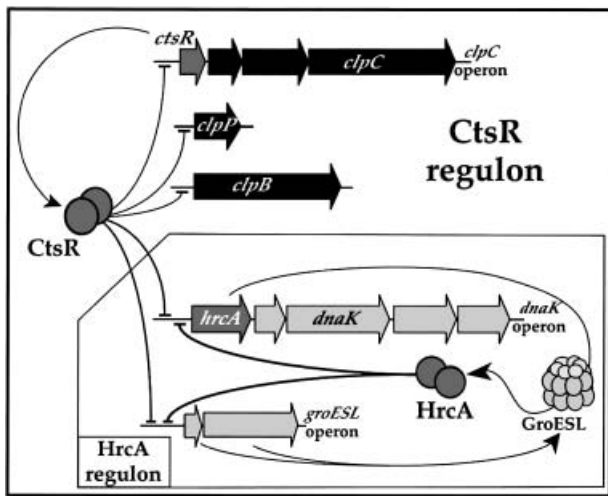
We show here that HrcA protects two regions in each of the *dnaK* and *groESL* promoters, which contain the inverted repeat sequences known as CIRCE. Interestingly, the poorly conserved 9 bp separating the two inverted repeats are not protected from DNase I cleavage (Fig. 5), indicating that HrcA binds specifically to the inverted repeats and not to the inter-repeat region, contrary to a previous report based on atomic force microscopy (Ohta *et al.*, 1996). The presence of DNase I hypersensitive sites within the regions protected by HrcA suggests that the DNA undergoes bending once HrcA is bound (Fig. 5). The palindromic nature of the HrcA binding site strongly suggests that the protein binds as a dimer, with its twofold axis of symmetry coinciding with that of the DNA binding site. This is in agreement with a previous report indicating that HrcA is likely to form a homodimer in solution (Martirani *et al.*, 2001). The two 9 bp inverted repeat sequences are separated by 9 bp, thus placing them two turns apart on the same face of the DNA double helix. The two HrcA subunits would therefore interact in the same manner with each inverted repeat, which is typical of HTH DNA-binding proteins. However, no classical HTH motif could be detected within HrcA using the method of Dodd and Egan (1990), although some limited similarity has been reported with the DeoR family of DNA-binding proteins (W. Schumann, personal communication).

Comparative genomics indicate that CtsR and its target sequences are highly conserved among low-G+C Gram-positive bacteria, including several pathogens (Schumann *et al.*, 2002). Genome sequence analysis allowed us to



**Fig. 7.** Dual regulation by CtsR and HrcA is present in several Gram-positive bacteria. In the *Bacillus* group (top), the *dnaK* and *groESL* operons are only controlled by HrcA. In the *Streptococcus* group (middle), the *dnaK* operon has two tandemly arranged CIRCE HrcA binding sites but no CtsR box (\*with the exception of *L. lactis* in which only one CIRCE sequence is present). Among the bacteria in this group, the *groESL* operon has operator sequences for both CtsR and HrcA in every case. In the *Staphylococcus* group (bottom), both the *dnaK* and *groESL* operons are dually regulated by CtsR and HrcA, with single operator sequences for each repressor.

predict the existence in many Gram-positive bacteria of an overlap between class I and class III genes, suggesting that several may be under dual heat shock regulation by CtsR and HrcA (Fig. 7). Indeed, in *B. subtilis* and closely related species (*B. anthracis*, *B. stearothermophilus*, *B. halodurans*, *Clostridium acetobutylicum*, *C. difficile*, *C. perfringens*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*), the HrcA and CtsR regulons are clearly distinct (Fig. 7). In the Streptococci group (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. mutans*, *S. agalactiae*, *S. thermophilus*, *Lactococcus lactis*), the two regulons partially overlap, as the *groESL* operon belongs to both, with the highly conserved CIRCE-HrcA recognition sequence as well as the CtsR target site organized in tandem (Chastanet *et al.*, 2001). Interestingly, although there is no CtsR binding site upstream from the *dnaK* operon in these bacteria, two CIRCE operator sequences are present instead within the promoter region in every case except *L. lactis*, perhaps compensating for the absence of combined dual repression by CtsR and HrcA. We have also noted the presence of a vestigial CtsR binding site upstream from the *dnaK* operon promoter of *L. monocytogenes*, which is controlled by HrcA. CtsR binds to this site, but is not able to repress, as the active promoter and transcription start site lie in between the CtsR operator and the CIRCE sequence (A. Chastanet, unpublished results). This may represent an evolutionary remnant, suggesting that this operon was once under dual regulation like that of the closely related bacterium *S. aureus*.



**Fig. 8.** The HrcA regulon of *S. aureus* is entirely embedded within the CtsR regulon, with the synthesis of HrcA itself repressed by CtsR. Many of the *clp* genes of *S. aureus* (*clpB*, *clpP*, *clpC*) appear to be controlled by CtsR but not by HrcA. Perpendicular bars indicate negative regulation, and arrows indicate protein synthesis. The arrow linking GroESL to HrcA indicates the positive role that the GroE chaperonin machine is thought to play in allowing HrcA to adopt an active conformation.

In *S. aureus* and *S. epidermidis*, however, the entire HrcA regulon (*dnaK* and *groESL* operons) is embedded within the CtsR regulon, with the synthesis of HrcA itself repressed by CtsR, as *hrcA* is the first gene of the *dnaK* operon (Fig. 8). Many *clp* genes of *S. aureus* (*clpB*, *clpP*, *clpC*) are also controlled by CtsR but not by HrcA (A. Chastanet, unpublished results; Fig. 8). In an attempt to identify specific signals to which only CtsR or HrcA might respond, stress gene expression was examined in *S. aureus* under different conditions. Expression of both *clpB* and the *dnaK* operon was strongly induced during heat shock or growth in the presence of SDS or ethanol but not by salt, alkaline or acid stress (data not shown). Furthermore, expression of the *dnaK* operon was not significantly different in the parental strain or the  $\Delta$ *ctsR* mutant after heat shock or ethanol stress (data not shown). These results suggest that both HrcA and CtsR respond to heat shock and ethanol stress. Thus, in *S. aureus*, there appear to be only three distinct classes of heat shock genes, as class I genes, defined in *B. subtilis* as the HrcA regulon, are in fact a subgroup of class III genes, the CtsR regulon. The remaining stress response genes belong to class II ( $\sigma^B$ ) or class IV, a heterogeneous class of genes, the regulatory mechanisms of which remain to be defined.

Several reports indicate induction of GroEL synthesis in *L. monocytogenes* (Gahan *et al.*, 2001) or *S. aureus* (Qoronfleh *et al.*, 1998) during the infectious process, suggesting that the chaperonin may be produced specifically in response to host cell signals. CtsR also controls the stress-induced synthesis of Clp ATP-dependent protease

subunits, which are implicated in the virulence of several pathogens (Misra *et al.*, 1996; Rouquette *et al.*, 1998; Gaillot *et al.*, 2000; 2001). The presence of a CIRCE sequence within the promoter region of the *dnaK* operon strongly suggest that both CtsR and HrcA negatively autoregulate their own synthesis. As CtsR also represses *hrcA* expression and that of the entire HrcA regulon in *S. aureus*, this dual regulatory mechanism ensures that the *dnaK* and *groESL* operons can only be expressed under stress conditions such as host infection that must also induce the expression of genes belonging to the CtsR regulon (*clpB*, *clpP*, *clpC*). Furthermore, combined repression by CtsR and HrcA allows expression of these genes to be maintained at very low basal levels in the absence of stress, as the two repressors act synergistically, allowing 20-fold repression of *groESL* expression levels, whereas either repressor alone only allows approximately threefold repression (Fig. 6). Dual regulation by CtsR and HrcA of the *S. aureus* *dnaK* and *groESL* operons could therefore play an important role in ensuring that synthesis of the classical chaperones is tightly coordinated with that of the Clp proteins during host infection, thus enhancing the adaptability of this pathogen under adverse environmental conditions.

## Experimental procedures

### Strains and media

*Bacillus subtilis* and *S. aureus* strains used in this study are listed in Table 1. *Escherichia coli* K-12 strain TG1 (Gibson, 1984) was used for cloning experiments, and *E. coli* strain BL21  $\lambda$ DE3 (Studier and Moffatt, 1986) for protein overexpression and purification. *E. coli* strains were grown in LB medium and transformed by electroporation (Sambrook *et al.*, 1989). *B. subtilis* 168 *trpC2* derivatives were grown in LB medium and transformed as described previously (Msadek *et al.*, 1998). *S. aureus* RN4220 (Kreiwirth *et al.*, 1983) and its derivatives were grown in BHI and transformed by electroporation, with selection on BHI plates supplemented with spectinomycin ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) or erythromycin ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) plus lincomycin ( $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ).

### DNA manipulations

Standard procedures were used to extract plasmids from *E. coli* (Sambrook *et al.*, 1989). Chromosomal DNA of *B. subtilis* and *S. aureus* was isolated as described previously (Msadek *et al.*, 1998), except for lysis of *S. aureus* cells, which was carried out using lysostaphin ( $60 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). DNA sequencing and polymerase chain reactions (PCRs) were carried out as described previously (Chastanet *et al.*, 2001).

### Plasmid constructions

Plasmids used in this study are listed in Table 2 and oligonucleotides in Table 3. Plasmid pDK (Chastanet *et al.*, 2001)

**Table 2.** Plasmids used in this study.

Plasmids	Description	Source or reference
pXT	Plasmid allowing integration at the <i>thrC</i> locus and expression from the <i>PxyIA</i> xylose-inducible promoter	Derré <i>et al.</i> (2000)
pXT <i>ctsRSau</i>	pXT derivative carrying the <i>S. aureus ctsR</i> coding sequence	This study
pXT <i>hrcASau</i>	pXT derivative carrying the <i>S. aureus hrcA</i> coding sequence	This study
pDK	Plasmid allowing transcriptional fusions with <i>bgaB</i> and integration at the <i>amyE</i> locus	Chastanet <i>et al.</i> (2001)
pDK <i>dnaKsau</i>	pDK derivative carrying a <i>dnaK</i> – <i>bgaB</i> fusion	This study
pDK <i>groESau</i>	pDK derivative carrying a <i>groE</i> – <i>bgaB</i> fusion	This study
pET16b	Vector for overproducing His-tagged proteins	Novagen
pET28a	Vector for overproducing His-tagged proteins	Novagen
pET28/16	pET16b derivative for overproduction of His-tagged proteins	This study
pETHisCtsR	pET28/16 derivative for overproduction of CtsR	This study
pETHisHrcA	pET28/16 derivative for overproduction of HrcA	This study
pRN5101	pE194 derivative with a thermosensitive origin of replication	Villafane <i>et al.</i> (1987)
pRNΔ <i>ctsR</i>	pRN5101 derivative carrying a <i>spc</i> gene, for deletion/replacement of the <i>S. aureus ctsR</i> gene	This study
pMAD	pRN5101 derivative carrying a constitutively expressed <i>bgaB</i> gene	M. Débarbouillé and M. Arnaud (unpublished)
pMADΔ <i>hrcA</i>	pMAD derivative, for deletion/replacement of the <i>S. aureus hrcA</i> gene	This study

was used for constructing transcriptional fusions between the promoter regions of the *S. aureus dnaK* or *groESL* operons and the *B. stearothermophilus bgaB* gene, encoding a thermostable β-galactosidase (Hirata *et al.*, 1986), with subsequent integration at the *B. subtilis amyE* locus. Transcriptional fusions in pDK were constructed using *EcoRI*–*BamHI* DNA fragments generated by PCR using oligonucleotide pairs TM286/TM287 and AC34/AC35, corresponding to the *S. aureus dnaK* and *groESL* promoter regions respectively. These fragments were cloned into the respective sites of plasmid pDK to produce plasmids pDK*dnaKSau* and pDK*groESau* respectively.

Plasmid pXT (Derré *et al.*, 2000) was used to integrate copies of the *S. aureus ctsR* and/or *hrcA* genes at the *B. subtilis thrC* locus under the control of a xylose-inducible promoter (*PxyIA*). A *BamHI*–*EcoRI* DNA fragment corresponding to the coding sequence of *S. aureus ctsR* was generated by PCR using oligonucleotides AC3/AC4, and a *HindIII*–*EcoRI* DNA fragment corresponding to the coding sequence of *S. aureus hrcA* was generated by PCR using oligonucleotides AC11/AC12. These fragments were cloned into the respective sites of pXT to yield plasmids pXT*ctsRSau* and pXT*hrcASau* respectively.

CtsR and HrcA were overexpressed using pETHisCtsR

**Table 3.** Oligonucleotides used in this study.

Name	Sequence	Description
TM286	GAAGAATTC AAGCTTTT CCTAATAAATGATTA AAAAAAATTG	<i>pdnaK</i> – <i>bgaB</i> fusion
TM287	GGAGGATCCATGTTTT CACCTCATTAGCACTCAC	<i>pdnaK</i> – <i>bgaB</i> fusion
AC34	GAAGAATTCGTAATAAC TTGAAGTTACAAAAC	<i>pgroE</i> – <i>bgaB</i> fusion
AC35	GGAGGATCCTGATTGTT CCTCTTAAA AAC	<i>pgroE</i> – <i>bgaB</i> fusion
AC3	GGAGGATCCAAAGGGGTG ATATACATGCAC	<i>pxylA</i> '– <i>ctsR</i> fusion
AC4	GAAGAATTCACCTCAT TTTCAATTAAGTAATA	<i>pxylA</i> '– <i>ctsR</i> fusion
AC11	AAGAAGCTTGCTAATG AGGTGAAAACATGATTACAGATAGGC	<i>pxylA</i> '– <i>hrcA</i> fusion
AC12	GAAGAATTCCTTTTCA ATCCATCATTACCAAATTCATTTA	<i>pxylA</i> '– <i>hrcA</i> fusion
AC76	ATACATATGCACAATATG TCTGACATC	<i>ctsR</i> overexpression
AC77	TCAGGATCCTTAGTAATA ATTTATAACTGGTAAC	<i>ctsR</i> overexpression
AC78	GAACATATGATTACAGATAGGCAATTGAG	<i>hrcA</i> overexpression
AC79	AATGGATCCTTACCAAAT TCTATTTAATAATTG	<i>hrcA</i> overexpression
AC26	AAGCTTTCCATAAAATG ATTA AAAAAAATTG	<i>pdnaK</i> DNase I footprint
AC27	CGCTCAATTAGTGTTTT TAGAACCAACGGG	<i>pdnaK</i> DNase I footprint
AC108	GCCCATATCTTGTGCATA ATTTTCC	<i>pgroE</i> DNase I footprint
AC109	CACGATTTCCAATGGT TTTTAGC	<i>pgroE</i> DNase I footprint
TM323	GAAGAATTCGCTCTCTG AATTTCAACGACA	<i>ctsR</i> deletion
TM324	GAAGAATTCACCTAGATC CTTTTGACTCTA	<i>spc</i> cassette
TM325	GGTGGTACCTGTTATTG CAATCAAATTAGC	<i>spc</i> cassette
TM326	GGAGGATCCCATTGCGC CTACAATGACAGC	<i>ctsR</i> deletion
TM327	ATGGGTACCTAGAAAGT ATTTGGAGGACAGA	<i>ctsR</i> deletion
TM328	AAGAAGCTTGATTATATA AAGCCTGTAATG	<i>ctsR</i> deletion
JF3	TACGGATCCGTTTACAAT CACAGGCGAGT	<i>hrcA</i> deletion
JF4	GTTTCTAGATCATTAGCA CTCACTTATCTC	<i>hrcA</i> deletion
JF5	ATGGGTACCTAGAAAGT ATTTGGAGGACAGA	<i>hrcA</i> deletion
JF6	CTGGAGCTCCTTGTGGT GTGTATGATTAC	<i>hrcA</i> deletion

and pETHisHrcA respectively. First, a derivative of plasmid pET16b (Novagen) was constructed, by replacing the 171 bp *XbaI*–*BlnI* fragment of pET16b with the 262 bp *XbaI*–*BlnI* fragment of pET28a (Novagen) to give plasmid pET28/16. In a second step, *NdeI*–*Bam*HI DNA fragments, corresponding to the *ctsR* (471 bp) or *hrcA* (987 bp) coding sequences, were generated by PCR using oligonucleotide pairs AC76/AC77 or AC78/AC79, respectively, and cloned between the *NdeI*–*Bam*HI sites of plasmid pET28/16. This allows the creation of translational fusions adding six histidine residues to the amino-terminus of the corresponding protein, placing expression of the genes under the control of a T7 promoter.

A deletion/replacement  $\Delta$ *ctsR*::*spc* mutant of *S. aureus* was generated using plasmid pRN $\Delta$ *ctsR*. This plasmid was constructed by first cloning a 1017 bp DNA fragment, generated by PCR using oligonucleotides TM324/TM325 and carrying the *S. aureus spc* spectinomycin resistance gene (Murphy, 1985), between two DNA fragments generated using oligonucleotides TM323/TM326 (1037 bp) and TM327/TM328 (1004 bp), corresponding, respectively, to the chromosomal DNA regions upstream and downstream from *ctsR*, in plasmid pRN5101, which has a thermosensitive pE194-based origin of replication (Villafane *et al.*, 1987). The RN4220 *S. aureus* strain was transformed by pRN $\Delta$ *ctsR* with selection for erythromycin resistance. Transformants were grown at the non-permissive temperature (37°C), to select for cells in which the plasmid had been integrated into the chromosome by homologous recombination. To favour the second recombination event, a single colony was grown at 30°C for 10 generations and plated at 37°C overnight. Spectinomycin<sup>r</sup>/erythromycin<sup>s</sup> integrants (strain SA2000,  $\Delta$ *ctsR*::*spc*) arose through a double cross-over event, in which most of the *ctsR* coding sequence was deleted (codons 30–147) and replaced by the *spc* spectinomycin resistance gene, deprived of its transcription initiation and termination signals to prevent polar effects on the transcription of the remaining genes of the *clpC* operon.

A markerless  $\Delta$ *hrcA* deletion mutant of *S. aureus* was constructed using a similar approach, by cloning two DNA fragments generated by PCR using oligonucleotides JF3/JF4 (1000 bp) and JF5/JF6 (1000 bp), corresponding, respectively, to the chromosomal DNA regions upstream and downstream from *hrcA*, in plasmid pMAD to yield plasmid pMAD $\Delta$ *hrcA*. pMAD is a pRN5101 derivative that carries a constitutively expressed transcriptional fusion with the *bgaB*  $\beta$ -galactosidase gene, allowing easy detection on Xgal plates of transformants that have lost the plasmid vector through a double cross-over event (M. Arnaud and M. Débarbouillé, unpublished). Integration/excision of plasmid pMAD $\Delta$ *hrcA* was carried out as detailed above by transforming *S. aureus* strain RN4220, yielding strain SA2001 ( $\Delta$ *hrcA*) in which the entire *hrcA* coding sequence was seamlessly removed, precisely fusing the regions immediately upstream and downstream from *hrcA*. PCR amplifications were used to confirm the loss of the *ctsR* or *hrcA* genes. Strain SA2002 ( $\Delta$ *ctsR*  $\Delta$ *hrcA*) was obtained by transforming strain SA2000 ( $\Delta$ *ctsR*) with the pMAD $\Delta$ *hrcA* plasmid.

#### Overproduction and purification of CtsR

pETHisCtsR was introduced into a BL21  $\lambda$ DE3 strain, in

which the T7 RNA polymerase gene is under the control of the inducible *lacUV5* promoter, which also carries the pRep4 plasmid allowing co-expression of the GroESL chaperonin, in order to optimize recombinant protein solubility (Amrein *et al.*, 1995). The resulting strain was grown in LB medium at 30°C, and expression was induced during the mid-exponential growth phase by the addition of 0.1 mM IPTG. Cells were centrifuged at 10 800 *g* for 30 min and resuspended in 1/50th of the culture volume of buffer I (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole). Cells were disrupted by sonication, and cell debris was removed by two consecutive 30 min centrifugation steps at 17 200 *g*. *E. coli* crude protein extracts were loaded on a 0.15 ml Ni-NTA agarose (Qiagen) column equilibrated with buffer I. The column was washed with 10 volumes of buffer II (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6, 300 mM NaCl, 30 mM imidazole), and the CtsR protein was eluted with an imidazole gradient (30–500 mM). Fractions were pooled and dialysed against buffer III (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8, 300 mM NaCl, 50% glycerol) to remove imidazole and concentrate the protein solution approximately fourfold.

#### Purification and renaturation of HrcA

pETHisHrcA was introduced into the BL21  $\lambda$ DE3 pRep4 strain. His-tagged HrcA was overproduced by induction with IPTG (1 mM) and purified from the crude extract on a 0.15 ml Ni-NTA agarose column using the denaturing conditions (6 M urea) recommended by the manufacturer (Qiagen). Purified HrcA was then renatured in a two-step procedure essentially as described previously (Watanabe *et al.*, 2001) using poly-(dl-dC) instead of plasmid DNA.

#### Gel mobility shift DNA-binding assays

Radiolabelled DNA fragments corresponding to the promoter regions of the *ctsR* and *hrcA* genes were generated by PCR using *Pwo* polymerase (Roche) and 20 pmol of oligonucleotides AC26/AC27 or AC108/AC109, respectively, one of which was previously labelled using T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) and [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-dATP. DNA binding was performed as described previously (Derré *et al.*, 1999a). After 15 min of binding at 4°C, samples were loaded directly onto a 6% polyacrylamide gel (89 mM Tris, 89 mM borate, 2 mM EDTA, 2.5% glycerol) during electrophoresis (14 V cm<sup>-1</sup>), which was then pursued for 1 h at 4°C.

#### DNase I footprinting

Radiolabelled DNA fragments corresponding to the *ctsR* or *hrcA* promoters prepared for gel shift experiments were used for DNase I footprinting. CtsR/HrcA binding to DNA was performed at 5°C in the presence of BSA (bovine serum albumin) (0.1  $\mu$ g), and DNase I treatment was then performed as described previously (Derré *et al.*, 1999a).

#### RNA extraction and primer extension

*Staphylococcus aureus* strains were grown in BHI medium at 37°C with aeration until the optical density reached 0.5–0.6

at 600 nm; half the culture was then shifted to 46°C, and incubation was pursued for another 10 min. Cells were pelleted and frozen immediately, and RNA extraction and primer extensions were performed as described previously (Chastanet *et al.*, 2001) using radiolabelled oligonucleotide AC109. Radioactive gels were exposed to storage phosphor screens and scanned with a Molecular Dynamics Storm 860 optical scanner. Quantification of primer extension products was performed using the IMAGEQUANT 5.1 software package (Molecular Dynamics).

#### *β*-Galactosidase assays

*β*-Galactosidase activity was estimated on plates by Xgal hydrolysis (100 µg ml<sup>-1</sup>), and specific activities were determined as described previously (Chastanet *et al.*, 2001), expressed as nmol of ONP min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein.

#### Database comparisons and sequence analysis

Computations were performed using the GCG sequence analysis software package (version 10.1). Sequence comparisons with the GenBank database were accomplished using the National Center for Biotechnology Information BLAST2 (Altschul *et al.*, 1997) web server with the default parameter values provided.

#### Acknowledgements

We are grateful to Isabelle Derré for many helpful discussions, and Georges Rapoport for critical reading of the manuscript. We thank Marc Galimand for the gift of *S. aureus* RN4220 chromosomal DNA, as well as M. Arnaud and M. Débarbouillé for plasmid pMAD. We thank The Institute for Genomic Research, the University of Oklahoma Advanced Center for Genome Technology, the Laboratoire de Génomique des Microorganismes Pathogènes (Institut Pasteur), the Sanger Centre and Genome Therapeutics for generously providing access to unfinished microbial genome sequences, as well as Pascal Hols and Benoît Grossiord (Université Catholique de Louvain, Belgium) for the nucleotide sequences of stress genes from *Streptococcus thermophilus* LMG1831. This work was supported by research funds from the European Commission (grant QLG2-CT-1999-01455), the Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur, Université Paris 7, Ministère de la Défense (Délégation Générale pour l'Armement, Grant 0034069004707501) and the Programme de Recherche Fondamentale en Microbiologie, Maladies Infectieuses et Parasitaires of the Ministère de la Recherche. Arnaud Chastanet was the recipient of a PhD thesis fellowship from the Ministère de la Recherche.

#### References

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein

database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389–3402.

Amrein, K.E., Takacs, B., Stieger, M., Molnos, J., Flint, N.A., and Burn, P. (1995) Purification and characterization of recombinant human p50csk protein- tyrosine kinase from an *Escherichia coli* expression system overproducing the bacterial chaperones GroES and GroEL. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1048–1052.

Bukau, B. (1993) Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol Microbiol* **9**: 671–680.

Chastanet, A., Prudhomme, M., Claverys, J.P., and Msadek, T. (2001) Regulation of *Streptococcus pneumoniae* *clp* genes and their role in competence development and stress survival. *J Bacteriol* **183**: 7295–7307.

Clements, M.O., and Foster, S.J. (1999) Stress resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* **7**: 458–462.

Derré, I., Rapoport, G., and Msadek, T. (1999a) CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **31**: 117–132.

Derré, I., Rapoport, G., Devine, K., Rose, M., and Msadek, T. (1999b) ClpE, a novel type of HSP100 ATPase, is part of the CtsR heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **32**: 581–593.

Derré, I., Rapoport, G., and Msadek, T. (2000) The CtsR regulator of stress response is active as a dimer and specifically degraded *in vivo* at 37°C. *Mol Microbiol* **38**: 335–347.

Dodd, I.B., and Egan, J.B. (1990) Improved detection of helix-turn-helix DNA-binding motifs in protein sequences. *Nucleic Acids Res* **18**: 5019–5026.

Gahan, C.G., O'Mahony, J., and Hill, C. (2001) Characterization of the *groESL* operon in *Listeria monocytogenes*: utilization of two reporter systems (*gfp* and *hly*) for evaluating *in vivo* expression. *Infect Immun* **69**: 3924–3932.

Gaillot, O., Pellegrini, E., Bregenholt, S., Nair, S., and Berche, P. (2000) The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **35**: 1286–1294.

Gaillot, O., Bregenholt, S., Jaubert, F., Di Santo, J.P., and Berche, P. (2001) Stress-induced ClpP serine protease of *Listeria monocytogenes* is essential for induction of listeriolysin O-dependent protective immunity. *Infect Immun* **69**: 4938–4943.

Garduno, R.A., Garduno, E., and Hoffman, P.S. (1998) Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect Immun* **66**: 4602–4610.

Gertz, S., Engelmann, S., Schmid, R., Ziebandt, A.K., Tischer, K., Scharf, C., *et al.* (2000) Characterization of the  $\sigma^B$  regulon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **182**: 6983–6991.

Gibson, T.J. (1984) Studies on the Epstein–Barr Virus Genome. PhD Thesis, University of Cambridge, Cambridge.

Gottesman, S., Wickner, S., and Maurizi, M.R. (1997) Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev* **11**: 815–823.

Hanawa, T., Fukuda, M., Kawakami, H., Hirano, H., Kamiya, S., and Yamamoto, T. (1999) The *Listeria monocytogenes* DnaK chaperone is required for stress tolerance and effi-

- cient phagocytosis with macrophages. *Cell Stress Chaperones* **4**: 118–128.
- Hennequin, C., Porcheray, F., Waligora-Dupriet, A., Collignon, A., Barc, M., Bourlioux, P., and Karjalainen, T. (2001) GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology* **147**: 87–96.
- Hirata, H., Fukazawa, T., Negoro, S., and Okada, H. (1986) Structure of a  $\beta$ -galactosidase gene of *Bacillus stearothermophilus*. *J Bacteriol* **166**: 722–727.
- Hübel, A., Krobitch, S., Horauf, A., and Clos, J. (1997) *Leishmania major* Hsp100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite. *Mol Cell Biol* **17**: 5987–5995.
- Kreiswirth, B.N., Lofdahl, S., Betley, M.J., O'Reilly, M., Schlievert, P.M., Bergdoll, M.S., and Novick, R.P. (1983) The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature* **305**: 709–712.
- Krüger, E., Zühlke, D., Witt, E., Ludwig, H., and Hecker, M. (2001) Clp-mediated proteolysis in Gram-positive bacteria is autoregulated by the stability of a repressor. *EMBO J* **20**: 852–863.
- Kuroda, M., Kobayashi, D., Honda, K., Hayashi, H., and Ohta, T. (1999) The *hsp* operons are repressed by the *hrc37* of the *hsp70* operon in *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* **43**: 19–27.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., et al. (2001) Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**: 1225–1240.
- Lau, G.W., Haataja, S., Lonetto, M., Kensit, S.E., Marra, A., Bryant, A.P., et al. (2001) A functional genomic analysis of type 3 *Streptococcus pneumoniae* virulence. *Mol Microbiol* **40**: 555–571.
- Martirani, L., Raniello, R., Naclerio, G., Ricca, E., and De Felice, M. (2001) Identification of the DNA-binding protein, HrcA, of *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol Lett* **198**: 177–182.
- Mei, J.M., Nourbakhsh, F., Ford, C.W., and Holden, D.W. (1997) Identification of *Staphylococcus aureus* virulence genes in a murine model of bacteraemia using signature-tagged mutagenesis. *Mol Microbiol* **26**: 399–407.
- Minder, A.C., Fischer, H.M., Hennecke, H., and Narberhaus, F. (2000) Role of HrcA and CIRCE in the heat shock regulatory network of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* **182**: 14–22.
- Misra, N., Habib, S., Ranjan, A., Hasnain, S.E., and Nath, I. (1996) Expression and functional characterisation of the *clpC* gene of *Mycobacterium leprae*: ClpC protein elicits human antibody response. *Gene* **172**: 99–104.
- Mogk, A., Homuth, G., Scholz, C., Kim, L., Schmid, F.X., and Schumann, W. (1997) The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *EMBO J* **16**: 4579–4590.
- Msadek, T., Dartois, V., Kunst, F., Herbaud, M.-L., Denizot, F., and Rapoport, G. (1998) ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol Microbiol* **27**: 899–914.
- Murphy, E. (1985) Nucleotide sequence of a spectinomycin adenylyltransferase AAD(9) determinant from *Staphylococcus aureus* and its relationship to AAD(3')(9). *Mol Gen Genet* **200**: 33–39.
- Nair, S., Frehel, C., Nguyen, L., Escuyer, V., and Berche, P. (1999) ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **31**: 185–196.
- Nair, S., Milohanic, E., and Berche, P. (2000a) ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **68**: 7061–7068.
- Nair, S., Derré, I., Msadek, T., Gaillot, O., and Berche, P. (2000b) CtsR controls class III heat shock gene expression in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **35**: 800–811.
- Ohta, T., Nettikadan, S., Tokumasu, F., Ideno, H., Abe, Y., Kuroda, M., et al. (1996) Atomic force microscopy proposes a novel model for stem-loop structure that binds a heat shock protein in the *Staphylococcus aureus* HSP70 operon. *Biochem Biophys Res Commun* **226**: 730–734.
- Polissi, A., Pontiggia, A., Feger, G., Altieri, M., Mottl, H., Ferrari, L., and Simon, D. (1998) Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **66**: 5620–5629.
- Price, C.W. (2002) General stress response. In *Bacillus subtilis and its Closest Relatives: from Genes to Cells*. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., and Losick, R.M. (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 369–384.
- Qoronfleh, M.W., Weraarchakul, W., and Wilkinson, B.J. (1993) Antibodies to a range of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* heat shock proteins in sera from patients with *S. aureus* endocarditis. *Infect Immun* **61**: 1567–1570.
- Qoronfleh, M.W., Bortner, C.A., Schwartzberg, P., and Wilkinson, B.J. (1998) Enhanced levels of *Staphylococcus aureus* stress protein GroEL and DnaK homologs early in infection of human epithelial cells. *Infect Immun* **66**: 3024–3027.
- Rouquette, C., Ripio, M.-T., Pellegrini, E., Bolla, J.-M., Tascon, R.I., Vázquez-Boland, J.-A., and Berche, P. (1996) Identification of a ClpC ATPase required for stress tolerance and *in vivo* survival of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **21**: 977–987.
- Rouquette, C., de Chastellier, C., Nair, S., and Berche, P. (1998) The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages. *Mol Microbiol* **27**: 1235–1246.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schumann, W., Hecker, M., and Msadek, T. (2002) Regulation and function of heat-inducible genes in *Bacillus subtilis*. In: *Bacillus subtilis and its Closest Relatives: from Genes to Cells*. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., and Losick, R.M. (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 359–368.
- Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113–130.
- Varmanen, P., Ingmer, H., and Vogensen, F.K. (2000) *ctsR*

- of *Lactococcus lactis* encodes a negative regulator of *clp* gene expression. *Microbiology* **146**: 1447–1455.
- Villafane, R., Bechhofer, D.H., Narayanan, C.S., and Dubnau, D. (1987) Replication control genes of plasmid pE194. *J Bacteriol* **169**: 4822–4829.
- Watanabe, K., Yamamoto, T., and Suzuki, Y. (2001) Renaturation of *Bacillus thermoglucosidasius* HrcA repressor by DNA and thermostability of the HrcA-DNA complex *in vitro*. *J Bacteriol* **183**: 155–161.

## **Annexe 2**

**Regulation of *Streptococcus pneumoniae* *clp* genes and their role in competence development and stress survival.**

J. Bacteriol., (2001) 183(24), 7295-7307.



## Regulation of *Streptococcus pneumoniae* *clp* Genes and Their Role in Competence Development and Stress Survival

ARNAUD CHASTANET,<sup>1</sup> MARC PRUDHOMME,<sup>2</sup> JEAN-PIERRE CLAVERYS,<sup>2</sup>  
AND TAREK MSADEK<sup>1\*</sup>

Unité de Biochimie Microbienne, Institut Pasteur, URA 2172 du Centre National de la Recherche Scientifique, 75724 Paris Cedex 15,<sup>1</sup> and Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaire, UMR5100 du Centre National de la Recherche Scientifique-Université Paul Sabatier, 31062 Toulouse Cedex,<sup>2</sup> France

Received 2 July 2001/Accepted 19 September 2001

**In vitro mariner transposon mutagenesis of *Streptococcus pneumoniae* chromosomal DNA was used to isolate regulatory mutants affecting expression of the *comCDE* operon, encoding the peptide quorum-sensing two-component signal transduction system controlling competence development. A transposon insertion leading to increased *comC* expression was found to lie directly upstream from the *S. pneumoniae* *clpP* gene, encoding the proteolytic subunit of the Clp ATP-dependent protease, whose expression in *Bacillus subtilis* is controlled by the CtsR repressor. In order to examine *clp* gene regulation in *S. pneumoniae*, a detailed analysis of the complete genome sequence was performed, indicating that there are five likely CtsR-binding sites located upstream from the *clpE*, *clpP*, and *clpL* genes and the *ctsR-clpC* and *groESL* operons. The *S. pneumoniae* *ctsR* gene was cloned under the control of an inducible promoter and used to demonstrate regulation of the *S. pneumoniae* *clpP* and *clpE* genes and the *clpC* and *groESL* operons by using *B. subtilis* as a heterologous host. The CtsR protein of *S. pneumoniae* was purified and shown to bind specifically to the *clpP*, *clpC*, *clpE*, and *groESL* regulatory regions. *S. pneumoniae*  $\Delta$ *ctsR*,  $\Delta$ *clpP*,  $\Delta$ *clpC*, and  $\Delta$ *clpE* mutants were constructed by gene deletion/replacement. ClpP was shown to act as a negative regulator, preventing competence gene expression under inappropriate conditions. Phenotypic analyses also indicated that ClpP and ClpE are both required for thermotolerance. Contrary to a previous report, we found that ClpC does not play a major role in competence development, autolysis, pneumolysin production, or growth at high temperature of *S. pneumoniae*.**

The regulatory pathways leading to the development of competence for DNA uptake in the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Streptococcus pneumoniae* are strikingly similar. Proteins required for DNA binding and transport, encoded by the so-called late competence genes, are well conserved in the two bacteria (12), and the initial regulatory events involve extracellular peptide-signaling systems in both cases (57). Competence of *S. pneumoniae* for DNA transformation is controlled by a peptide quorum-sensing signal transduction pathway including the ComC-derived competence-stimulating peptide, the ComD membrane-bound histidine kinase, and the ComE response regulator, all of which are encoded by the *comCDE* operon (5, 19, 42). In *B. subtilis*, an unrelated extracellular peptide derived from the ComX polypeptide activates the ComP/ComA two-component system that is encoded by the *comPA* operon lying directly downstream from *comX* (25, 57).

Major differences exist, however, in the intermediate steps between the quorum-sensing device and the specific synthesis of competence proteins involved in DNA uptake and processing. In *S. pneumoniae*, this link is provided by a specific sigma factor, ComX, whose synthesis is dependent on the ComD/ComE two-component system (26). The *S. pneumoniae* ComX sigma factor is, in turn, required for the competence-specific

expression of late *com* genes (26). In *B. subtilis*, no competence-specific sigma factor exists and the link between quorum sensing and late competence gene expression instead requires the release of the ComK transcription activator from targeted proteolysis by the ClpCP ATP-dependent protease (34, 59).

Clp ATP-dependent proteases are involved in regulation by proteolysis in several bacteria (45) and consist of a proteolytic subunit, ClpP, on which substrate specificity is conferred through association with ATPase subunits (ClpA, ClpC, and ClpX), which include members of the ubiquitous Hsp100 family (52). ComK synthesis in *B. subtilis* involves a complex network of two-component systems and global regulators, in which the general stress response genes *clpC* and *clpP* play essential roles (34, 35, 37). *clpC* and *clpP* of *B. subtilis* are both members of the class III group of heat shock genes, whose expression is controlled by the CtsR repressor (11).

There is growing evidence indicating that Clp proteins play an important role in the survival and virulence of pathogens during host infection. The *clpP* gene was isolated during a signature-tagged mutagenesis screen for virulence genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (21). In *Yersinia enterocolitica*, ClpP has been shown to modulate transcription of the adhesion invasion locus (*ail*) (41). Clp ATPases have also been shown to be involved in virulence, including ClpX of *Staphylococcus aureus* (31) and ClpB of *Leishmania* sp. (52). Furthermore, patients with leprosy or tuberculosis have antibodies specifically directed against mycobacterial ClpC (33). In *Listeria monocytogenes*, ClpP and the ClpC and ClpE Hsp100

\* Corresponding author. Mailing address: Unité de Biochimie Microbienne, Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. Phone: (33) 1 45 68 88 09. Fax: (33) 1 45 68 89 38. E-mail: tmsadek@pasteur.fr.

TABLE 1. *B. subtilis* and *S. pneumoniae* strains used in this study

Strain	Relevant genotype	Source or reference <sup>a</sup>
<i>B. subtilis</i>		
QB4991	<i>trpC2 ΔctsR amyE::('lacZ aphA3)</i>	11
QB8068	<i>trpC2 ΔctsR amyE::('lacZ cat)</i>	pAC5→QB4991
QB8069	<i>trpC2 ΔctsR amyE::('lacZ aphA3) thrC::(PxylA-ctsR spc)</i>	pxyl-ctsR- <i>Spn</i> →QB4991
QB8070	<i>trpC2 ΔctsR amyE::(clpP'-bgaB cat) thrC::(PxylA-ctsR spc)</i>	pDL- <i>clpP</i> - <i>Spn</i> →QB8069
QB8071	<i>trpC2 ΔctsR amyE::(clpC'-bgaB cat) thrC::(PxylA-ctsR spc)</i>	pDL- <i>clpC</i> - <i>Spn</i> →QB8069
QB8132	<i>trpC2 ΔctsR amyE::(groES'-bgaB aphA3)</i>	pDK- <i>groE</i> - <i>Spn</i> →QB8068
QB8133	<i>trpC2 ΔctsR amyE::(groES'-bgaB aphA3) thrC::(PxylA-ctsR spc)</i>	pxyl-ctsR- <i>Spn</i> →QB8132
QB8134	<i>trpC2 ΔctsR amyE::(clpE'-bgaB aphA3)</i>	pDK- <i>clpE</i> - <i>Spn</i> →QB8068
QB8135	<i>trpC2 ΔctsR amyE::(clpE'-bgaB aphA3) thrC::(PxylA-ctsR spc)</i>	pxyl-ctsR- <i>Spn</i> →QB8134
<i>S. pneumoniae</i>		
R6	Subclone of R36A original isolate	Laboratory stock
R800	R6 derivative	27
R348	<i>ebg::spc comC::pXF520</i>	29
R354	<i>ebg::kan comC::pXF520</i>	29
R461	<i>ebg::kan comC::pXF520 spc93::clpP</i>	This study
R638	<i>spc93::clpP</i>	R461→R800
SP2000	<i>ebg::spc comC::pXF520 ΔclpP::aphA3</i>	<i>ΔclpP</i> DNA→R348
SP2001	<i>ebg::spc comC::pXF520 ΔclpC::aphA3</i>	<i>ΔclpC</i> DNA→R348
SP2002	<i>ebg::spc comC::pXF520 ΔclpE::aphA3</i>	<i>ΔclpE</i> DNA→R348
SP2003	<i>ebg::spc comC::pXF520 ΔctsR::aphA3</i>	<i>ΔctsR</i> DNA→R348
R895	<i>ssbB::pR424</i>	pR424→R800
R1053	<i>ssbB::pR424 ΔclpE::aphA3</i>	SP2002→R895
R1054	<i>ssbB::pR424 spc93::clpP</i>	R461→R895
R1055	<i>ssbB::pR424 ΔctsR::aphA3</i>	SP2003→R895
R1056	<i>ssbB::pR424 ΔclpC::aphA3</i>	SP2001→R895

<sup>a</sup> Arrows indicate construction by transformation with chromosomal or plasmid DNA or PCR-generated DNA fragments.

ATPases are all required for stress survival, growth at high temperature, and virulence (13, 40, 47, 48).

In *S. pneumoniae*, a gene encoding an Hsp100-type Clp ATPase was isolated during a large-scale identification of virulence genes using the signature-tagged mutagenesis technique (44). Virulence of the *S. pneumoniae* mutant was significantly affected, as shown by using a mouse septicemia model (44). However, despite their ubiquity in bacteria and their important role in virulence, little is known about the regulation and function of *clp* genes in pathogens other than *L. monocytogenes*, where many of the *clp* genes have been shown to be controlled by the CtsR repressor (39). Elucidation of the regulatory pathways controlling *clp* gene expression is therefore likely to be important for our understanding of the virulence of gram-positive pathogens.

We show here that ClpP of *S. pneumoniae* plays a role in the maintenance of low levels of *comCDE* expression under conditions that do not support competence development. We also show that expression of the *S. pneumoniae clpP* and *clpE* genes and *clpC* and *groESL* operons is heat inducible and controlled directly by the CtsR repressor. Phenotypic analyses indicate that, unlike in *B. subtilis* and contrary to a previous report (4), ClpC is not involved in control of the expression of *S. pneumoniae* competence genes.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, growth conditions, and transformation.** *Escherichia coli* K-12 strain TG1 (14) was used for cloning experiments, and *E. coli* strain BL21 λ DE3 (54) was used for protein overexpression and purification. *E. coli* strains were grown in LB medium (50) and transformed by electroporation with selection on LB plates supplemented with ampicillin (100 μg/ml).

The *B. subtilis* and *S. pneumoniae* strains used in this work are listed in Table 1. The *B. subtilis* strains used in this study were derivatives of *B. subtilis* 168 *trpC2*

and were grown in LB medium. They were transformed and selected by using plasmid or chromosomal DNA as previously described (35).

*S. pneumoniae* strains were grown in brain heart infusion (BHI; Difco) or CAT (46) medium. Expression of late competence genes was examined during growth in C+Y medium (28) as described previously (1). Transformation of *S. pneumoniae* was performed as described previously (1, 28), by using precompetent cells treated with synthetic competence-stimulating peptide 1 (25 ng/ml) to induce competence. Transformants were selected by plating on D medium agar plates supplemented with 4% horse blood (1) with kanamycin at 250 μg/ml or spectinomycin at 100 μg/ml.

**In vitro mariner mutagenesis.** Mutagenesis of *S. pneumoniae* chromosomal DNA was performed as previously described (29). Briefly, plasmid pR412 was used as the source for the 1,146-bp *spc mariner* minitransposon, which carries the *spc* spectinomycin resistance-encoding gene (29). Plasmid pR412 was incubated with chromosomal DNA from *S. pneumoniae* strain R800 in the presence of purified Himar1 transposase, leading to random insertion of the minitransposon within the chromosomal DNA (29). Gaps in the transposition products were repaired, and the resulting in vitro-generated transposon insertion library was used to transform *S. pneumoniae* (29).

**DNA manipulations and general experimental procedures.** Standard procedures were used to extract plasmids from *E. coli* (50). Chromosomal DNA of *B. subtilis* was isolated as previously described (35). Chromosomal DNA of *S. pneumoniae* was isolated by using the *B. subtilis* protocol, excepted for the lysis step, which was performed by resuspending cells in 0.1 ml of SEDS solution (NaCl at 0.15 M, EDTA at 0.15 M, deoxycholate [DOC] at 0.01%, sodium dodecyl sulfate at 0.02%) and incubating them for 5 min at 37°C. Amplification of DNA was performed by the PCR technique (38, 49) using *Pwo* polymerase (Roche) and *S. pneumoniae* R6 or R800 chromosomal DNA. Nucleotide sequences were determined by the dideoxy-chain termination method (51) using modified T7 DNA polymerase (55) (Amersham-Pharmacia).

**Plasmids and plasmid constructions.** The plasmids used in this study are listed in Table 2, and the oligonucleotides used are listed in Table 3. Plasmid pXT (10), a derivative of pDG1731 (18), was used to express genes under control of the xylose-inducible promoter *PxylA*. A *Bam*HI/*Eco*RI DNA fragment corresponding to the coding sequence of *S. pneumoniae* R6 *ctsR* was generated by PCR using oligonucleotides AC7(-25) and AC8(+469). Oligonucleotide positions are given relative to the translation initiation codon. This fragment was cloned into the respective sites of pXT to yield plasmid *pxyl-ctsR-Spn*, which allows *ctsR* expression under control of the xylose-inducible promoter, with integration as a

TABLE 2. Plasmids used in this study

Plasmid	Description	Source or reference
pDG1731	Plasmid allowing integration at the <i>thrC</i> locus	18
pXT	pDG1731 derivative allowing gene expression from the <i>P<sub>xylA</sub></i> xylose-inducible promoter	10
<i>pxyl-ctsR-Spn</i>	pXT derivative carrying the <i>ctsR</i> coding sequence of <i>S. pneumoniae</i>	This study
pDL	Plasmid allowing integration at the <i>amyE</i> locus, and transcriptional fusion with <i>bgaB</i>	61
pAC5	Plasmid allowing integration at the <i>amyE</i> locus, with the pC194 <i>cat</i> gene	30
pAC7	Plasmid allowing integration at the <i>amyE</i> locus, with the <i>E. faecalis aphA3</i> cassette	60
pDK	pAC7 derivative carrying the <i>bgaB</i> gene	This study
pDL- <i>clpC-Spn</i>	pDL derivative carrying a <i>clpC'</i> - <i>bgaB</i> fusion	This study
pDL- <i>clpP-Spn</i>	pDL derivative carrying a <i>clpP'</i> - <i>bgaB</i> fusion	This study
pDK- <i>clpE-Spn</i>	pDK derivative carrying a <i>clpE'</i> - <i>bgaB</i> fusion	This study
pDK- <i>groES-Spn</i>	pDK derivative carrying a <i>groE'</i> - <i>bgaB</i> fusion	This study
pET28a	Vector for overexpression of His-tagged proteins	Novagen
pET- <i>CtsR-Spn</i>	pET28a derivative for overproduction of <i>CtsR</i>	This study
p5.00	Plasmid carrying the <i>luc</i> reporter gene	Martin Stieger
pEVP3	Plasmid containing the Cm <sup>r</sup> -encoding gene	7
pR412	Plasmid carrying the <i>mariner</i> minitransposon	29
pR422	p5.00 derivative with the <i>luc</i> gene under control of the <i>ssbB</i> promoter	This study
pR424	pEVP3 derivative carrying the <i>ssbB'</i> - <i>luc</i> fusion from pR422, associated with the Cm <sup>r</sup> -encoding gene	This study

single copy at the *thrC* locus. This plasmid was introduced into strain QB4991 or derivatives of QB8068, in which the endogenous *ctsR* gene is deleted, to give strains QB8069, QB8133, and QB8135 (see Table 1 for details). QB8068 is a derivative of strain QB4991 in which the *Enterococcus faecalis aphA3* Km<sup>r</sup> gene (58) at the *amyE* locus was replaced with the pC194 *cat* chloramphenicol resistance gene by transformation with plasmid pAC5 (30).

Plasmid pDL (61) was used to construct transcriptional fusions between the promoter region of *clpC* (*clpC'*-*bgaB*) or *clpP* (*clpP'*-*bgaB*) and the *Bacillus stearothermophilus bgaB* gene, encoding a thermostable  $\beta$ -galactosidase (22), with subsequent integration at the *amyE* locus. Plasmid pDK is a derivative of pAC7 (60) in which the *E. coli lacZ* gene is replaced with the *B. stearothermophilus bgaB* gene from plasmid pDL. Plasmid pDK was used to construct transcriptional fusions between the promoter region of *clpE* (*clpE'*-*bgaB*) or the *groESL* operon (*groE'*-*bgaB*) and the *bgaB* gene. Transcriptional fusions in pDL or pDK were constructed by using *EcoRI/BamHI* DNA fragments generated by PCR using oligonucleotides TM291(-345) and TM292(-15), TM289(-171) and TM290(-8), AC80(-260) and AC81(-3), and AC82(-210) and AC83(-9), corresponding to the *clpC*, *clpP*, *clpE*, and *groESL* promoter regions, respectively. Positions are given relative to the translation initiation codon. These fragments were cloned into the respective sites of plasmid pDL or pDK to produce plasmids pDL-*clpC-Spn*, pDL-*clpP-Spn*, pDK-*clpE-Spn*, and pDK-*groES-Spn*, respectively. Linearization of these plasmids at the unique *PstI* site and transformation of the *B. subtilis* QB8068 or QB8069 strain with selection for chloramphenicol or Km<sup>r</sup> yielded strains QB8071 (*clpC'*-*bgaB*), QB8070 (*clpP'*-*bgaB*), QB8134 (*clpE'*-*bgaB*), and QB8132 (*groES'*-*bgaB*).

*CtsR* was overexpressed by using pET-*CtsR-Spn*, a derivative of pET28a (Novagen) in which a 478-bp *BsaI/XhoI* DNA fragment corresponding to the *ctsR* coding sequence, generated by PCR using oligonucleotides AC6 and AC9, was cloned between the *NcoI* and *XhoI* sites of plasmid pET28a. This allows the creation of a translational fusion adding six histidine residues to the carboxy terminus of the protein and placing expression of the gene under the control of a T7 promoter.

*clpC*, *clpP*, *clpE*, and *ctsR* deletion/replacement mutants were constructed by first performing a ligation between DNA fragments (~500 bp) corresponding to the chromosomal DNA regions immediately upstream and downstream from each gene with an 877-bp *EcoRI/BamHI* DNA fragment generated by PCR using oligonucleotides AC84 and AC85 that carries the *aphA3* Km<sup>r</sup> gene deprived of its transcription initiation and termination signals. Fragments corresponding to the regions upstream and downstream from *clpC*, *clpP*, *clpE*, and *ctsR* were generated by PCR using oligonucleotides AC90 and AC91 and AC92 and AC93; AC94 and AC95 and AC96 and AC97; AC98 and AC99 and AC100 and AC101; and AC86 and AC87 and AC88 and AC89, respectively. Each resulting ligation was used as a template for PCR amplification using the external oligonucleotides (e.g., AC90 and AC93 for *clpC*). Products were purified following gel electrophoresis using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Purified DNA fragments were used directly for transformation of *S. pneumoniae* with selection for Km<sup>r</sup>, and complete deletion of each gene was verified by PCR using additional oligonucleotides located further upstream and downstream from the original fragments.

Construction of an *ssbB'*-*luc* transcriptional fusion was carried out in two steps. The *luc* gene was placed under control of the *ssbB* promoter by construction of plasmid pR422 as follows. A DNA fragment overlapping the 5' end of the *ssbB* gene was amplified from *S. pneumoniae* R800 chromosomal DNA by PCR using oligonucleotides MP122 and MP158 and digested with *BamHI-HindIII* to generate a 246-bp fragment. This fragment was cloned into a 9,004-bp-long *BamHI-HindIII* fragment from plasmid p5.00, which confers erythromycin resistance and carries the *Photinus pyralis luc* gene encoding firefly luciferase (53) to generate plasmid pR422 (Table 2). The *ssbB'*-*luc* transcriptional fusion was then associated with a chloramphenicol resistance-encoding gene to generate plasmid pR424 by cloning a 1,930-bp *HindIII-SmaI* fragment from plasmid pR422 containing the *ssbB'*-*luc* transcriptional fusion into a 2,022-bp *HindIII-BsaAI* fragment from plasmid pEVP3 (Table 2). Transformation of *S. pneumoniae* cells with plasmid pR424, with selection for chloramphenicol resistance, leads to integration of the plasmid at the *ssbB* locus by a single-crossover event.

**$\beta$ -Galactosidase and luciferase assays.**  $\beta$ -Galactosidase specific activities in *S. pneumoniae* were determined as described previously for *B. subtilis* (32, 35, 36), by using a Multiskan Ascent photometric microplate reader, and expressed as nanomoles of *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside per minute per milligram of protein. Cell lysis was performed by adding 0.005% DOC-0.01% sodium dodecyl sulfate (final concentrations).

For detection of luciferase activity, strains were first grown in CAT medium to an optical density at 550 nm (OD<sub>550</sub>) of 0.4. Cells were then resuspended in fresh 15% glycerol-containing CAT medium and frozen at -80°C. For inoculation, frozen cultures were thawed and diluted 1,500-fold in CAT medium and 280  $\mu$ l was distributed among the wells of a 96-well Corning NBS plate. The cultures were incubated at 37°C in an Anthos LucyI luminometer. Approximately 3.5 h after inoculation and injection of 20  $\mu$ l of a 10 mM luciferin solution in CAT medium, relative luminescence units (RLU) and OD<sub>492</sub> were measured at 8-min intervals.

**Overexpression and purification of CtsR.** pET-*CtsR-Spn* was introduced into the BL21  $\lambda$  DE3 (plysE) strain (Novagen), in which the T7 RNA polymerase gene is under the control of the inducible *lacUV5* promoter. The resulting strain was grown in LB medium at 30°C, and expression was induced during the exponential growth phase by the addition of isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG; 0.1 mM). Purification of CtsR was performed by using immobilized metal affinity chromatography as previously described (11).

**Gel mobility shift DNA-binding assays.** *EcoRI/BamHI* DNA fragments, corresponding to the promoter regions of the *clpP* and *clpE* genes and the *clpC* and *groESL* operons, were generated by PCR with oligonucleotides TM289 and TM290, AC80 and AC81, TM291 and TM292, and AC82 and AC83, respectively. Fragments were radioactively labeled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP using the Klenow fragment of DNA polymerase I (Gibco-BRL). Radiolabeling, DNA binding, and gel electrophoresis mobility shift assays were performed as previously described (11).

**DNase I footprinting.** DNA fragments corresponding to the *clpC*, *clpP*, *clpE*, and *groE* promoter regions used for DNase I footprinting were prepared by PCR using 20 pmol of oligonucleotides AC24 and AC25, AC22 and AC23, AC112 and

TABLE 3. Oligonucleotides used in this study

Name	Sequence	Description
TM289	GAAGAATTCGAAAAAGAAGAACTGACTTGG	<i>PclpP'</i> - <i>bgaB</i> fusion
TM290	GGAGGATCCTTTTGGAGTTTAAATTTTGTGG	<i>PclpP'</i> - <i>bgaB</i> fusion
TM291	GAAGAATTCACGCTTGGTATCTTGAGATTCAC	<i>PclpC'</i> - <i>bgaB</i> fusion
TM292	GGAGGATCCTCTCTTAAACCTTGACCTTG	<i>PclpC'</i> - <i>bgaB</i> fusion
AC6	CTCCTCGAGCTTCCCTTTTCTATCTACCTC	<i>CtsR</i> overproduction
AC7	GGAGGATCCGTTTAAAGAGAGAGGTGGGTTGTG	<i>PxlA'</i> - <i>ctsR</i> fusion
AC8	GAAGAATTCATAGTTCATCTTACTTCCCT	<i>PxlA'</i> - <i>ctsR</i> fusion
AC9	GGTGGTCTCCCATGAGATTTAAAAATACATCGGATCATA	<i>CtsR</i> overproduction
AC22	TCGAAAAGAAGAATGACTTGG	<i>PclpP</i> footprint
AC23	TCCTTTTGGAGTTTAAATTTTGTGG	<i>PclpP</i> footprint
AC24	GAATTAGGCTTAGATAAGTAG	<i>PclpC</i> footprint
AC25	CCAGATTGATCTAAAATCGCC	<i>PclpC</i> footprint
AC72	CGTAAGAACGTTCTCCACGGCTTGTGG	Primer extension on <i>clpP</i>
AC80	ATTGAATTCATCGCAATGGAAATTTACGAAC	<i>PclpE'</i> - <i>bgaB</i> fusion
AC81	AAAGGATCCATCTACCTCATTCTTTCTTTAGCC	<i>PclpE'</i> - <i>bgaB</i> fusion
AC82	GTGAGAATTCTGCAGGCCAAGATTTGGCAG	<i>PgroE'</i> - <i>bgaB</i> fusion
AC83	TCTGGATCCCTCCATAATGAGATAG	<i>PgroE'</i> - <i>bgaB</i> fusion
AC84	GTTAGAATTCGCTTCTTGGGGTAT	<i>aphA3</i> cassette
AC85	TAGGGATCCAAATCTAGGTAATA	<i>aphA3</i> cassette
AC86	TCCCCATGGACTTAGCGGTGGGATG	<i>ctsR</i> deletion
AC87	ATCGAATTCCAAACCCACCTCTCTC	<i>ctsR</i> deletion
AC88	AAGGGATCCAAGATGAACTATTCAAAAGC	<i>ctsR</i> deletion
AC89	GTACCATGGCGTTGGCGTAAAGCC	<i>ctsR</i> deletion
AC90	AAACCATGGAATGAATGTATCGAAAGTGCC	<i>clpC</i> deletion
AC91	GTACGAATTCGTTGGCGTAAAGCC	<i>clpC</i> deletion
AC92	TGGGGATCCGGATATTCTGTTTACCAGG	<i>clpC</i> deletion
AC93	ATGCCATGGCAAATTTTAACTGGCCTGC	<i>clpC</i> deletion
AC94	TGACCATGGTTCCAGCTGCTAAAGTTGGC	<i>clpP</i> deletion
AC95	TTTGAATTCATTTTGTGGTCAAATG	<i>clpP</i> deletion
AC96	ACTGGATCCCGCCAGGAAACACTTG	<i>clpP</i> deletion
AC97	GCTACCATGGCAAGCGCCACAAACGATAG	<i>clpP</i> deletion
AC98	CCTCCATGGTAAAATAGTAACGATAAG	<i>clpE</i> deletion
AC99	CCTGAATTCCTTAAAGGTCAAAAATAG	<i>clpE</i> deletion
AC100	GCAAGGGATCCATTCCAGATTAATCTGCC	<i>clpE</i> deletion
AC101	ATACCATGGATAATGCAAGATTCC	<i>clpE</i> deletion
AC112	TTTTCATGTAAACAATCTCAAAGC	<i>PclpE</i> footprint
AC113	CCATTGAGATTGGTGTAAAGATG	<i>PclpE</i> footprint
AC114	GATTTGGCAGATTTGGTCTTGG	<i>PgroE</i> footprint
AC115	CGGTCCCCTAATGGTTTCAAC	<i>PgroE</i> footprint
AC124	AGCCTGCAAGGACAAAGCCTCC	Primer extension on <i>groE</i>
MP122	CGCGGATCCGGTGTAGACGTTAAACGTCC	<i>ssbB'</i> - <i>luc</i> fusion
MP158	GCCGCGAAGCTTCTCAGGATATTGCAGATAC	<i>ssbB'</i> - <i>luc</i> fusion

AC113, and AC114 and AC115, respectively. Labeling and DNase I treatment were performed as previously described (11).

**RNA extraction and primer extension.** *S. pneumoniae* strains were grown in BHI medium at 37°C without shaking until the OD<sub>600</sub> reached 0.6. Cells were pelleted and frozen immediately. Frozen cells were resuspended in 0.4 ml of water and disrupted with a FastPrep cell disintegrator (Bio 101, Inc.) for 30 s at 4°C by using 0.5 g of glass beads (106 µm; Sigma) in the presence of 0.4 ml of 4% Bentone MA (Rheox) and 0.5 ml of phenol-chloroform-isoamyl alcohol, pH 8.0 (Amresco). After centrifugation for 2 min at 20,817 × g supernatants were successively extracted with phenol-chloroform (1:1, vol/vol) and then chloroform-isoamyl alcohol (24:1, vol/vol). RNA was precipitated with isopropanol in the presence of 0.2 M NaCl and resuspended in 20 µl of water. RNA concentrations were determined by measuring the A<sub>260</sub>, and samples were stored at -20°C. Primer extensions were performed by incubating 20 µg of RNA, 1 pmol of oligonucleotide (previously labeled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP [110 TBq/mmol] using T4 polynucleotide kinase), and 25 U of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Roche). Oligonucleotides were chosen so as to hybridize approximately 30 bp downstream from the translation initiation codon (see Table 3). The corresponding DNA sequencing reactions were carried out by using the same oligonucleotides and PCR-amplified DNA fragments carrying the respective promoter regions.

**Database comparisons and sequence analysis.** Computations were performed with the Genetics Computer Group sequence analysis software package (version 10.1; Genetics Computer Group, Inc., Madison, Wis.). Sequence comparisons with the GenBank database were accomplished with the National Center for

Biotechnology Information BLAST2 (2) network service with the default parameter values provided. The complete *S. pneumoniae* type 4 genome sequence (56) was kindly made available by The Institute for Genomic Research (<http://www.tigr.org>).

## RESULTS

**Inactivation of *clpP* leads to overexpression of the *comCDE* operon in *S. pneumoniae*.** In vitro *mariner* transposon mutagenesis of *S. pneumoniae* chromosomal DNA was used to generate a library of mutants by transformation of strain R354, which carries a chromosomal *comC'*-*lacZ* transcriptional fusion (see Materials and Methods and reference 29). Mutants displaying a *comCDE*<sup>up</sup> or *cup* phenotype (29), i.e., increased  $\beta$ -galactosidase activity on 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-Gal)-T<sup>-</sup> plates (29), on which competence genes are normally not expressed, were chosen for further study. Chromosomal DNA was isolated from each mutant and used for backcross experiments by transforming the R354 parental strain with selection for spectinomycin resistance to ensure linkage of the *cup* phenotype with the transposon insertion. A

total of 42 insertions were found to be distributed into nine different location groups, two of which have been previously characterized (29). A third class was represented by a single mutant, strain R461, in which the transposon was inserted directly upstream from a previously uncharacterized gene whose product shares 55% amino acid sequence identity with ClpP of *B. subtilis*, the proteolytic subunit of the Clp ATP-dependent protease (35). This suggested that ClpP may play a role in the early steps of competence development in *S. pneumoniae*. However, it remained to be determined whether the *cup* phenotype linked to the transposon insertion was due to overexpression or loss of expression of the *clpP* gene.

The transposon insertion upstream from *clpP* (*spc93::clpP*) was introduced into the wild type *S. pneumoniae* R800 strain by transformation with chromosomal DNA from strain R461 to give strain R638. Primer extension experiments were carried out to examine *clpP* expression by using total RNA isolated from strain R638 or the original wild-type parental strain, R800. As shown in Fig. 1A, *clpP* is expressed in strain R800 during growth in BHI medium and this expression is abolished in strain R638. Analysis of the nucleotide sequence of the region preceding the transcription initiation sites revealed likely  $-10$  and  $-35$  sequences for the lower signal (TTGACC N17 TATAAT; see Fig. 7B) sharing strong similarities with the consensus sequences of promoters recognized by the vegetative form of RNA polymerase holoenzyme,  $E\sigma^A$ . The *mariner* minitransposon was inserted with the duplication of a GA dinucleotide 65 bp upstream from the *clpP* translation initiation codon, between the  $-35$  and  $-10$  sequences (see Fig. 7B), consistent with the fact that *clpP* expression is correspondingly abolished. No consensus promoter-type sequences could be identified upstream from the uppermost signal, suggesting that this signal could be due to transcription from a promoter recognized by a minor sigma factor or to processing from a larger transcript.

In order to confirm that ClpP negatively regulates *comCDE* expression in *S. pneumoniae*, a  $\Delta clpP$  mutant (SP2000) was constructed by chromosomal replacement of the entire *clpP* coding sequence with the *E. faecalis aphA3*  $Km^r$  gene through a double-crossover event. This was carried out by transforming *S. pneumoniae* strain R348, which carries a *comC'-lacZ* transcriptional fusion, with a PCR-generated DNA fragment containing the *aphA3*  $Km^r$ -encoding gene and flanked by two 500-bp segments corresponding to the chromosomal regions immediately upstream and downstream of the *clpP* gene (see Materials and Methods).

As shown in Fig. 1B, expression of *comC'-lacZ* in strain R348 is very low during growth in BHI medium (approximately  $4 \text{ nmol of ONP min}^{-1} \text{ mg of protein}^{-1}$ ) and is strongly increased (up to 24-fold) in strain SP2000 ( $\Delta clpP::aphA3$ ), confirming that ClpP negatively regulates *comCDE* expression.

**Inactivation of *clpC* or *clpE* does not affect competence development or expression of the *comCDE* and *ssbB* genes in *S. pneumoniae*.** The fact that ClpP acts to negatively regulate expression of *comCDE* suggested that one of the Clp ATPase subunits may also act as a repressor. Analysis of the complete *S. pneumoniae* type 4 genome sequence (56) indicates that there are four genes encoding Clp ATPases, which we have designated *clpC*, *clpE*, *clpL*, and *clpX*, in accordance with es-

tablished nomenclature (9, 52). ClpC, ClpE, and ClpL all belong to the Hsp100 family of Clp ATPases (9, 52).

In order to test whether the ClpC or ClpE ATPase plays a role in *comCDE* expression,  $\Delta clpC$  and  $\Delta clpE$  mutants of *S. pneumoniae* (strains SP2001 and SP2002, respectively) were constructed by transformation of strain R348 by the method described above for the  $\Delta clpP$  mutant strain. As shown in Fig. 1B, *comC'-lacZ* expression in the  $\Delta clpC$  and  $\Delta clpE$  mutants was very low during growth in BHI medium and not significantly different from that in the R348 parental strain, indicating that, in contrast to ClpP, neither ClpC nor ClpE negatively regulates *comCDE* expression.

In order to examine the effects of ClpP, ClpC, and ClpE on late competence gene expression, chromosomal DNAs from strains R461 (*spc93::clpP*), SP2001 ( $\Delta clpC::aphA3$ ), and SP2002 ( $\Delta clpE::aphA3$ ) were used to introduce the corresponding mutations into *S. pneumoniae* strain R895 by transformation. The transposon insertion upstream from *clpP*, which practically abolishes expression of the gene (Fig. 1A), was used instead of the  $\Delta clpP::aphA3$  mutation, since strain SP2000 ( $\Delta clpP::aphA3$ ) was unable to grow in C+Y competence medium, a phenotype similar to that reported for the *B. subtilis*  $\Delta clpP$  mutant (35), whereas strain R461 (*spc93::clpP*) was able to grow, albeit poorly (Fig. 2A), suggesting that residual expression of *clpP* occurred despite the transposon insertion within the promoter region.

The resulting derivatives of strain R895 carry a chromosomal transcriptional fusion between the promoter of the *ssbB* gene, encoding single-stranded DNA-binding protein and known to be specifically induced during competence development (3, 43), and the *P. pyralis luc* gene, encoding firefly luciferase. The *ssbB* gene, also known as *cilA* (3), is specifically transcribed by RNA polymerase holoenzyme containing the ComX competence-specific sigma factor (26). Expression of *ssbB'-luc* has been shown to be directly correlated with the kinetics of transformation during competence development in *S. pneumoniae* (M. Prudhomme and J. P. Claverys, unpublished results).

As shown in Fig. 2A, no significant difference in the expression of *ssbB'-luc* was observed during growth in C+Y medium between the different *clp* mutants and the otherwise isogenic R895 reference strain, indicating that ClpP, ClpC, and ClpE are not required for competence development in *S. pneumoniae* under these conditions. Indeed, transformation assays during growth in C+Y medium for the *S. pneumoniae*  $\Delta clpC::aphA3$  mutant (strain SP2001) were not significantly different from that of the R348 parental strain (data not shown).

However, when cells were grown in CAT medium, in which derivatives of the R800 laboratory strain do not develop spontaneous competence, expression of *ssbB'-luc* was increased approximately 50-fold in strain R1054 (*spc93::clpP*), confirming the negative role of ClpP on competence gene expression in *S. pneumoniae* (Fig. 2B). Furthermore, unlike otherwise isogenic parental strain R354, the *spc93* mutant (strain R461) developed spontaneous competence for transformation in CAT medium (data not shown), which is fully consistent with the isolation of the mutant on the basis of a *cup* phenotype on X-Gal-T<sup>-</sup> plates. The fact that the only transposon insertion at the *clpP* locus leading to a *cup* phenotype was found upstream from the gene and not within the coding sequence is not un-

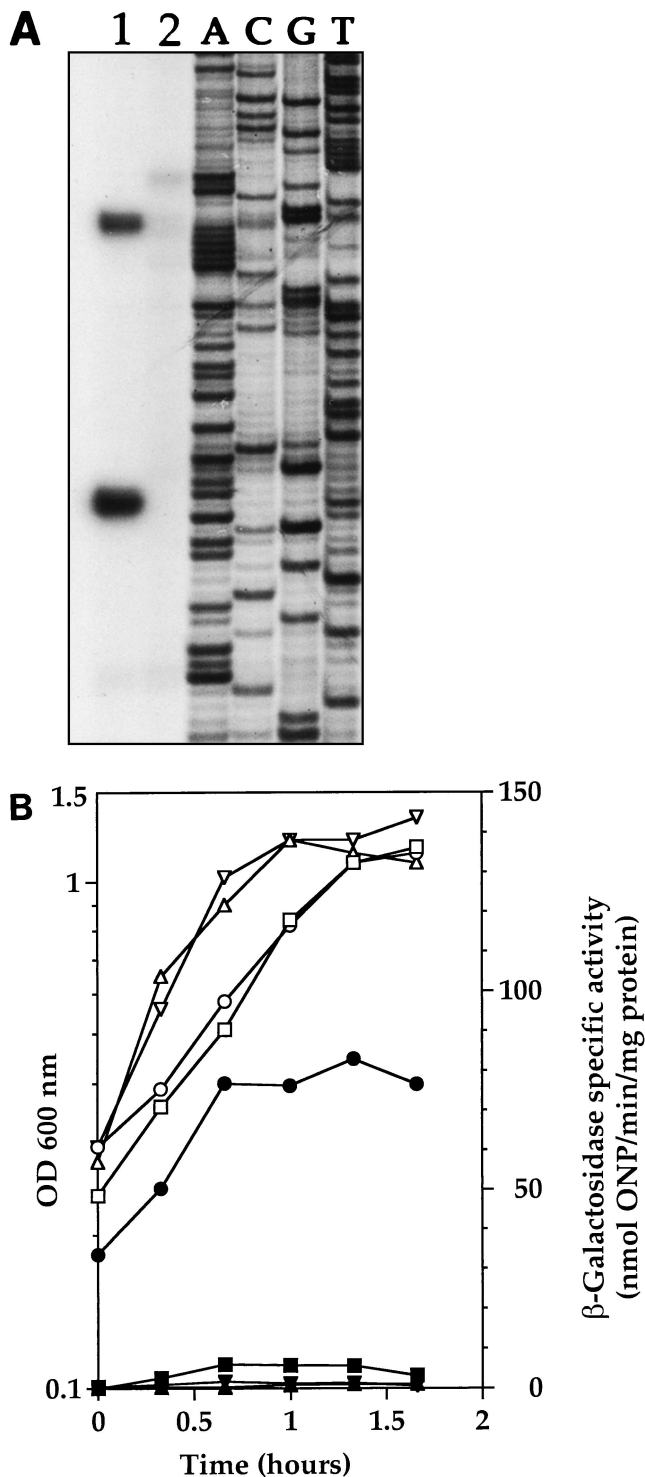


FIG. 1. (A) *clpP* expression in strain R638 is drastically reduced. Primer extension analysis of *clpP* mRNA was performed with total RNAs isolated from parental strain R800 (lane 1) and *spc93::clpP* mutant strain R638 (lane 2). The corresponding DNA sequence is shown on the right. (B) Expression of a *comC'-lacZ* fusion is strongly increased in a  $\Delta clpP$  mutant. Strains SP2000 ( $\Delta clpP::apha3$ ) (○, ●), SP2001 ( $\Delta clpC::apha3$ ) (▽, ▼), and SP2002 ( $\Delta clpE::apha3$ ) (△, ▲) and parental strain R348 (□, ■) were grown in BHI medium. Open symbols indicate the  $OD_{600}$ , and solid symbols indicate  $\beta$ -galactosidase specific activity, expressed as nanomoles of ONP per minute per milligram of protein.

expected, since insertions disrupting the gene would be associated with a growth defect on X-Gal T<sup>-</sup> plates (29), a medium comparable to CAT, in which the  $\Delta clpP::aphA3$  mutant is also unable to grow.

**CtsR of *S. pneumoniae* negatively regulates expression of *clpP*, *clpE*, and the *clpC* operon.** Analysis of the nucleotide sequence of the *S. pneumoniae clpP* promoter region revealed the existence of a likely operator site for the CtsR repressor of stress response genes, whose existence in *S. pneumoniae* was previously reported (11), suggesting that, as in *B. subtilis*, the *clpP* gene may belong to the CtsR regulon. A detailed DNA motif analysis of the complete *S. pneumoniae* type 4 genome sequence (56), carried out using the consensus CtsR heptad direct repeat operator sequence (A/GGTCAAAA NAN A/GG TCAAAA; 11), revealed only five candidate CtsR-binding sites.

These were located upstream from the *clpE*, *clpL*, and *clpP* genes, as well as the *ctsR-clpC* and *groESL* operons. In order to investigate regulation of the *S. pneumoniae clp* genes, the model gram-positive bacterium *B. subtilis* was used as a heterologous host. Regulation by CtsR of *S. pneumoniae* was studied in derivatives of *B. subtilis* strain QB4991, in which the entire *B. subtilis ctsR* gene is deleted (11).

The resulting strains contain the *S. pneumoniae ctsR* gene cloned under control of the *PxylA* xylose-inducible promoter and integrated as a single copy at the *thrC* locus, as well as transcriptional fusions between the promoter regions of the *S. pneumoniae clpC* (strain QB8071), *clpP* (strain QB8070), and *clpE* (strain QB8135) genes and the *bgaB* gene of *B. stearothermophilus*, which encodes a thermostable  $\beta$ -galactosidase, integrated as single copies at the *amyE* locus (see Materials and Methods).

Strains QB8071, QB8070, and QB8135 were grown at 37°C in LB medium in the presence or absence of xylose, and  $\beta$ -galactosidase activities were assayed (reported as nanomoles of ONP per minute per milligram of protein). As shown in Fig. 3A, *clpC'-bgaB* was weakly expressed (~20 U of enzyme activity) in the presence of xylose when CtsR was produced and its expression was increased approximately eightfold in the absence of xylose. Expression of *clpP'-bgaB* and *clpE'-bgaB* fusions followed similar patterns (Fig. 3B and C), with basal levels of 40 U for *clpP* and 80 U for *clpE* in the presence of xylose, increasing approximately eightfold in the absence of xylose when *ctsR* was not expressed. These results clearly indicate that CtsR negatively regulates the *S. pneumoniae clpC*, *clpP*, and *clpE* genes.

**CtsR binds specifically to the regions upstream from *clpP*, *clpE*, and the *clpC* operon.** An in vitro approach was used to demonstrate the direct interaction of *S. pneumoniae* CtsR with its target sites. For this purpose, the *S. pneumoniae ctsR* coding sequence was cloned into the pET28a vector, generating a carboxy-terminal translational fusion with six histidine residues. The resulting His-tagged CtsR protein (approximately 19 kDa) was then overproduced in *E. coli* and purified with an Ni-nitrilotriacetic acid agarose column (see Materials and Methods).

Purified *S. pneumoniae* CtsR was used in gel mobility shift DNA-binding assays with DNA fragments corresponding to the promoter regions of *clpC*, *clpP*, and *clpE*. Radiolabeled, PCR-generated DNA fragments corresponding to positions -139 to +65 (*clpC*), -171 to -9 (*clpP*), and -137 to +62 (*clpE*), relative to the respective translation initiation codons,

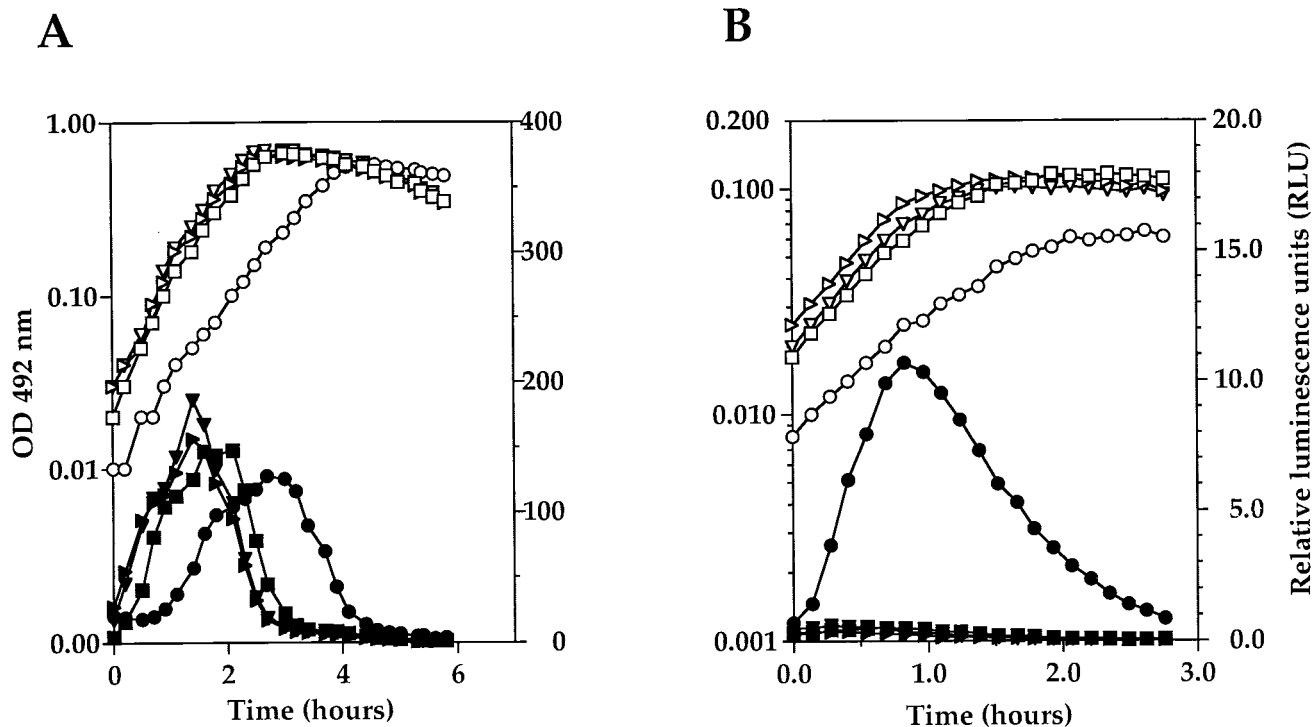


FIG. 2. Expression of *ssbB'*-*luc* in strains R1053 ( $\Delta$ *clpE*::*apha3*) ( $\triangleright$ ,  $\blacktriangleright$ ), R1054 (*clpP*::*spc93*) ( $\circ$ ,  $\bullet$ ), and R1056 ( $\Delta$ *clpC*::*apha3*) ( $\nabla$ ,  $\blacktriangledown$ ) and parental strain R895 ( $\square$ ,  $\blacksquare$ ). Strains were grown in C+Y competence-permissive medium (A) or CAT non-competence-permissive medium (B). Open symbols indicate the OD<sub>492</sub>, and solid symbols indicate RLU expressed as a function of time.

were incubated with increasing amounts of CtsR. All DNA-binding assays were performed in the presence of an excess of nonspecific competitor DNA [1  $\mu$ g of poly(dI-dC)]. As shown in Fig. 4A, CtsR bound specifically to all three radiolabeled promoter fragments, forming a single protein-DNA complex in

each case, with complete displacement of the DNA fragments at the highest CtsR concentrations. These results indicate that CtsR of *S. pneumoniae* negatively regulates the expression of the *clpC*, *clpP*, and *clpE* genes by binding directly to their promoter regions.

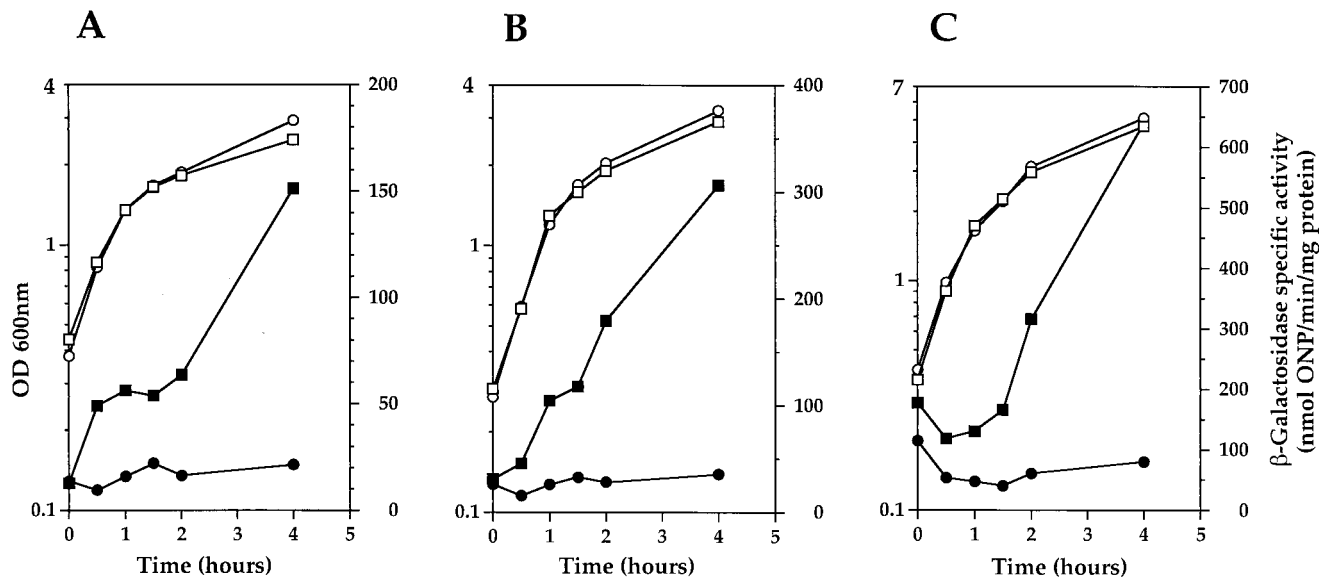


FIG. 3. Expression of *clpC*, *clpP*, and *clpE* is repressed by CtsR of *S. pneumoniae*. Expression of *clpC'*-*bgaB* (QB8071) (A), *clpP'*-*bgaB* (QB8069) (B), and *clpE'*-*bgaB* (QB8135) (C) in the presence ( $\circ$ ,  $\bullet$ ) or absence ( $\square$ ,  $\blacksquare$ ) of xylose. Cultures were grown in LB medium at 37°C to an OD<sub>600</sub> of 0.3, and xylose was added to one-half of the culture at a final concentration of 20 mM. Open symbols indicate the OD<sub>600</sub>, and solid symbols indicate  $\beta$ -galactosidase specific activity, expressed as nanomoles of ONP per minute per milligram of protein.

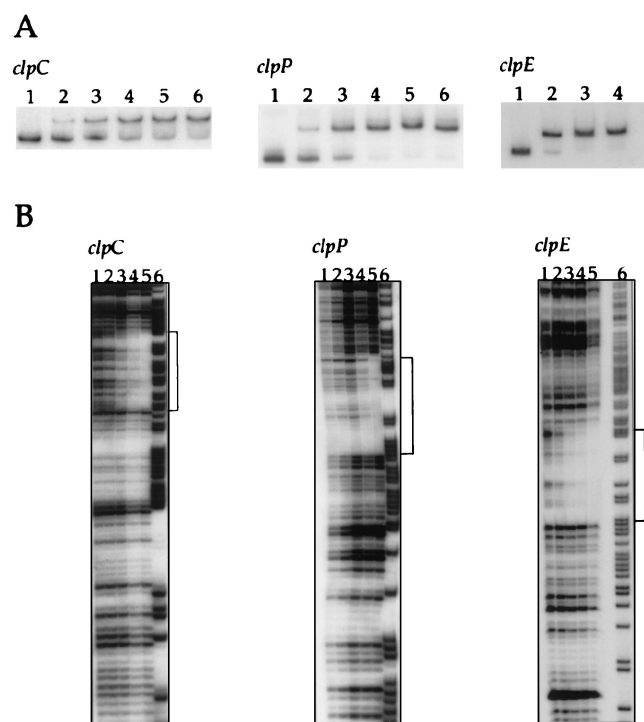


FIG. 4. CtsR binds specifically to the *clpC*, *clpP*, and *clpE* promoter regions. In gel mobility shift experiments (A), radiolabeled DNA fragments (10,000 cpm) corresponding to the *clpC*, *clpP*, and *clpE* promoter regions were incubated with increasing amounts of purified CtsR as follows: for *clpC* and *clpP*, lanes 1 to 6, 0, 10, 20, 40, 60, and 80 ng of CtsR, respectively; for *clpE*, lanes 1 to 4, 0, 20, 40, and 80 ng of CtsR, respectively. In DNase I footprinting analyses of CtsR binding (B), 50,000 cpm of each radiolabeled DNA fragment corresponding to the *clpC*, *clpP*, or *clpE* promoter region was incubated with increasing amounts of purified CtsR as follows: lanes 1 to 5, 0, 100, 200, 400, and 800 ng of CtsR, respectively; lane 6, G+A Maxam and Gilbert reaction of the corresponding DNA fragments. Regions protected by CtsR are shown by brackets.

In *B. subtilis*, CtsR binds to a highly conserved directly repeated sequence (A/GGTCAAA NAN A/GGTCAAA) that often overlaps the  $-35$  and  $-10$  sequences or the transcriptional start site of the controlled promoters (11). DNase I footprinting assays were performed on *S. pneumoniae* DNA fragments carrying the *clpC*, *clpP*, and *clpE* promoter regions to determine the extent of the protected region and the precise location of the CtsR-binding sites (Fig. 4B). When the nontemplate strand of the *clpC* DNA fragment was end labeled, CtsR protected a region extending from position  $-46$  to position  $-21$  (Fig. 4B). CtsR protected regions on the nontemplate strands extending from position  $-86$  to position  $-62$  for *clpP* and from position  $-58$  to position  $-35$  for *clpE* (Fig. 4B). All positions are given relative to the respective translational start sites.

The protected regions within the *clpC*, *clpP*, and *clpE* promoter sequences each contain the direct repeat CtsR operator site, in agreement with sequence analysis predictions (see Fig. 7B).

**The *groESL* operon of *S. pneumoniae* is a novel member of the CtsR regulon.** As mentioned above, genome sequence analysis also revealed the existence of a potential CtsR-binding

site upstream from the *groESL* operon, which encodes the classical chaperonins GroES and GroEL. This was somewhat surprising, since in *B. subtilis* and many other low-G+C gram-positive bacteria, the *groESL* operon belongs to the class I family of heat shock genes, known to be controlled by the HrcA repressor through its interaction with the highly conserved CIRCE operator sequence (TTAGCACTC-N<sub>9</sub>-GAGT GCTAA) (20). The CtsR regulons of *B. subtilis* and *L. monocytogenes* consist of genes encoding subunits of the Clp ATP-dependent protease (11, 39), and this would be the first example of a *groESL* operon regulated by CtsR. Inspection of the nucleotide sequence of the *groESL* upstream region revealed the presence of a highly conserved CIRCE operator sequence as well, located 16 bp downstream from the potential CtsR-binding site (see Fig. 7B). This tandem operator arrangement suggests that the *S. pneumoniae* *groESL* operon may be dually regulated by both HrcA and CtsR.

CtsR-dependent regulation of *groESL* expression was examined by using *B. subtilis* as a heterologous host as described above for the *clp* genes. Strain QB8133 carries a *groES'*-*bgab* transcriptional fusion integrated at the *amyE* locus and the *S. pneumoniae* *ctsR* gene cloned under control of the P<sub>xy</sub> xylose-inducible promoter at the *thrC* locus (see Materials and Methods). As shown in Fig. 5, *groES'*-*bgab* was weakly expressed ( $\sim 100$  U) in the presence of xylose when CtsR was produced and its expression was increased approximately

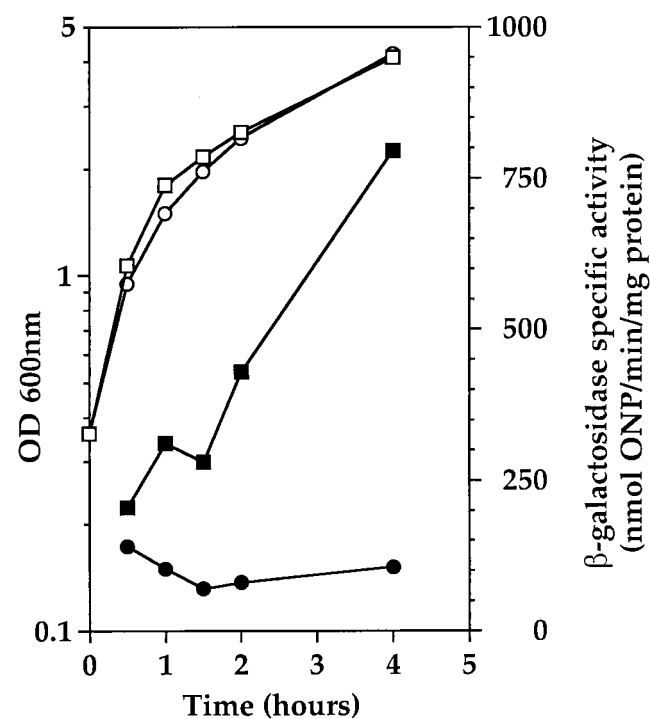


FIG. 5. *groESL* is under negative control of CtsR in vivo. Expression of *groES'*-*bgab* (QB8133) in the presence (○, ●) or absence (□, ■) of xylose. Cultures were grown in LB medium at 37°C to an OD<sub>600</sub> of 0.3 and divided in two, and xylose was added to one of the cultures at a final concentration of 20 mM. Open symbols indicate the OD<sub>600</sub>, and solid symbols indicate  $\beta$ -galactosidase specific activity, expressed as nanomoles of ONP per minute per milligram of protein.



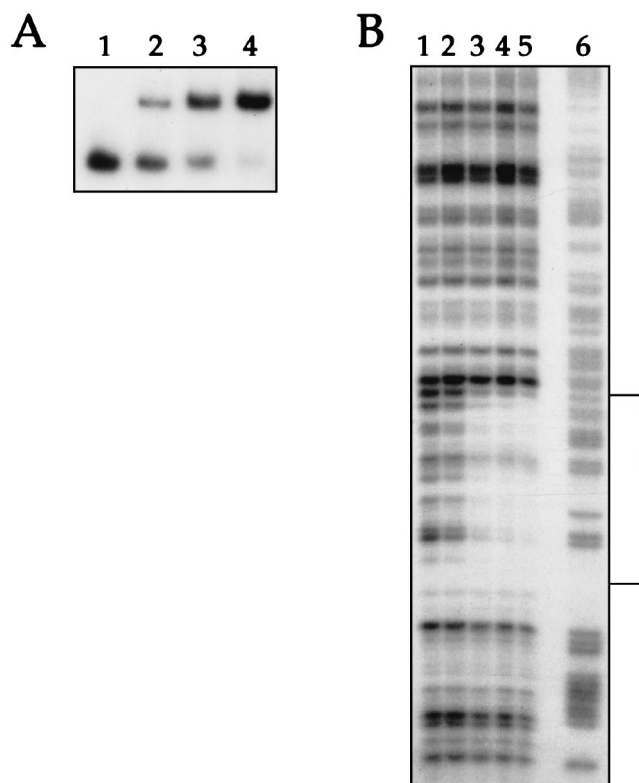


FIG. 6. CtsR binds specifically to the *groESL* promoter region. In gel mobility shift experiments (A), radiolabeled DNA fragments (10,000 cpm) were incubated with increasing amounts of purified CtsR. Lanes 1 to 4, 0, 20, 40, and 80 ng of CtsR, respectively. In DNase I footprinting experiments (B), 50,000 cpm of the radiolabeled DNA fragment corresponding to the promoter region was incubated with increasing amounts of purified CtsR. Lanes: 1 to 5, 0, 100, 200, 400, and 800 ng of CtsR, respectively; 6, G+A Maxam and Gilbert reaction of the corresponding DNA fragment. The region protected by CtsR is indicated by a bracket.

eightfold in the absence of xylose, confirming the prediction that CtsR negatively regulates *groESL* expression.

**CtsR binds specifically to the regions upstream from the *groESL* operon.** Purified CtsR was used in gel mobility shift DNA-binding assays with a radiolabeled, PCR-generated DNA fragment corresponding to the promoter region of the *groESL* operon (positions  $-20$  to  $+23$  relative to the translation initiation codon). As shown in Fig. 6A, CtsR bound specifically to the radiolabeled promoter fragment, forming a single protein-DNA complex, with complete displacement of the DNA fragment at the highest CtsR concentration. DNase I footprinting assays were performed on the same DNA fragment to determine the extent of the protected region and the precise location of the CtsR-binding sites (Fig. 6B). When the nontemplate strand of the *groESL* DNA fragment was end labeled, CtsR protected a region extending from position  $-97$  to position  $-73$ , relative to the translational start site, which contains the predicted direct repeat CtsR operator site (Fig. 6B and 7B).

**Expression of the *clpP* and *clpE* genes and the *clpC* and *groESL* operons is induced by heat shock.** Expression of CtsR-dependent genes is known to be induced under general stress conditions, including heat shock (9, 11, 23, 35, 39). In order to

test whether the repression by *S. pneumoniae* CtsR also responds to heat shock, expression of the *clpC'*-*bgaB*, *clpP'*-*bgaB*, *clpE'*-*bgaB*, and *groES'*-*bgaB* transcriptional fusions was tested by using *B. subtilis* as a heterologous host in strains QB8071, QB8070, QB8135, and QB8133 during growth in LB medium in the presence of xylose at 37 or 48°C.

As shown in Table 4, all four genes were expressed at a low level at 37°C and strongly induced, from 20- to 30-fold, after a shift to 48°C, which is consistent with a CtsR-dependent stress response. This was confirmed in *S. pneumoniae* for the *groESL* operon at the mRNA level by primer extension experiments (data not shown), in agreement with a previous report showing that synthesis of GroEL is induced in response to heat shock (6).

**Genes of the CtsR regulon are derepressed in an *S. pneumoniae*  $\Delta$ ctsR mutant.** To confirm CtsR-dependent regulation of the *clpP* and *clpE* genes and the *clpC* and *groESL* operons in *S. pneumoniae*, a  $\Delta$ ctsR mutant of *S. pneumoniae* (strain SP2003) was constructed by transformation of strain R348 by chromosomal replacement of the entire *ctsR* coding sequence with the *aphA3* Km<sup>r</sup>-encoding gene through a double-cross-over event. Primer extension experiments were performed to examine expression of CtsR-dependent genes by using total RNA isolated from  $\Delta$ ctsR::*aphA3* mutant strain SP2003 or otherwise isogenic parental strain R348. As shown in Fig. 7A, expression of the *clpP* and *clpE* genes and the *clpC* and *groESL* operons is increased in the  $\Delta$ ctsR::*aphA3* mutant during growth in BHI medium at 37°C, confirming their repression by CtsR in *S. pneumoniae*. The transcription start sites, the potential promoter sequences, the CtsR and HrcA operator sequences, and the regions protected by CtsR in DNase I footprinting experiments are indicated in Fig. 7B. The  $\Delta$ ctsR::*aphA3* mutation had no effect on *comCDE* or *ssbB* expression in *S. pneumoniae* (data not shown), suggesting that competence regulation is not strongly affected by derepression of CtsR-dependent genes.

**ClpP and ClpE are required for growth at high temperature.** Mutations inactivating *clp* genes in *B. subtilis* are known to be highly pleiotropic, affecting cell motility, growth at high temperature, competence development, and sporulation (35, 37). A phenotypic analysis of the *S. pneumoniae*  $\Delta$ ctsR,  $\Delta$ clpC,  $\Delta$ clpP, and  $\Delta$ clpE mutants and the R348 parental strain was carried out. All four mutants grew as did parental strain R348 as standard diplococcal cells in BHI medium at 37°C, with no cell filamentation or long-chain formation. No differences in penicillin- or DOC-induced autolysis were observed for the four mutants compared to the R348 parental strain, as shown in Fig. 8A for strain SP2001 ( $\Delta$ clpC::*aphA3*), suggesting that production of the major autolysin, LytA, is not affected. All four mutants presented characteristic hemolytic halos on D-horse blood agar plates, comparable to that of the parental strain, suggesting that pneumolysin production is not affected.

Growth at different temperatures was examined in BHI medium. Cultures growing exponentially at 37°C were divided and incubated at different growth temperatures. As shown in Fig. 8B, the R348 parental strain and the  $\Delta$ ctsR and  $\Delta$ clpC mutants grew normally at 37 and 40°C, poorly at 42°C, and not at all at 44°C. In contrast, the  $\Delta$ clpE and  $\Delta$ clpP mutants presented a temperature-sensitive growth phenotype at 40, 42, and 44°C, suggesting that ClpE and ClpP are essential for adaptation to high temperatures. Our results also indicate that ClpC does

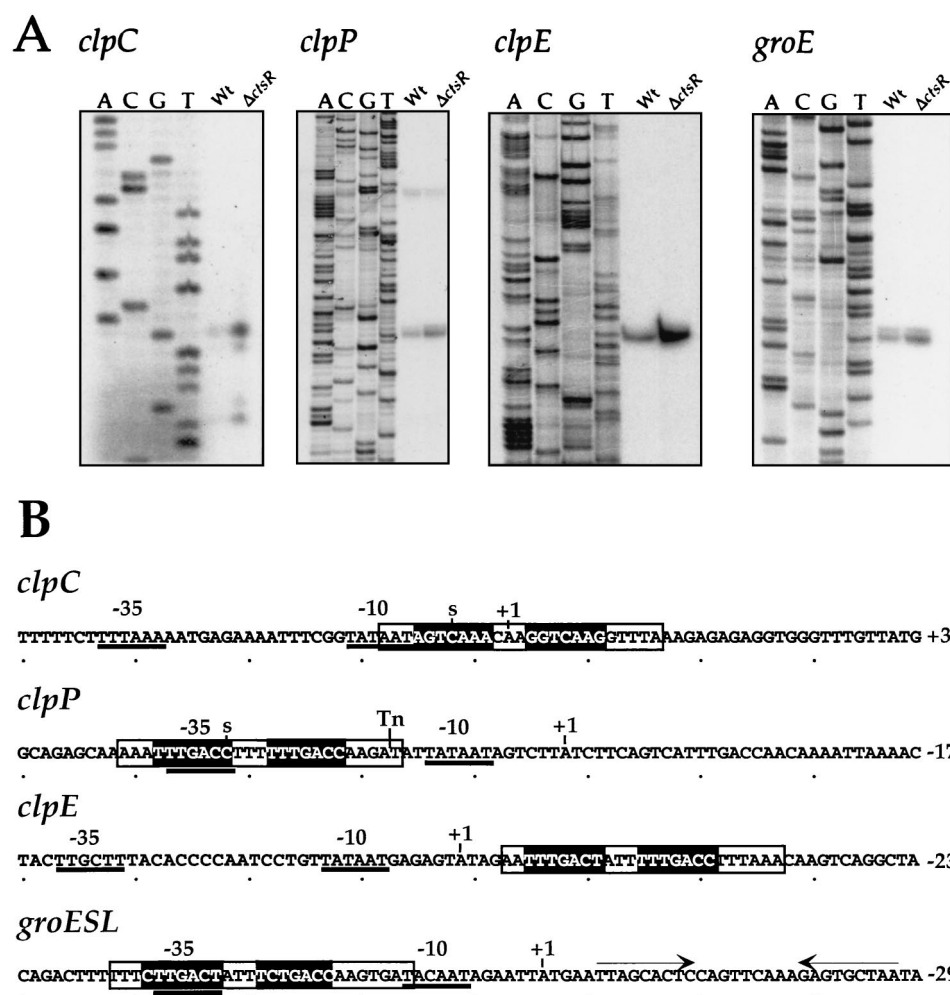


FIG. 7. (A) Primer extension analysis of *clpC*, *clpP*, *clpE*, and *groE* mRNAs in the  $\Delta$ *ctsR* mutant. Total RNA isolated from wild-type (Wt) parental strain R348 or the  $\Delta$ *ctsR* mutant (SP2003) was used as the template for reverse transcriptase. The corresponding DNA sequences are shown on the left. (B) Nucleotide sequences of the *clpC*, *clpP*, *clpE*, and *groE* promoter regions. Potential  $-35$  and  $-10$  sequences are underlined, transcriptional start points are indicated by S and +1, CtsR heptad direct repeat operator sequences are shaded, the CIRCE operator sequence is indicated by inverted arrows, and regions protected by CtsR in DNase I footprint experiments are boxed. Tn indicates the transposon insertion site upstream from *clpP* in strain R461. Positions are numbered relative to the translation initiation codon.

not affect competence development in *S. pneumoniae* and that it is not involved in autolysis, cell filamentation, pneumolysin expression, or growth at high temperature, contrary to a recent report (4).

## DISCUSSION

The Clp ATP-dependent protease plays an important role in regulation through proteolysis, in both *E. coli* (15, 17) and *B. subtilis* (34). We show here that ClpP of *S. pneumoniae* negatively regulates competence development by preventing expression of the *comCDE* operon under inappropriate conditions. Interestingly, the roles played by ClpP in competence development of *B. subtilis* and *S. pneumoniae* appear to be very different.

ClpP of *B. subtilis* provides a link between the initial quorum-sensing ComP/ComA signal transduction system and late *com* gene expression through targeted proteolysis of the ComK transcription activator (34, 59). ClpP is thus essential for com-

petence gene expression, since in its absence, ComK is sequestered in an inactive form by the Meca/ClpC complex, preventing it from activating its own synthesis, as well as transcription of late *com* genes (34, 35, 59). In *S. pneumoniae*, however, the situation is quite different, since, as shown here, ClpP is not required for expression of late competence genes or competence development but, instead, acts negatively at the earliest

TABLE 4. Induction of *clp'-bgaB* and *groES'-bgaB* expression by heat shock

Strain	Promoter	$\beta$ -Galactosidase sp act (nmol of ONP/min/mg of protein)		Ratio
		37°C	48°C	
QB8070	<i>PclpP</i>	35	1,200	34
QB8071	<i>PclpC</i>	20	520	26
QB8135	<i>PclpE</i>	80	1,600	20
QB8133	<i>PgroES</i>	110	3,500	32

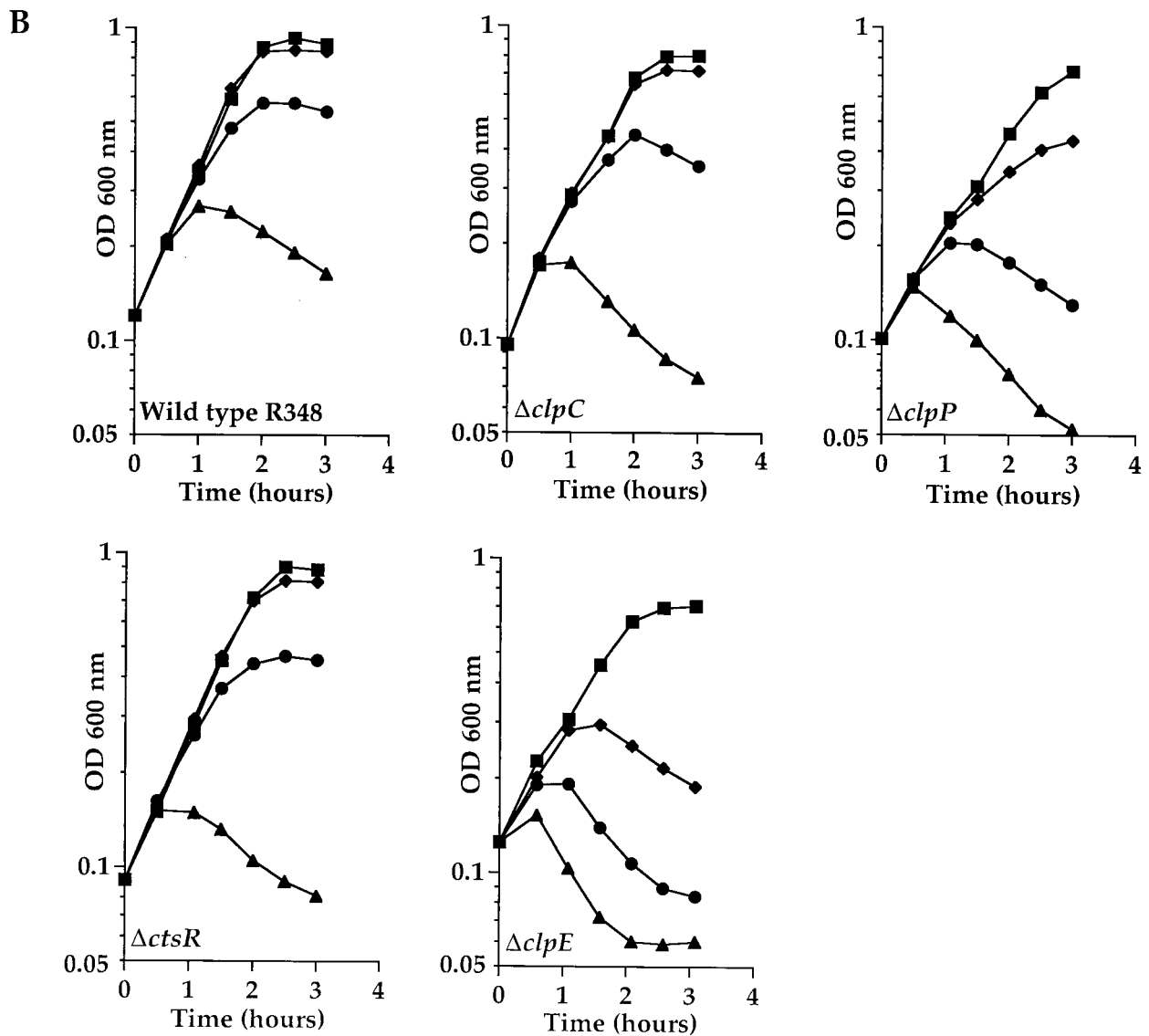
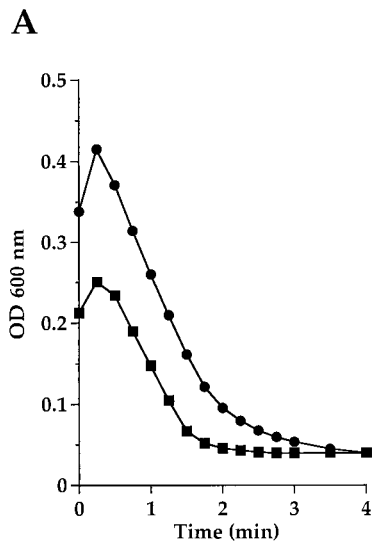


FIG. 8. (A) DOC-triggered autolysis is not affected in the  $\Delta clpC$  mutant. Strain SP2001 ( $\Delta clpC::aphA3$ ) (●) and parental strain R348 (■) were grown in BHI medium until mid-exponential phase before induction of autolysis by addition of DOC (0.05% final concentration). (B) Growth of the *S. pneumoniae* R348 wild-type strain and  $\Delta clpC$  (SP2001),  $\Delta clpP$  (SP2000),  $\Delta ctsR$  (SP2003), and  $\Delta clpE$  (SP2002) mutant strains at 37°C (■), 40°C (◆), 42°C (●), and 44°C (▲).

stages of the competence regulatory pathway to prevent inappropriate expression of the genes encoding the peptide quorum-sensing system. This is consistent with the idea that competence in *S. pneumoniae* is induced in response to changes in environmental conditions (8).

Many of the Clp proteins (ClpA, ClpX, and ClpC) act as ATPase subunits of the ATP-dependent Clp protease by associating with the ClpP proteolytic subunit, on which they confer substrate specificity (16, 17, 59). As shown in this report, neither ClpC nor ClpE plays a role in controlling competence gene expression, suggesting that one of the remaining Clp ATPases present in *S. pneumoniae*, ClpX or ClpL, may associate with ClpP instead.

Apart from *L. monocytogenes*, little is known about *clp* gene regulation in pathogenic bacteria, despite the fact that many of these genes play important roles in virulence (39). A detailed analysis of the complete *S. pneumoniae* type 4 genome sequence (56; <http://www.tigr.org>) indicates that only three of the four different types of heat shock response regulatory mechanisms originally defined in *B. subtilis* (11, 20) coexist in *S. pneumoniae*. Among them are the class I heat shock genes, defined as the HrcA regulon (the *dnaK* and *groESL* operons). There are no class II heat shock genes, since the  $\sigma^B$  stress sigma factor is not present in *S. pneumoniae*. We previously identified the *ctsR* gene of *S. pneumoniae* and several potential target genes from the genome sequence (11) and show here that class III regulation is present. Finally, class IV genes in *B. subtilis* are those whose induction by heat shock is not dependent on HrcA,  $\sigma^B$ , or CtsR. Many of these genes are present in *S. pneumoniae*, such as *clpX* and *ftsH*, and one can speculate that they will also prove to be heat shock genes.

We have shown that expression of the *S. pneumoniae clpP* and *clpE* genes and *clpC* and *groESL* operons is heat inducible and controlled directly by the CtsR repressor. Although ClpP acts negatively on competence gene expression, this role appears to be restricted to growth conditions under which competence genes are not expressed. Indeed, in a  $\Delta$ *ctsR* mutant in which *clpP* expression is derepressed, competence gene expression is unaffected during growth in C+Y competence medium, suggesting that negative regulation by ClpP can no longer take place. Among the members of the CtsR regulon, the *groESL* operon of *S. pneumoniae* belongs to a new class of heat shock genes under dual regulation by both CtsR and HrcA and is preceded by operator sequences for both repressors. Accordingly, in a  $\Delta$ *ctsR* mutant, expression of *groESL* is not strongly increased, consistent with repression by HrcA.

Phenotypic analyses also indicate that, unlike in *B. subtilis* and contrary to a previous report (4), ClpC is not involved in controlling competence development, nor does it play a role in autolysis, pneumolysin production, or growth at high temperature of *S. pneumoniae*.

ClpP and ClpE of *S. pneumoniae*, on the other hand, have both been shown to be required for growth at high temperature, suggesting they may interact to form a Clp ATP-dependent protease. This is in contrast to *B. subtilis*, in which ClpC is required for growth at high temperature but ClpE is not (9, 37). As in *L. monocytogenes*, the ClpE and ClpC ATPases both appear to play a role in the virulence of *S. pneumoniae*. Indeed, the *clpE* gene encoding an Hsp100-type Clp ATPase was isolated during a large-scale identification of virulence genes us-

ing the signature-tagged transposon mutagenesis technique (44). An insertion inactivating the *S. pneumoniae ctsR* gene was isolated by using a similar approach (24), and the corresponding mutant was found to be highly attenuated in a murine respiratory tract infection model, which the authors attributed to a polar effect of the transposon insertion on the expression of the *clpC* gene that lies directly downstream. The precise role of the *S. pneumoniae* Clp proteins in competence development and virulence, however, remains to be determined and will be the subject of further investigation.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Isabelle Derré and Bernard Martin for many helpful discussions and Georges Rapoport, in whose laboratory part of this work was carried out. We thank the Institute for Genomic Research for generously providing access to the complete *S. pneumoniae* type 4 genome sequence prior to publication and Martin Stieger for the kind gift of plasmid p5.00.

This work was supported by research funds from the European Commission (grants QLRK-2000-00543 to J.-P. Claverys and QLRT-1999-01455 to T. Msadek); the Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur, Université Paris 7; the Ministère de la Défense (Direction Générale de l'Armement); and the Programme de Recherche Fondamentale en Microbiologie, Maladies Infectieuses et Parasitaires of the Ministère de la Recherche. Arnaud Chastanet was the recipient of a Ph.D. thesis fellowship from the Ministère de la Recherche.

#### REFERENCES

- Alloing, G., C. Granadel, D. A. Morrison, and J. P. Claverys. 1996. Competence pheromone, oligopeptide permease, and induction of competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **21**:471–478.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389–3402.
- Campbell, E. A., S. Y. Choi, and H. R. Masure. 1998. A competence regulon in *Streptococcus pneumoniae* revealed by genomic analysis. *Mol. Microbiol.* **27**:929–939.
- Charpentier, E., R. Novak, and E. Tuomanen. 2000. Regulation of growth inhibition at high temperature, autolysis, transformation and adherence in *Streptococcus pneumoniae* by *clpC*. *Mol. Microbiol.* **37**:717–726.
- Cheng, Q., E. A. Campbell, A. M. Naughton, S. Johnson, and H. R. Masure. 1997. The *com* locus controls genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **23**:683–692.
- Choi, I. H., J. H. Shim, S. W. Kim, S. N. Kim, S. N. Pyo, and D. K. Rhee. 1999. Limited stress response in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiol. Immunol.* **43**:807–812.
- Claverys, J. P., A. Dintilhac, E. V. Pestova, B. Martin, and D. A. Morrison. 1995. Construction and evaluation of new drug-resistance cassettes for gene disruption mutagenesis in *Streptococcus pneumoniae*, using an *ami* test platform. *Gene* **164**:123–128.
- Claverys, J. P., M. Prudhomme, I. Mortier-Barrière, and B. Martin. 2000. Adaptation to the environment: *Streptococcus pneumoniae*, a paradigm for recombination-mediated genetic plasticity? *Mol. Microbiol.* **35**:251–259.
- Derré, I., G. Rapoport, K. Devine, M. Rose, and T. Msadek. 1999. ClpE, a novel type of HSP100 ATPase, is part of the CtsR heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **32**:581–593.
- Derré, I., G. Rapoport, and T. Msadek. 2000. The CtsR regulator of stress response is active as a dimer and specifically degraded *in vivo* at 37°C. *Mol. Microbiol.* **38**:335–347.
- Derré, I., G. Rapoport, and T. Msadek. 1999. CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **31**:117–132.
- Dubnau, D. 1999. DNA uptake in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**:217–244.
- Gaillot, O., E. Pellegrini, S. Bregenholt, S. Nair, and P. Berche. 2000. The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **35**:1286–1294.
- Gibson, T. J. 1984. Ph.D. thesis. University of Cambridge, Cambridge, England.
- Gottesman, S. 1996. Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **30**:465–506.
- Gottesman, S., M. R. Maurizi, and S. Wickner. 1997. Regulatory subunits of energy-dependent proteases. *Cell* **91**:435–438.
- Gottesman, S., S. Wickner, and M. R. Maurizi. 1997. Protein quality control:

- trriage by chaperones and proteases. *Genes Dev.* **11**:815–823.
18. Guéroul-Fleury, A. M., N. Frandsen, and P. Stragier. 1996. Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* **180**:57–61.
  19. Havarstein, L. S., G. Coomaraswamy, and D. A. Morrison. 1995. An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:11140–11144.
  20. Hecker, M., W. Schumann, and U. Völker. 1996. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **19**:417–428.
  21. Hensel, M., J. E. Shea, C. Gleeson, M. D. Jones, E. Dalton, and D. W. Holden. 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* **269**:400–403.
  22. Hirata, H., T. Fukazawa, S. Negoro, and H. Okada. 1986. Structure of a  $\beta$ -galactosidase gene of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* **166**:722–727.
  23. Krüger, E., U. Völker, and M. Hecker. 1994. Stress induction of *clpC* in *Bacillus subtilis* and its involvement in stress tolerance. *J. Bacteriol.* **176**:3360–3367.
  24. Lau, G. W., S. Haataja, M. Lonetto, S. E. Kensit, A. Marra, A. P. Bryant, D. McDevitt, D. A. Morrison, and D. W. Holden. 2001. A functional genomic analysis of type 3 *Streptococcus pneumoniae* virulence. *Mol. Microbiol.* **40**:555–571.
  25. Lazazzera, B. A., and A. D. Grossman. 1998. The ins and outs of peptide signaling. *Trends Microbiol.* **6**:288–294.
  26. Lee, M. S., and D. A. Morrison. 1999. Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation. *J. Bacteriol.* **181**:5004–5016.
  27. Lefèvre, J. C., J. P. Claverys, and A. M. Sicard. 1979. Donor deoxyribonucleic acid length and marker effect in pneumococcal transformation. *J. Bacteriol.* **138**:80–86.
  28. Martin, B., P. García, M. P. Castanié, and J. P. Claverys. 1995. The *recA* gene of *Streptococcus pneumoniae* is part of a competence-induced operon and controls lysogenic induction. *Mol. Microbiol.* **15**:367–379.
  29. Martin, B., M. Prudhomme, G. Alloing, C. Granadel, and J. P. Claverys. 2000. Cross-regulation of competence pheromone production and export in the early control of transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **38**:867–878.
  30. Martin-Verstraete, I., M. Débarbouillé, A. Klier, and G. Rapoport. 1992. Mutagenesis of the *Bacillus subtilis* “–12, –24” promoter of the levanase operon and evidence for the existence of an upstream activating sequence. *J. Mol. Biol.* **226**:85–99.
  31. Mei, J. M., F. Nourbakhsh, C. W. Ford, and D. W. Holden. 1997. Identification of *Staphylococcus aureus* virulence genes in a murine model of bacteraemia using signature-tagged mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **26**:399–407.
  32. Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
  33. Misra, N., S. Habib, A. Ranjan, S. E. Hasnain, and I. Nath. 1996. Expression and functional characterisation of the *clpC* gene of *Mycobacterium leprae*: ClpC protein elicits human antibody response. *Gene* **172**:99–104.
  34. Msadek, T. 1999. When the going gets tough: survival strategies and environmental signaling networks in *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol.* **7**:201–207.
  35. Msadek, T., V. Dartois, F. Kunst, M.-L. Herbaud, F. Denizot, and G. Rapoport. 1998. ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol. Microbiol.* **27**:899–914.
  36. Msadek, T., F. Kunst, D. Henner, A. Klier, G. Rapoport, and R. Dedonder. 1990. Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in *Bacillus subtilis*: expression of the regulatory genes and analysis of mutations in *degS* and *degU*. *J. Bacteriol.* **172**:824–834.
  37. Msadek, T., F. Kunst, and G. Rapoport. 1994. MecB of *Bacillus subtilis*, a member of the ClpC ATPase family, is a pleiotropic regulator controlling competence gene expression and growth at high temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:5788–5792.
  38. Mullis, K. B., and F. A. Faloon. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**:335–350.
  39. Nair, S., I. Derré, T. Msadek, O. Gaillot, and P. Berche. 2000. CtsR controls class III heat shock gene expression in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **35**:800–811.
  40. Nair, S., C. Fréhel, L. Nguyen, V. Escuyer, and P. Berche. 1999. ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **31**:185–196.
  41. Pederson, K. J., S. Carlson, and D. E. Pierson. 1997. The ClpP protein, a subunit of the Clp protease, modulates *ail* gene expression in *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* **26**:99–107.
  42. Pestova, E. V., L. S. Havarstein, and D. A. Morrison. 1996. Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol. Microbiol.* **21**:853–862.
  43. Peterson, S., R. T. Cline, H. Tettelin, V. Sharov, and D. A. Morrison. 2000. Gene expression analysis of the *Streptococcus pneumoniae* competence regulons by use of DNA microarrays. *J. Bacteriol.* **182**:6192–6202.
  44. Polissi, A., A. Pontiggia, G. Feger, M. Altieri, H. Mottl, L. Ferrari, and D. Simon. 1998. Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **66**:5620–5629.
  45. Porankiewicz, J., J. Wang, and A. K. Clarke. 1999. New insights into the ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond. *Mol. Microbiol.* **32**:449–458.
  46. Porter, R. D., and W. R. Guild. 1976. Characterization of some pneumococcal bacteriophages. *J. Virol.* **19**:659–667.
  47. Rouquette, C., C. de Chastellier, S. Nair, and P. Berche. 1998. The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages. *Mol. Microbiol.* **27**:1235–1246.
  48. Rouquette, C., M.-T. Ripio, E. Pellegrini, J.-M. Bolla, R. I. Tascon, J.-A. Vázquez-Boland, and P. Berche. 1996. Identification of a ClpC ATPase required for stress tolerance and *in vivo* survival of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **21**:977–987.
  49. Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487–491.
  50. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
  51. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463–5467.
  52. Schirmer, E. C., J. R. Glover, M. A. Singer, and S. Lindquist. 1996. HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* **21**:289–296.
  53. Stieger, M., B. Wohlgensinger, M. Kamber, L. Rolf, and W. Keck. 1999. Integrational plasmids for the tetracycline-regulated expression of genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* **226**:243–251.
  54. Studier, F. W., and B. A. Moffatt. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**:113–130.
  55. Tabor, S., and C. C. Richardson. 1987. DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:4767–4771.
  56. Tettelin, H., K. E. Nelson, I. T. Paulsen, J. A. Eisen, T. D. Read, S. Peterson, J. Heidelberg, R. T. DeBoy, D. H. Haft, R. J. Dodson, A. S. Durkin, M. Gwinn, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, J. D. Peterson, L. A. Umayam, O. White, S. L. Salzberg, M. R. Lewis, D. Radune, E. Holtzapple, H. Khouri, A. M. Wolf, T. R. Utterback, C. L. Hansen, L. A. McDonald, T. V. Feldblyum, S. Angiuoli, T. Dickinson, E. K. Hickey, I. E. Holt, B. J. Loftus, F. Yang, H. O. Smith, J. C. Venter, B. A. Dougherty, D. A. Morrison, S. K. Hollingshead, and C. M. Fraser. 2001. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **293**:498–506.
  57. Tortosa, P., and D. Dubnau. 1999. Competence for transformation: a matter of taste. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:588–592.
  58. Trieu-Cuot, P., and P. Courvalin. 1983. Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3′5′-aminoglycoside phosphotransferase type III. *Gene* **23**:331–341.
  59. Turgay, K., J. Hahn, J. Burghoorn, and D. Dubnau. 1998. Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *EMBO J.* **17**:6730–6738.
  60. Weinrauch, Y., T. Msadek, F. Kunst, and D. Dubnau. 1991. Sequence and properties of *comQ*, a new competence regulatory gene of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **173**:5685–5693.
  61. Yuan, G., and S. L. Wong. 1995. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* *groE* regulatory mutants: evidence for *orf39* in the *dnaK* operon as a repressor gene in regulating the expression of both *groE* and *dnaK*. *J. Bacteriol.* **177**:6462–6468.

### **Annexe 3**

***clpP* of *Streptococcus salivarius* is a novel member of the dually regulated class of stress response genes in Gram-positive bacteria.**

J. Bacteriol., (2003) 185(2), 683-687.

## *clpP* of *Streptococcus salivarius* Is a Novel Member of the Dually Regulated Class of Stress Response Genes in Gram-Positive Bacteria

Arnaud Chastanet and Tarek Msadek\*

Unité de Biochimie Microbienne, Institut Pasteur, URA 2172 du Centre National de la Recherche Scientifique, 75724 Paris Cedex 15, France

Received 18 July 2002/Accepted 18 October 2002

**Nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus salivarius clpP* locus revealed potential binding sites for both the CtsR and HrcA repressors. Dual regulation by HrcA and CtsR was demonstrated by using *Bacillus subtilis* as a heterologous host, and CtsR was shown to bind directly to the *clpP* promoter sequence. This is the first example of a *clpP* gene under the control of HrcA.**

*Streptococcus salivarius* is a widespread human commensal colonizing the oral cavity and upper respiratory tract. A member of the *Streptococcus viridans* group, this gram-positive bacterium is also an opportunistic pathogen responsible for endocarditis and was recently diagnosed as the pathogen in several cases of meningitis (12, 29).

Stress resistance genes play an important role in the virulence of several pathogens. *clpP*, *clpC*, and *clpE* of *Listeria monocytogenes* were shown to participate in intracellular parasitism (6), cell adhesion (20), and virulence (19); *clpX* of *Staphylococcus aureus* (16) and *clpE* of *Streptococcus pneumoniae* (24) were identified by signature-tagged mutagenesis; and the synthesis of DnaK and GroESL in *S. aureus* was shown to be induced during infection of human epithelial cells (25).

Stress-induced proteins are mainly molecular chaperones or proteases acting to refold or degrade misfolded or denatured proteins (9). Among these, the Clp ATP-dependent protease is composed of Clp ATPase subunits, which confer substrate specificity to the proteolytic subunit ClpP. ClpP has been shown to play a central role in stationary-phase adaptive responses of *Bacillus subtilis* (18), in the degradation of SsrA-tagged proteins in *Escherichia coli* (8) and *B. subtilis* (28), in the modulation of virulence gene expression in *Yersinia enterocolitica* (23), and in the biofilm formation of *Pseudomonas fluorescens* (22).

In gram-positive bacteria, stress genes have been grouped into four regulatory classes (4, 26). Class I genes, encoding classical chaperones (DnaK, GroES, and GroEL), are controlled by the HrcA repressor, which recognizes the controlling inverted-repeat chaperone expression (CIRCE) operator sequence. This highly conserved element is composed of a well-conserved 9-bp inverted repeat sequence separated by 9 bp (TTAGCACTCX<sub>9</sub>GAGTGCTAA) and is always found in association with *dnaK* or *groEL* genes (21). Class II genes encode general stress proteins, and their expression requires the  $\sigma^B$  stress sigma factor. Class III heat shock genes are controlled by

the CtsR repressor, a DNA-binding protein which recognizes a tandemly repeated heptad operator sequence (GGTCAAAXA XGGTCAA) (4). Class IV genes are defined as those devoid of the CIRCE or CtsR operator sequences and whose induction by heat shock or general stress conditions is  $\sigma^B$  independent.

Sequencing of the upstream and downstream regions of the *fff* gene of *S. salivarius* ATCC 25975 (GenBank accession number LO7793) revealed a gene whose product is highly similar to ClpP of *E. coli* (7). In this work, we report an analysis of the *clpP* promoter of *S. salivarius*, showing evidence for a direct control at the transcriptional level of this gene by a putative ortholog of CtsR. We also demonstrate that HrcA negatively controls *clpP* expression as well, which is the first example of a *clp* gene under dual heat shock repression.

**Expression of the *S. salivarius clpP* gene is controlled by CtsR.** Analysis of the *S. salivarius clpP* promoter region revealed a potential CtsR binding site (4). In order to demonstrate regulation by CtsR, we used *B. subtilis* as a heterologous host, since the *S. salivarius* genome sequence is not available. A transcriptional fusion between the *S. salivarius* ATCC 9758 *clpP* promoter region and the *Bacillus stearothermophilus bgaB* gene, which encodes a thermostable  $\beta$ -galactosidase (11), was first constructed by cloning a PCR-generated fragment (positions –295 to –12 with respect to the position of the translation initiation codon) into plasmid pDK (2) and then introduced into *B. subtilis*.

Derivatives of strain QB8068, in which the endogenous *ctsR* gene was deleted (2), were then constructed in several steps. The final strain, QB8081 [*trpC2*  $\Delta$ *ctsR* *amyE*::(*clpP'*-*bgaB* *aphA3*)  $\Delta$ *hrcA*::*cat* *thrC*::(*P*<sub>*xy*</sub>*LA*-*B. subtilis* *ctsR* *spec*)], carries the *S. salivarius clpP'*-*bgaB* transcriptional fusion integrated as a single copy at the *amyE* locus, a deletion-replacement of the endogenous *hrcA* gene (17), and a copy of the *B. subtilis* *ctsR* gene integrated at the *thrC* locus under the control of the *P*<sub>*xy*</sub>*LA* xylose-inducible promoter.

Strain QB8081 was grown in Luria-Bertani medium until an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.3 was achieved, and  $\beta$ -galactosidase activities were assayed during growth at 37°C in the presence or absence of 20 mM xylose and expressed as

\* Corresponding author. Mailing address: Unité de Biochimie Microbienne, Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. Phone: (33) 1 45 68 88 09. Fax: (33) 1 45 68 89 38. E-mail: tmsadek@pasteur.fr.

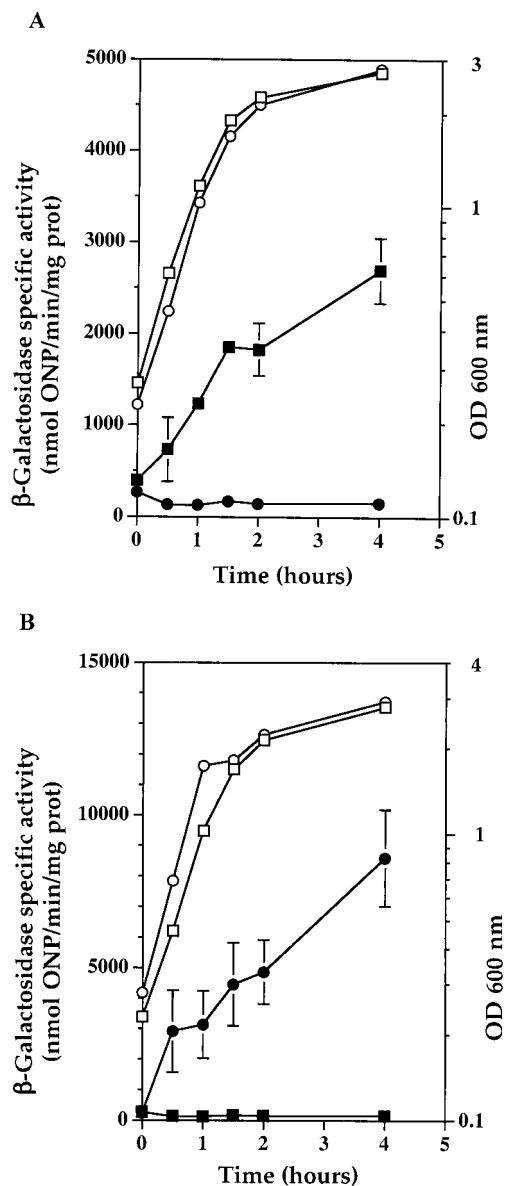


FIG. 1. (A) Expression of *S. salivarius clpP* is repressed by CtsR. Levels of expression of *clpP'*-*bgaB* (strain QB8081) in the presence (○, ●) or absence (□, ■) of xylose are shown. Cultures were grown in Luria-Bertani medium at 37°C until the OD<sub>600</sub> was 0.3, and xylose was added to one-half of the culture at a final concentration of 20 mM. (B) Repression of *S. salivarius clpP* expression by CtsR is abolished by heat shock. The expression of *clpP'*-*bgaB* (QB8081) was measured in cells expressing *ctsR* during growth at 37°C (□, ■) or 48°C (○, ●). Cells were grown in Luria-Bertani medium at 37°C until the OD<sub>600</sub> was 0.3, 20 mM xylose was added, and one-half of the culture was shifted to 48°C. Open symbols indicate OD<sub>600</sub>s. Solid symbols indicate β-galactosidase specific activities expressed as nanomoles of *o*-nitrophenyl per minute per milligram of protein, and values are the means ± standard deviations of results from two independent assays. ONP, *o*-nitrophenyl.

nanomoles of *o*-nitrophenyl per minute per milligram of protein.

As shown in Fig. 1A, induction by xylose of the *B. subtilis ctsR* gene led to an up to 16-fold repression of *clpP'*-*bgaB*

expression. In order to test whether repression by CtsR was relieved during heat shock, strains were grown at 48°C in the presence of xylose. Expression levels of *clpP'*-*bgaB* were found to be fully derepressed in the presence of CtsR during growth at 48°C (Fig. 1B). These results strongly suggest that the *S. salivarius clpP* gene is subjected to negative regulation by an ortholog of CtsR and that this repression no longer occurs during growth at high temperature, leading to heat shock induction of *clpP*.

**Purified CtsR of *B. subtilis* binds specifically to the heptad direct repeat.** An in vitro approach was used to confirm the direct interaction of CtsR with the target site of *S. salivarius*. For this purpose, the CtsR protein of *B. subtilis* was overproduced in *E. coli* with a carboxy-terminal histidine tag and purified on a Ni-nitrilotriacetic acid agarose (Qiagen) column as previously described (4). The purified protein was then used in gel mobility shift DNA-binding assays. A radiolabeled DNA fragment, corresponding to the *S. salivarius clpP* promoter region (positions -142 to +44 with respect to the position of the translation initiation codon), was incubated with increasing amounts of CtsR of *B. subtilis* in the presence of an excess of nonspecific competitor DNA [1 μg of poly(dI-dC)]. Radiolabeling, DNA binding, and gel electrophoresis mobility shift assays were performed as previously described (4). As shown in Fig. 2A, CtsR bound specifically, forming a single protein-DNA complex, with a complete displacement of the DNA fragment occurring at the highest CtsR concentration.

A DNase I footprinting assay was performed on the *S. salivarius* DNA fragment carrying the *clpP* promoter region to determine the extent of the protected region and the precise location of the potential CtsR binding site (Fig. 2B). Labeling and DNase I treatment were performed as previously described (4). When the nontemplate strand of the *clpP* DNA fragment was end labeled, CtsR protected a region extending from positions -63 to -39 relative to the translational start site (Fig. 2B and C). The region protected by CtsR contains the tandem heptanucleotide repeat recognition sequence and the -35 sequence of the promoter in agreement with sequence analysis predictions (Fig. 2C). These results indicate that *clpP* of *S. salivarius* is controlled directly by CtsR.

**Analysis of the *S. salivarius clpP* promoter region reveals a potential CIRCE sequence.** During the analysis of the published *S. salivarius clpP* nucleotide sequence (7), we noted the existence of a 9-bp palindromic sequence upstream from the CtsR binding site, sharing 100% identity with the CIRCE consensus sequence. Surprisingly, the two repeats were separated by 8 bp, whereas in a compilation of 70 CIRCE sequences, the spacer region was invariably 9 nucleotides (10). Since all CIRCE sequences described to date are exclusively associated with the *dnaK* or *groEL* operon, it was therefore tempting to consider this noncanonical CIRCE sequence as a cryptic sequence.

In order to test whether HrcA does indeed play a role in controlling expression of the *clpP* gene, we first sequenced the *clpP* promoter region of *S. salivarius* ATCC 9758. As described above, a DNA fragment generated by PCR with chromosomal DNA from the reference strain of *S. salivarius* ATCC 9758 was cloned into plasmid pDK. The nucleotide sequence of two DNA fragments resulting from independent PCRs was determined (GenBank accession number AY137346), revealing nu-



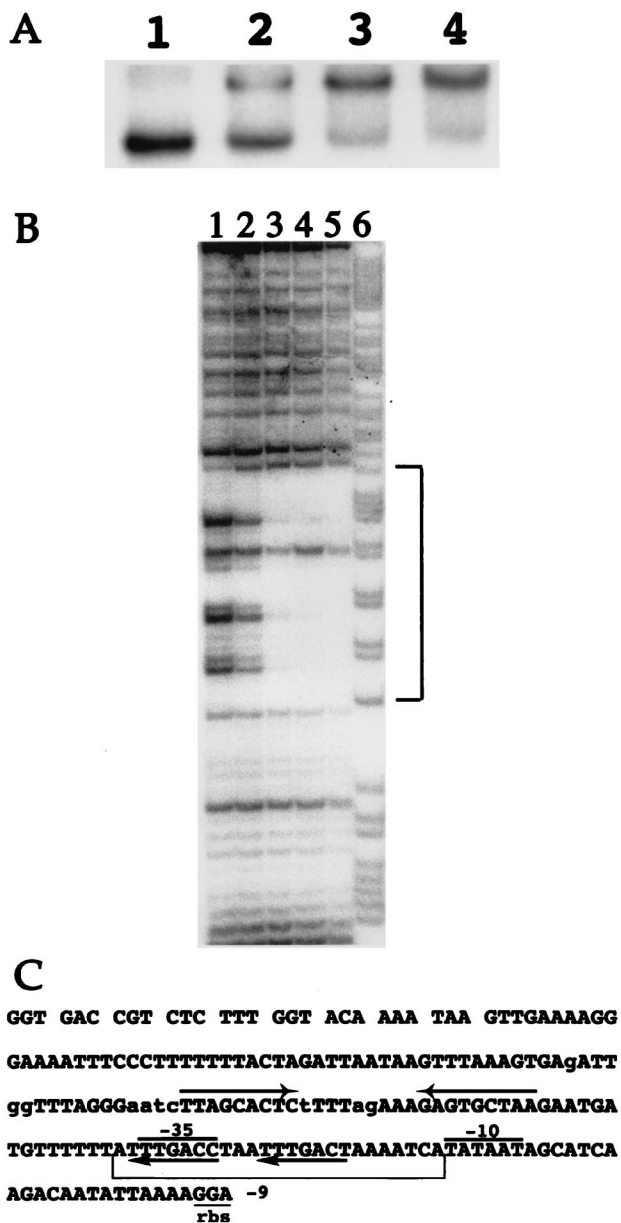


FIG. 2. (A) CtsR binds specifically to the *S. salivarius* *clpP* promoter region. In gel mobility shift experiments, a radiolabeled DNA fragment (10,000 cpm) corresponding to the *S. salivarius* *clpP* promoter region (positions -142 to +44 with respect to the translation initiation codon) was incubated with increasing amounts of purified *B. subtilis* CtsR protein. Lanes 1 to 4, 0, 20, 40, and 80 ng of CtsR, respectively. (B) CtsR protects the directly repeated heptad sequence. In DNase I footprinting analyses of CtsR binding, a radiolabeled DNA fragment (50,000 cpm) corresponding to the *S. salivarius* *clpP* promoter region (positions -142 to +44 with respect to the translation initiation codon) was incubated with increasing amounts of purified CtsR. Lanes 1 to 5, 0, 100, 200, 400, and 800 ng of CtsR, respectively; lane 6, G+A Maxam and Gilbert reaction of the corresponding DNA fragment. The region protected by CtsR is shown by the bracket. (C) Nucleotide sequence of the *S. salivarius* ATCC 9758 *clpP* promoter region. Potential -35 and -10 promoter sequences are overlined; the CtsR heptad direct-repeat operator sequences are indicated by arrows; the CIRCE operator sequence is indicated by facing arrows; the region protected by CtsR in DNase I footprint experiments is indicated by a bracket; lowercase letters indicate differences in the nucleotidic sequence from that of the ATCC 25975 strain. Positions are numbered relative to the translation initiation codon.

merous differences with the nucleotide sequence of strain ATCC 25975 (indicated in Fig. 2C). Interestingly, in strain ATCC 9758, the inverted repeat sequences of the CIRCE motif are separated by the consensus 9-bp spacer instead of 8 bp. This reinforced the hypothesis of a potential role for HrcA in the regulation of *clpP* and suggests that the reported 8-nucleotide spacer sequence from strain ATCC 25975 (7) may be due to a sequencing error.

*clpP* of *S. salivarius* is controlled by HrcA. To evaluate the role of HrcA and this potential CIRCE sequence in *S. salivarius* *clpP* regulation, we used *B. subtilis* as a heterologous host as detailed above.

A DNA fragment corresponding to the coding sequence of *B. subtilis* *hrcA* was generated by PCR and cloned between the *Hind*III and *Eco*RI sites of plasmid pXT (3), placing *hrcA* under the control of the xylose-inducible promoter (*P<sub>xy</sub>L4*). The construct was then integrated as a single copy at the *thrC* locus of *B. subtilis*. The resulting strain, QB8083 [*trpC2 ΔctsR amyE::(clpP'-bgaB aphA3) ΔhrcA::cat thrC::(P<sub>xy</sub>L4-B. subtilis hrcA spec)*], carries the *S. salivarius* *clpP'-bgaB* transcriptional fusion integrated as a single copy at the *amyE* locus, as well as a deletion-replacement of the endogenous *hrcA* gene (17).

β-Galactosidase assays were performed during growth at 37°C in the presence or absence of xylose. Expression of *clpP'-bgaB* was repressed twofold in the presence of HrcA (Fig. 3A), whereas expression in the same background was repressed up to 16-fold by CtsR (Fig. 1A). When strain QB8083 was grown at 48°C in the presence of xylose, expression levels of the *bgaB* fusion were fully derepressed (Fig. 3B). These results indicate that the *S. salivarius* *clpP* gene is also repressed by HrcA, albeit weakly but reproducibly, and that this repression is abolished during heat shock, leading to induction of this gene.

The small effect of HrcA may be due to a weak interaction between the *B. subtilis* protein and the *S. salivarius* promoter since HrcA proteins of different bacteria are poorly conserved (10). However, it is worth noting in this case that the CIRCE operator is placed 17 bp upstream from the -35 sequence of the promoter (Fig. 2C), which may explain the weak repression by HrcA. Indeed, it was shown with *B. subtilis* that increasing the distance between the transcriptional start site and a downstream CIRCE motif progressively decreased the negative regulatory effect (30), and expression of *groE'-bgaB* was totally abolished when the distance reached 21 bp. Although we cannot exclude the possibility of the existence of a second promoter upstream from the CIRCE sequence, we suggest that HrcA contributes to the repression of *clpP* expression by interfering with RNA polymerase binding to the downstream promoter. Although the large majority of HrcA-controlled promoters have a CIRCE motif located downstream from the transcriptional start site (21, 27), we note that in the streptococcal group, the CIRCE operator sequence is present twice within the promoter region of the *dnaK* operon. One CIRCE sequence is found a couple of bases downstream from the transcriptional start site, which has been characterized in some cases (13-15). The second CIRCE sequence is located 17 to 18 bp upstream from the -35 promoter sequence in *Streptococcus mutans*, *Streptococcus agalactiae*, *S. pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, and *Enterococcus faecalis* at the same position as the single CIRCE sequence upstream from the *clpP* gene in *S. salivarius*. In *Lactococcus lactis*, there is only a single CIRCE

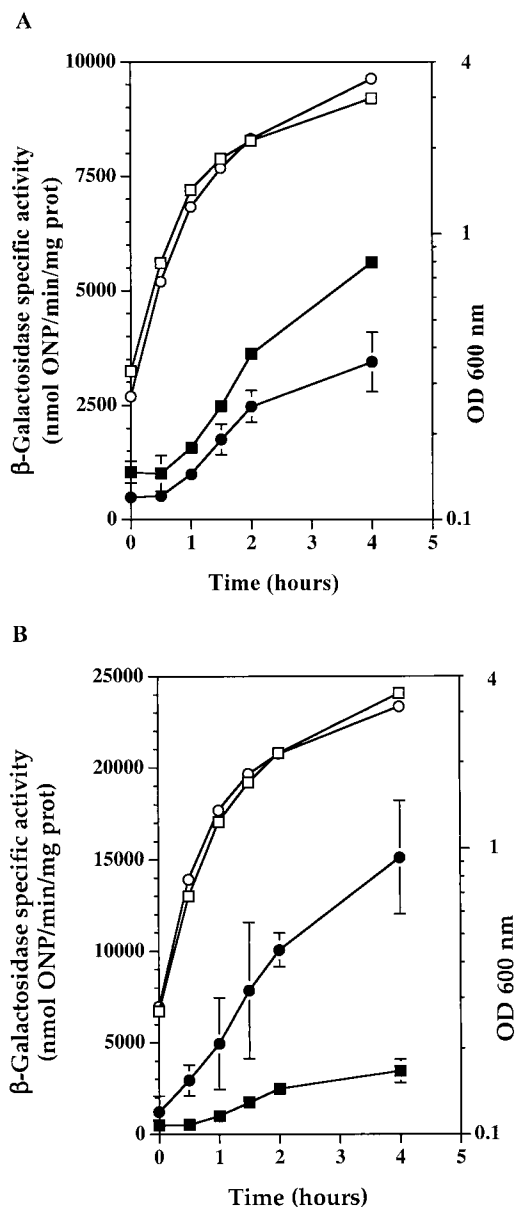


FIG. 3. (A) The expression of *clpP* of *S. salivarius* is repressed by HrcA. Levels of expression of *clpP*-*bgaB* (QB8083) in the presence (○, ●) or absence (□, ■) of xylose were monitored as indicated in the legend to Fig. 2A. (B) The repression of *S. salivarius clpP* expression by HrcA is abolished by heat shock. Levels of expression of *clpP*-*bgaB* (QB8081) were measured in cells expressing *hrcA* during growth at 37°C (□, ■) and 48°C (○, ●) as indicated in the legend to Fig. 2B. ONP, *o*-nitrophenyl.

sequence upstream from the *dnaK* operon and it is located upstream from the potential promoter (5). Although these upstream HrcA recognition sites have not been characterized, their perfect conservation strongly suggests that these sequences are not cryptic and that they must play a role in the regulation of stress gene expression.

*clpP* of *S. salivarius* is the first example of a *clp* gene controlled by both CtsR and HrcA. Using both in vivo and in vitro approaches, we have shown that the *S. salivarius clpP* gene is

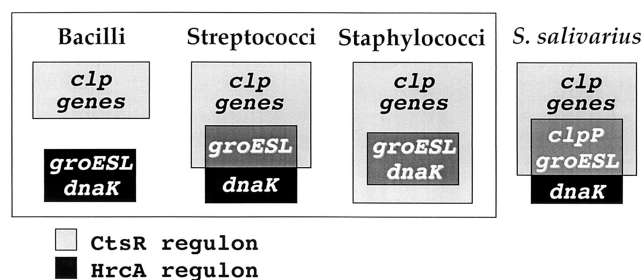


FIG. 4. Dual regulation by CtsR and HrcA in different gram-positive bacteria. In bacilli the two regulons are distinct, whereas in streptococci they partially overlap, and the HrcA regulon is entirely embedded within the CtsR regulon in staphylococci. *clpP* of *S. salivarius* is the first example of a *clp* gene that is dually regulated by both HrcA and CtsR.

efficiently repressed by CtsR from *B. subtilis*, strongly suggesting the existence of a CtsR regulon in this bacterium. Furthermore, we have presented evidence indicating a likely repression of *clpP* expression by the transcriptional regulator HrcA as well. Although the genome of *S. salivarius* has not been sequenced, the incomplete genome sequence of the closely related bacterium *Streptococcus thermophilus* is available (<http://www.biol.ucl.ac.be/gene/genome>), and we were able to identify potential genes encoding orthologs of both HrcA and CtsR. Inspection of the nucleotide sequence preceding the *S. thermophilus clpP* gene revealed the same tandem arrangement of conserved CIRCE and CtsR binding sites, suggesting that dual regulation of *clpP* by both HrcA and CtsR also occurs in *S. thermophilus*. We recently reported the existence in *S. aureus* of a significant regulatory overlap between class I and class III stress response genes, since the entire HrcA regulon (consisting of the *dnaK* and *groESL* operons) is embedded within the CtsR regulon (Fig. 4), with both operons being preceded by tandemly arranged operator sites for the two repressors (1). Furthermore, comparative genome analysis allowed us to predict the existence in many gram-positive bacteria of a partial overlap between class I and class III genes, particularly in the streptococcal group (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. mutans*, *S. agalactiae*, and *L. lactis*) (Fig. 4), in which only the *groESL* operon presents both the highly conserved CIRCE-HrcA recognition sequence and the CtsR target site organized in tandem (2). This dual regulation is probably not redundant, since we have shown that in *S. aureus*, CtsR and HrcA act together synergistically to maintain low levels of expression of the *dnaK* and *groESL* operons in the absence of stress (1).

The *S. salivarius clpP* promoter has an original structure with a classical CtsR binding site present in most *clpP* promoters of low-G+C-content gram-positive bacteria and an upstream CIRCE motif more characteristic of the *dnaK* promoters of streptococci (Fig. 2C and 4). Nevertheless, *clpP* of *S. salivarius* is the first example of a *clp* gene associated with a CIRCE sequence. Dual regulation by both repressors may play a role in the fine-tuning of *clpP* expression in *S. salivarius* as well as closely coordinating synthesis of the classical chaperones (GroESL and DnaK) with that of the Clp ATP-dependent protease during the stress response.

We are grateful to Isabelle Derré for the gift of *B. subtilis* CtsR protein and many helpful discussions and to Georges Rapoport for critical reading of the manuscript. We thank Marc Galimand for the gift of *S. salivarius* ATCC 9758 chromosomal DNA. We thank the Institute for Genomic Research for generously providing access to unfinished microbial genome sequences and Pascal Hols and Benoît Grossiord (Université Catholique de Louvain, Louvain, Belgium) for the nucleotide sequences of stress genes from *Streptococcus thermophilus* LMG1831.

This work was supported by research funds from the European Commission (grant QLRT-1999-01455); the Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur, Université Paris 7; the Programme de Recherche Fondamentale en Microbiologie, Maladies Infectieuses et Parasitaires de the Ministère de la Recherche; and the Délégation Générale pour l'Armement. Arnaud Chastanet was the recipient of a Ph.D. thesis fellowship from the Ministère de la Recherche.

#### REFERENCES

- Chastanet, A., J. Fert, and T. Msadek. Comparative genomics reveal novel heat-shock regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.*, in press.
- Chastanet, A., M. Prudhomme, J.-P. Claverys, and T. Msadek. 2001. Regulation of *Streptococcus pneumoniae* *clp* genes and their role in competence development and stress survival. *J. Bacteriol.* **183**:7295–7307.
- Derré, I., G. Rapoport, and T. Msadek. 2000. The CtsR regulator of stress response is active as a dimer and specifically degraded in vivo at 37 degrees C. *Mol. Microbiol.* **38**:335–347.
- Derré, I., G. Rapoport, and T. Msadek. 1999. CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **31**:117–132.
- Eaton, T., C. Shearman, and M. Gasson. 1993. Cloning and sequence analysis of the *dnaK* gene region of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J. Gen. Microbiol.* **139**:3253–3264.
- Gaillot, O., E. Pellegrini, S. Bregenholt, S. Nair, and P. Berche. 2000. The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **35**:1286–1294.
- Giffard, P. M., C. Rathsam, E. Kwan, D. W. Kwan, K. L. Bunny, S. P. Koo, and N. A. Jacques. 1993. The *ftf* gene encoding the cell-bound fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 is preceded by an insertion sequence and followed by *FURI* and *clpP* homologues. *J. Gen. Microbiol.* **139**:913–920.
- Gottesman, S., E. Roche, Y. N. Zhou, and R. T. Sauer. 1998. The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev.* **12**:1338–1347.
- Gottesman, S., S. Wickner, and M. R. Maurizi. 1997. Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev.* **11**:815–823.
- Hecker, M., W. Schumann, and U. Völker. 1996. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **19**:417–428.
- Hirata, H., T. Fukazawa, S. Negoro, and H. Okada. 1986. Structure of a  $\beta$ -galactosidase gene of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* **166**:722–727.
- Idigoras, P., A. Valiente, L. Iglesias, P. Trieu-Cout, and C. Poyart. 2001. Meningitis due to *Streptococcus salivarius*. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3017.
- Jayaraman, G. C., J. E. Penders, and R. A. Burne. 1997. Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans* *hrcA*, *grpE* and *dnaK* genes and regulation of expression in response to heat shock and environmental acidification. *Mol. Microbiol.* **25**:329–341.
- Laport, M. S., A. C. de Castro, A. Villardo, J. A. Lemos, M. C. Bastos, and M. Giambiagi-deMarval. 2001. Expression of the major heat shock proteins DnaK and GroEL in *Streptococcus pyogenes*: a comparison to *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.* **42**:264–268.
- Lemos, J. A. C., Y.-Y. M. Chen, and R. A. Burne. 2001. Genetic and physiologic analysis of the *groE* operon and role of the HrcA repressor in stress gene regulation and acid tolerance in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **183**:6074–6084.
- Mei, J. M., F. Nourbakhsh, C. W. Ford, and D. W. Holden. 1997. Identification of *Staphylococcus aureus* virulence genes in a murine model of bacteraemia using signature-tagged mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **26**:399–407.
- Mogk, A., G. Homuth, C. Scholz, L. Kim, F. X. Schmid, and W. Schumann. 1997. The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* **16**:4579–4590.
- Msadek, T., V. Dartois, F. Kunst, M.-L. Herbaud, F. Denizot, and G. Rapoport. 1998. ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol. Microbiol.* **27**:899–914.
- Nair, S., C. Frehel, L. Nguyen, V. Escuyer, and P. Berche. 1999. ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **31**:185–196.
- Nair, S., E. Milohanic, and P. Berche. 2000. ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **68**:7061–7068.
- Narberhaus, F. 1999. Negative regulation of bacterial heat shock genes. *Mol. Microbiol.* **31**:1–8.
- O'Toole, G. A., and R. Kolter. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* **28**:449–461.
- Pederson, K. J., S. Carlson, and D. E. Pierson. 1997. The ClpP protein, a subunit of the Clp protease, modulates *ail* gene expression in *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* **26**:99–107.
- Polissi, A., A. Pontiggia, G. Feger, M. Altieri, H. Mottl, L. Ferrari, and D. Simon. 1998. Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **66**:5620–5629.
- Qoronfleh, M. W., C. A. Bortner, P. Schwartzberg, and B. J. Wilkinson. 1998. Enhanced levels of *Staphylococcus aureus* stress protein GroEL and DnaK homologs early in infection of human epithelial cells. *Infect. Immun.* **66**:3024–3027.
- Schumann, W., M. Hecker, and T. Msadek. 2002. Regulation and function of heat-inducible genes in *Bacillus subtilis*, p. 359–368. *In* A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. ASM Press, Washington, D.C.
- Segal, R., and E. Z. Ron. 1996. Regulation and organization of the *groE* and *dnaK* operons in Eubacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **138**:1–10.
- Wiegert, T., and W. Schumann. 2001. SsrA-mediated tagging in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **183**:3885–3889.
- Yaniv, L. G., and I. Potasman. 2000. Iatrogenic meningitis: an increasing role for resistant viridans streptococci? Case report and review of the last 20 years. *Scand. J. Infect. Dis.* **32**:693–696.
- Yuan, G., and S.-L. Wong. 1995. Regulation of *groE* expression in *Bacillus subtilis*: the involvement of the  $\sigma^A$ -like promoter and the roles of the inverted repeat sequence (CIRCE). *J. Bacteriol.* **177**:5427–5433.

**Annexe 4**

***clpB*, a novel member of the *Listeria monocytogenes* CtsR regulon, is involved in virulence but not in general stress tolerance.**

soumis pour publication au J. Bacteriol., (Avril 2003)

***clpB*, A Novel Member Of The *Listeria monocytogenes* CtsR Regulon,  
Is Involved In Virulence But Not In General Stress Tolerance**

ARNAUD CHASTANET,<sup>§1</sup> ISABELLE DERRÉ,<sup>§1</sup> SHAMILA NAIR,<sup>2</sup>  
AND TAREK MSADEK <sup>1</sup>

Unité de Biochimie Microbienne, Institut Pasteur, CNRS URA 2172 , 25 rue du Dr. Roux,  
75724 Paris Cedex 15, <sup>1</sup> and INSERM U411, Faculté de Médecine Necker, 156, rue de  
Vaugirard 75730 Paris Cedex 15, <sup>2</sup> France

<sup>§</sup>The first two authors contributed equally to this work

\*Corresponding author

Mailing address: Unité de Biochimie Microbienne, Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux,  
75724 Paris Cedex 15, France.

Phone: (33) 1 45 68 88 09.

Fax: (33) 1 45 68 89 38.

E-mail: tmsadek@pasteur.fr.

Running title: ClpB ATPase of *Listeria monocytogenes*

Key words: *L. monocytogenes*/ClpB/stress/virulence/heat shock/CtsR

## Abstract

Clp-HSP100 ATPases are a widespread family of ubiquitous proteins in both prokaryotes and eukaryotes, playing an important role in the folding of newly synthesized proteins and refolding of aggregated proteins. They have also been shown to participate in the virulence of several pathogens, including *Listeria monocytogenes*. Here, we describe a new member of the Clp-HSP100 family of *L. monocytogenes*, harboring all the characteristics of the ClpB subclass and sharing 63% amino acid sequence identity with ClpB of *Lactococcus lactis*. Transcriptional analysis of *clpB* revealed a heat shock inducible  $\sigma^A$ -type promoter. Potential binding sites for the CtsR regulator of stress response were identified in the promoter region. Using both *in vivo* and *in vitro* approaches, expression of *clpB* was shown to be repressed by CtsR, indicating that it is a novel member of the *L. monocytogenes* CtsR regulon. We showed that ClpB is involved in the pathogenicity of *L. monocytogenes* since the  $\Delta clpB$  mutant is significantly affected in virulence in a murine model of infection, and that this effect is not due to a defect in stress resistance. Indeed, ClpB is not involved in tolerance to heat, salt, detergent, puromycin and cold stress even though its synthesis is inducible by heat shock. However, ClpB was shown to play a role in induced thermotolerance, allowing increased resistance of *L. monocytogenes* to lethal temperatures. This is the first example of a *clpB* gene directly controlled by CtsR, and the first role for a ClpB protein in induced thermotolerance and virulence in a Gram-positive organism.

## INTRODUCTION

*Listeria monocytogenes* is a Gram-positive pathogen implicated in food-borne infections and responsible for meningitis, septicemia and gastro-enteritis, with a high degree of mortality in immunocompromised hosts. During the past few years, this bacterium has been extensively studied and, because of its ability to escape from the phagosome, to grow in the cytosol and to efficiently invade neighboring cells, it has become a model for intracellular development (56).

Several virulence proteins required for the key steps of the infectious process have been identified to date: InlA and InlB which are required for entrance of *L. monocytogenes* into epithelial cells, listeriolysin O (Llo) for escape from the phagosome, ActA for actin polymerization, cell-cell mobility and invasion, and PlcB for lysis of the two-membrane vacuole (7). All virulence genes identified so far are under the positive control of a single regulator: PrfA. This activator is present only at the host temperature, due to the secondary structure of its mRNA which acts as a thermosensor (31).

In addition to these major virulence factors are many proteins involved in pathogenicity of *Listeria*, which are important as they allow persistence and rapid adaptation during the infectious process: the stress proteins. Accumulating data on several pathogens indicates that acid or oxidative stress proteins and more recently heat shock proteins (HSPs) and chaperones, play an important role in virulence. Indeed, synthesis of the two major *Staphylococcus aureus* chaperones, DnaK and GroESL, was shown to be induced during infection of human epithelial cells (57) and in *L. monocytogenes*, expression of the *groESL* operon is induced during intracellular infection while DnaK is required for efficient phagocytosis with macrophages (16, 25). Another class of stress proteins, the Clp family, has also been shown to play a major

role in the virulence of several pathogens: ClpP was shown to control expression of the attachment invasion locus (*ail*) of *Yersinia enterocolitica*, whereas in *Salmonella typhimurium*, inactivation of *clpP* prevents growth and survival within macrophages (27, 74). Systematic genome-wide approaches such as Signature Tagged Mutagenesis revealed the role of several *clp* genes including *clpE*, *clpC* and *clpL* of *Streptococcus pneumoniae* (26, 36, 53), and *clpX* of *S. aureus* (41).

In *L. monocytogenes*, all *clp* genes characterized to date have been shown to play a role in virulence. ClpC is required for intracellular growth and *in vivo* survival in host tissues by promoting early escape from the phagosomal compartment (59, 60) and is also necessary for cell adhesion and invasion (48). The ClpE ATPase plays a role in *L. monocytogenes* virulence as well (47) and a *L. monocytogenes clpP* mutant presents a defect in intracellular replication (17).

Recently, in the eukaryote *Leishmania major*, the *clpB* mutant was shown to be delayed in the initiation of lesions in a murine model of infection. *In vitro* experiments of macrophage infection indicate a role for ClpB in proliferation of promastigote cells under heat shock condition and in cellular differentiation from the promastigote to amastigote stage, which is the form for intracellular development (29). More recently, it was shown in *Leishmania donovani* that synthesis of the A2 virulence factor is totally impaired in the *clpB* mutant (34), and consequently that ClpB and A2 are both required for virulence and development inside the mammalian host (6, 35). A  $\Delta clpB$  mutant of *Y. enterocolitica*, a major gastrointestinal pathogen, presents a decrease in invasins and flagellin expression, encoded by the two virulence genes *inv* and *fleB* (2). In *S. typhimurium*, the *clpB* mutant was discovered during a systematic search for mutants deficient in colonization of the chicken alimentary tract and was shown to be attenuated for virulence in one-day-old chicks (69). Finally, a *clpB* mutant of



*Francisella novicida* was isolated during a screen for genes required for *in vitro* growth in thioglycollate-elicited mouse peritoneal macrophages (24).

Clp proteins are ubiquitous among prokaryotes and eukaryotes, active as multimeric complexes and function both as proteases and chaperones (21). Bacterial genomes are endowed with different sets of *clp* paralogues encoding Clp-HSP100 ATPase subunits, belonging to groups A, B, C, D, E or L and distinguished by their N-terminal domain and the central spacer region between the two ATP-binding sites. *clpP*, which encodes the proteolytic subunit of the Clp ATP-dependent protease, is usually present as a single copy, but up to five copies per genome can coexist, e.g. *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* (8, 70, 71). The ClpP proteolytic subunit requires association with an ATPase subunit to be active, giving rise to a multimeric complex presenting structural and functional analogies with the eukaryotic proteasome (55). But ATPase subunits can also act in the absence of ClpP, forming a smaller complex with chaperone activity. It is interesting to note that ClpB of *E. coli*, the most well-studied ClpB protein, does not interact with the proteolytic subunit and is exclusively considered as a chaperone (73). However, although some ClpB proteins have been characterized in both eukaryotes and bacteria, the role and specific functions of ATPase chaperones remains to be determined.

Analysis of the complete genome of *L. monocytogenes* EGDe (19) reveals several uncharacterized genes encoding proteins belonging to the Clp family, two of which are preceded by potential binding sites for the CtsR regulator of stress response (46). Here we characterized the *clpB* gene of *L. monocytogenes*. Using both *in vivo* and *in vitro* approaches, regulation of *clpB* was studied, showing a direct control by CtsR. This repression was demonstrated to be thermosensitive. A deletion mutant was constructed and functional analysis revealed a role for ClpB in virulence of

*L. monocytogenes*. We also show that, although ClpB has no obvious role in stress tolerance, it is required for induced thermotolerance of *L. monocytogenes*.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, growth conditions and transformation.** Bacterial strains used in this work are listed in Table 1. *Escherichia coli* K12 strain TG1 ( (*lac proAB*) *supE thi hsdΔ5* (F' *traD36 proAB lacI<sup>q</sup> lacZ* M15)) (18) was used for cloning experiments.

*E. coli* was grown in LB medium. Electroporation procedures were used for transformation with selection on LB plates supplemented with ampicillin (100 µg/ml), erythromycin (200 µg/ml) or kanamycin (25 µg/ml). *L. monocytogenes* LO28 was routinely grown in BHI complex medium. Constructs were introduced into LO28 strains by electroporation. Antibiotics were used at the following concentrations: erythromycin (8 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml) and spectinomycin (60 µg/ml). *B. subtilis* was grown in LB medium and transformed as previously described using plasmid DNA (44). Transformants were selected on SP plates supplemented with chloramphenicol (5 µg/ml) or spectinomycin (100 µg/ml).

-Galactosidase activity was estimated on plates by 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranoside (X-Gal) hydrolysis. -Galactosidase specific activities were determined as previously described (42, 44, 45) and expressed as Miller units per milligram protein.

Basal stress resistance experiments were performed as follows. Overnight culture were diluted 100-fold in BHI medium and grown at 37°C with vigorous shaking until the OD<sub>600</sub> reached 0.3. Exponentially growing cultures were then divided in two and one subjected to one of the following stress conditions: 2% NaCl (w/v), 0.01% SDS (w/v), 15, 30 or 60 µg/ml puromycin (values indicate final concentrations), or growth at 42°C, 44°C, 48°C or 55°C. Growth was then followed during an additional 3 hours. For induced thermoresistance, overnight cultures were diluted 100-fold in BHI medium and placed at 37°C with vigorous shaking until the OD<sub>600</sub> reached 0.3. Prior to the heat treatment at 60°C, the cultures were divided and one half

maintained at 37°C while the other half was preincubated at the non-lethal temperature of 48°C for 20 minutes. Both cultures were then incubated at 60°C, aliquots were quickly transferred to ice, diluted in ice-cold BHI, immediately plated on BHI, and colony-forming units were counted (cfu).

**DNA manipulations.** Chromosomal DNA preparation, plasmid isolation, restriction enzyme analysis and amplification by PCR were performed according to standard protocols (62). DNA sequences were determined by the dideoxy chain termination method (64) using modified T7 DNA polymerase (68) (USB Corp., Cleveland, USA). DNA concentrations were calculated by UV spectroscopy at 260 nm.

**Mutant and plasmid constructions.** All oligonucleotide positions are given relative to the translation initiation codon. Plasmids used in this study are listed in Table 2. Plasmid pDL (76) was used for constructing transcriptional fusions with the *Bacillus stearothermophilus bgaB* gene, encoding a thermostable  $\beta$ -galactosidase (28), with subsequent integration at the *B. subtilis amyE* locus. A *clpB'*-*bgaB* transcriptional fusion was constructed using a 189 bp *EcoRI/BamHI* DNA fragment corresponding to the *clpB* upstream region, generated by PCR by using oligonucleotides ID73 (-193) 5' GAAGAATTCATGTTCTTACTCCGCC 3' and ID74 (-5) 5' GGAGGATCCTTATAAAAGATAAGTC 3'. This fragment was cloned between the *EcoRI/BamHI* sites of plasmid pDL to give plasmid pDL73/74. Linearization of this plasmid at the unique *PstI* site and transformation of the *B. subtilis* QB4991 strain with selection for chloramphenicol resistance yielded strain QB8059, in which the *clpB'*-*bgaB* fusion was integrated as a single copy at the *amyE* locus. The laniaries pxyl59/60 plasmid (46) was then introduced in these strains by transformation and selection for

spectinomycin to give strain QB8060, in which *ctsR* is placed under the control of the *P<sub>xylA</sub>* xylose-inducible promoter, and integrated as a single copy at the *thrC* locus.

A marker-less *clpB* deletion mutant of *L. monocytogenes* was constructed using plasmid pMAD *clpB*. The mutant was constructed by first generating by PCR two DNA fragments of 829 and 761 base-pairs, using oligonucleotides AC189 5' AATGGATCCCACATCCGAGCGAGTAAACAC 3'/AC190 5' TAAGTCGAC TCATTCGTCCTCCTTATAAAA 3' and AC192 5' CACGTCGACTGAAAGGGAAAAC TTTGGTTG 3'/AC193 5' TATCCATGGAATATTTATTTACTGGTTTTA 3', corresponding respectively to the chromosomal DNA regions directly upstream and downstream from the *clpB* gene. These fragments were cloned in pMAD, a pRN5101 derivative carrying a thermosensitive origin of replication (M. Arnaud and M. Débarbouillé, unpublished), and the resulting pMAD *clpB* plasmid was electroporated in the LO28 strain with selection for erythromycin. Integration excision of the pMAD *clpB* was performed as previously described for *S. aureus* (4) but with a non-permissive temperature growth of 40°C, yielding strain LM2000 (*clpB*) in which the entire *clpB* coding sequence was removed. PCR amplifications were performed to confirm the gene deletion.

The *ctsR* deletion mutant was obtained by transforming the LO28 strain by plasmid pMAD *ctsR*. For this purpose, DNA fragments of 1044 and 1031 base-pairs corresponding to the upstream and downstream chromosomal DNA regions from *ctsR* were amplified using oligonucleotides AC212/AC213 (5' GGCGGATCCCTCCTAAAGAGTAACGGAGGC 3'/5' ACTGAATTCCAATACTG TTTCAAATAAGC 3') and AC214/215 (5' TGAGAATTTCGGATTTTAGAGGCGATGTT AG 3'/5' TATCCATGGTCTTTATCAAAAGCATAAC 3') respectively. The *aphA3* kanamycin resistance gene, deprived of its transcription initiation and termination signals, was then cloned at the *EcoRI* site between the two above fragments. The

resulting pMAD $\Delta$ *ctsR* plasmid was introduced in strain L028 and integration excision was performed as described for the *clpB* deletion, yielding strain LM2001.

**Mouse virulence assay.** Six to eight week old pathogen-free ICR female Swiss mice (Janvier, Le Geneset St Isle) were used in this study. Groups of 5 mice were injected intravenously with doses of *L. monocytogenes* LO28 and *clpB* mutant ranging between  $5 \times 10^5$  to  $5 \times 10^8$  bacteria. Mortality was observed over a 14-day period. The LD<sub>50</sub> was determined by the Probit method. Mice were killed by cervical dislocation in accordance with the policies of the Animal Welfare Committee of the Faculté Necker (Paris).

**Gel mobility shift DNA-binding assays.** A 189 base-pair *EcoRI/BamHI* DNA fragment, corresponding to the promoter region of *clpB* were generated by PCR using oligonucleotides ID73 and ID74. Radiolabelling, DNA binding and gel shift experiments were performed as previously described (10).

**DNase I footprinting.** A 229 base-pair DNA fragment used for DNase I footprinting was prepared by PCR using the *Pfu* polymerase (Stratagene, La Jolla, California) and oligonucleotides ID75 (-147) (5' AAATTCAGAAGATCTGCCAACC 3') and ID76 (+82) (5' CTTATGTTCTGATGCAATAGC 3'). Labeling and DNase I treatment were performed as previously described (10).

**RNA extraction and primer extension.** *L. monocytogenes* strains were grown in BHI medium at 37 °C with aeration until the OD<sub>600</sub> reached 0.5, half of the culture was then shifted to 42 °C and incubation was pursued for another 10 minutes. Cells were pelleted and frozen immediately, and RNA extraction and primer extension were then

performed as previously described (5) using radiolabelled oligonucleotide AC209 (+22) (5' GTGTAAATTTTTGTAAATCCATTC 3'). Radioactive gels were exposed to storage phosphor screens and scanned with a Molecular Dynamics Storm 860 optical scanner. Quantitation of primer extension products was performed using the ImageQuant 5.1 software package (Molecular Dynamics).

## RESULTS

**Genome sequence analysis reveals a novel member of the Clp family of *L. monocytogenes*.** Analysis of the complete genome of *L. monocytogenes* EGDe reveals a deduced protein with 63% amino acid sequence identity with ClpB of *L. lactis* (FIG. 1). The ATG initiation codon of *clpB* is preceded by a classical RBS (ribosome binding site) tAAGGAGG at a suitable distance, and encodes a predicted protein of 866 amino acid residues with a calculated molecular weight of 97.5 kDa. We note that a GTG codon is located 151 codons downstream from the ATG, also preceded by a typical RBS (AgAGGAGG) at an appropriate distance of 7 bp. This potential internal translation initiation site suggests the existence, as shown in *E. coli*, of a smaller form of ClpB with 716 amino acid residues and a theoretical mass of 80.6 kDa (51, 67).

No obvious transcription terminator sequence could be identified following the *clpB* TAA stop codon, and an open reading frame corresponding to the *lmo2205* gene, encoding a likely phosphoglyceromutase, is located 82 nucleotides downstream from *clpB*. This suggests that *clpB* and *lmo2205* may be organized as an operon.

Analysis of the amino acid sequence of the protein revealed two typical Clp signature motifs (65, 66). The first one corresponds to the presence of two ATP-binding sites, one with a single Walker A and two Walker B motifs and the other one presenting only one of each Walker motif, which is characteristic of HSP100 proteins (FIG. 1). There are also two repeated Clp amino-terminal domain motifs (ClpN), which are typical of ClpA and ClpB proteins (3) but are also present in most ClpC proteins. Although the exact function of this domain has not been determined, this amino-terminal region may be involved in interaction with protein substrates (3).

This Clp ATPase also presents a long central domain separating the two ATP-binding sites, approximately 130 amino acids in length, which is characteristic of ClpB



proteins. This domain contains a predicted coiled coil motif ((40); <http://smart.embl-heidelberg.de>), which appears to be present in all bacterial ClpB proteins and which may be involved in multimerization. Analysis of the carboxy-terminal domain, between the second ATP-binding site and the PDZ-like SSD domain (Sensor and Substrate Discrimination) revealed the absence of the IGF loop required for interaction with the ClpP proteolytic subunit (33). This suggests that, as in *E. coli*, ClpB function in *L. monocytogenes* is restricted to chaperone activity without any interaction with ClpP.

***clpB* is a novel member of the *L. monocytogenes* CtsR regulon.** *clp* genes of *L. monocytogenes* characterized to date have been shown to be controlled by the CtsR repressor of stress response genes (46) and many *clpB* genes are known to be heat shock-induced genes. To investigate a potential mechanism of transcriptional regulation of *clpB*, the sequence of the promoter region was analyzed, revealing the presence of a potential binding site for CtsR, which recognizes a directly repeated heptad operator sequence (GGTCAAA NAN GGTCAAA;(10)). Since the sequence identified upstream from *clpB* shares thirteen of the fourteen bases of the consensus (GGTCAAA AAA GGTCAGa, FIG. 3B), regulation by CtsR is likely, suggesting that ClpB may be a novel member of the *L. monocytogenes* CtsR regulon.

We used *B. subtilis* as a heterologous host to test whether CtsR plays a role in controlling *clpB* expression. For this purpose, a transcriptional fusion was constructed between the *L. monocytogenes clpB* promoter region and the *bgaB* gene of *B. stearothermophilus*, which encodes a thermostable  $\beta$ -galactosidase (28) (see Experimental procedures). The fusion was integrated as a single copy at the *amyE* locus of *B. subtilis* strain QB4991, in which the endogenous *ctsR* gene is deleted (10). The *L. monocytogenes ctsR* gene was integrated as a single copy at the *thrC* locus, under

control of the *P<sub>xyIA</sub>* xylose-inducible promoter, using plasmid *pxyl59/60* (46), leading to strain QB8060.

Strain QB8060 was grown at 37°C in the presence or absence of xylose and  $\beta$ -galactosidase activities were assayed. As shown in FIG. 2, *clpB*-*bgaB* was expressed up to approximately 550 Miller units  $\text{mg}^{-1}$  protein at 37°C in the absence of the repressor (without xylose). This expression was repressed 15-fold (35 Miller units  $\text{mg}^{-1}$  protein) in the presence of CtsR of *L. monocytogenes* (with xylose). However, when the culture was shifted to high temperature (48°C) instead of 37°C, expression was induced up to 47-fold (1650 Miller units  $\text{mg}^{-1}$  protein), in the presence of CtsR (with xylose; data not shown). These results clearly demonstrate that *clpB* of *L. monocytogenes* is under negative regulation by CtsR, and that this repression is thermosensitive.

***clpB* is expressed from a  $\sigma^A$ -dependent heat inducible promoter.** In order to demonstrate the thermo-inducibility of *clpB* and a role for CtsR in its regulation, an analysis of *clpB* transcription in *L. monocytogenes* was performed by primer extension experiments. First, the transcription initiation site was determined using RNA from *L. monocytogenes* cells grown in rich medium at 37°C and harvested in mid-exponential phase (see Experimental procedures). This revealed a single transcriptional start site 45 bp upstream from the ATG start codon of *clpB* (FIG. 3A, 3B). Consensus -10 and -35 sequences recognized by the  $\sigma^A$  RNA polymerase holoenzyme were identified upstream from the transcriptional start site suggesting a  $\sigma^A$ -dependent promoter (FIG. 3B). A comparative transcriptional analysis of RNA expression at 37°C and 42°C was performed by primer extension. As shown in FIG. 3A, *clpB* was expressed at a low basal level during growth in BHI at 37°C (FIG. 3A, lane 1) and transcription was

increased four-fold when the culture was shifted to 42°C (FIG. 3A, lane 3), which is consistent with a thermosensitive transcriptional regulation.

Repression of *clpB* by CtsR was examined *in vivo* in *L. monocytogenes*. The LM2001 *ctsR* mutant strain was constructed by deletion/replacement of the entire *ctsR* coding sequence by the *aphA3* kanamycin resistance gene. This resistance cassette was deprived of its transcription initiation and termination signals, to rule out any polar effects on expression of the downstream genes. Expression of *clpB* at 37°C in the wild type (L028) (FIG. 3A, lane 1) and *ctsR* (LM2001) (FIG. 3A, lane 2) strains was followed by primer extension analysis, revealing increased transcription of *clpB* (6.5 fold) in the absence of CtsR. It is interesting to note that *clpB* derepression at 42°C is only partial since expression levels are higher in the *ctsR* deletion mutant at 37°C (FIG. 3A, lane 2) than in the wild type at 42°C (FIG. 3A, lane 3), suggesting a limited inactivation of CtsR at this temperature. In conclusion, the *in vivo* evidence indicates that *clpB* expression is repressed by CtsR and is heat shock-inducible.

**CtsR binds specifically to the *clpB* promoter region.** An *in vitro* approach was used to demonstrate a direct interaction between CtsR and the *clpB* promoter region. Histidine-tagged CtsR of *L. monocytogenes*, presenting a carboxyterminal extension of six histidine residues, was previously overproduced and purified using a Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) agarose column (46). This recombinant protein was used in gel mobility shift DNA binding assays with a 189 bp radiolabelled PCR-generated DNA fragment corresponding to the *clpB* promoter region. This DNA fragment, extending from positions -193 to -5 relative to the translation initiation codon, was incubated with increasing amounts of purified CtsR, in the presence of non-specific competitor DNA [poly-(dI-dC)]. As shown in FIG. 4A, CtsR bound specifically to the

radiolabelled fragment leading to progressive displacement of the probe to the single higher molecular weight protein/DNA complex. Although an incomplete displacement was observed even at the highest CtsR concentrations, the single DNA-protein complex suggests only one CtsR-binding site in this promoter. These results demonstrate that CtsR of *L. monocytogenes* represses *clpB* expression by binding directly to the promoter region.

DNase I footprinting assays were performed on *L. monocytogenes* DNA fragments corresponding to the *clpB* promoter region to precisely determine the location of the CtsR binding site. When the non-template strand of *clpB* DNA was end-labeled, CtsR protected a region extending from positions -42 to -20 (FIG. 4 B, D). When the template strand was end-labeled the protected region was from positions -46 to -24 (FIG. 4 C, D). All positions are relative to the respective translational start site.

A single region within the *clpB* promoter is protected from DNase I cleavage, in agreement with the single protein/DNA complex observed in the gel mobility shift DNA binding assay (FIG. 4A). This protected region overlaps the transcriptional start site of *clpB* and contains the predicted CtsR direct repeat recognition sequence (GGTCAA AAA GGTCAGA) (FIG. 4D). These results indicate that CtsR negatively regulates *clpB* expression by directly binding to its operator sequence in the promoter region.

In conclusion, using both *in vitro* and *in vivo* approaches we have shown that *L. monocytogenes clpB* is a heat shock gene under the negative regulation of CtsR, extending the *L. monocytogenes* CtsR regulon.

**ClpB is involved in virulence of *L. monocytogenes*.** Since all *L. monocytogenes* Clp proteins characterized to date have been shown to play a role in virulence (17, 47,

59), we therefore examined virulence of a *L. monocytogenes*  $\Delta clpB$  mutant in a murine model.

For this purpose, we constructed the LM2000 mutant strain of *L. monocytogenes*, in which the entire coding sequence of *clpB* was deleted (see Experimental procedures). Virulence of the  $\Delta clpB$  strain was assayed by intravenous inoculation as described in Experimental procedures, and compared to that of the wild-type L028 strain. The lethal dose 50 (LD<sub>50</sub>) of the *clpB* mutant was  $5.4 \cdot 10^{6.3}$  whereas that of L028 was  $5.4 \cdot 10^{4.2}$ . The *clpB* mutant thus displays a significant decrease in virulence (100-fold).

We followed the survival of mice during twelve days after an inoculation of  $5.4 \cdot 10^5$  bacteria. Mice infected with the wild type strain began to die after 5 days and all were dead after the tenth day, whereas all animals infected by strain LM2000 (*clpB*) were still alive after 12 days (see FIG. 5).

These results clearly show that ClpB is implicated in the pathogenicity of *L. monocytogenes*.

**ClpB is not required for general stress response but is necessary for heat-shock-induced thermotolerance.** Since several Clp proteins are involved in virulence and many are essential for resistance to various stress conditions, one could argue that the effects on pathogenicity may be indirect consequences due to altered fundamental cell functions and a generally lowered cell fitness, leading to increased sensitivity to stress when invading the host.

A functional analysis of ClpB was undertaken, where survival of the  $\Delta clpB$  mutant was examined under different stress conditions. The LM2000 ( $\Delta clpB$ ) mutant strain had no obvious phenotype, since the mutant cells showed no morphological

defects and the growth curve in BHI at 37°C was identical to that of the L028 reference strain (data not shown).

The stress resistance of the *clpB* strain was evaluated under various stress conditions known to implicate other Clp proteins: heat stress, puromycin treatment, salt and SDS stress. Wild type and mutant strains were grown in BHI medium until an OD<sub>600</sub> of 0.3 was reached, cultures were divided in two and one half was subjected to a stress condition (see Experimental procedures). Results presented in FIG. 6A summarize data obtained for typical growth curves for each stress condition. As shown in FIG. 6A, growth of the wild type and mutant strains is affected when the temperature is equal to or higher than 42°C, when the concentration of puromycin is greater than 30 µg/ml, or in the presence of 0.01% SDS. However, the  $\Delta clpB$  and L028 reference strain were affected in the same manner for each stress, since in all conditions tested the *clpB* mutant grew as well as the wild type strain L028. In conclusion, *L. monocytogenes* ClpB is not required for general stress adaptation contrary to the situation in *E. coli* (32), *Brucella suis* (12) or *Helicobacter pylori* (1).

A recent study reports the induction of *L. monocytogenes clpB* during growth at low temperature (39), a condition which seems to induce most of the general stress proteins, and in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. ClpB was shown to be involved in cold adaptation (54). Growth at low temperature is an important part of the *L. monocytogenes* life cycle and one which favors food contamination and outbreaks. The role of ClpB in adaptation of *L. monocytogenes* to cold stress was tested. An overnight culture grown at room temperature was diluted and placed at 5°C for four days. As shown in FIG. 6B, the growth rate of the *clpB* mutant at 5°C was the same as that of the wild type strain. When cells were first grown to the mid-exponential phase at 37°C before shifting the culture to 5°C, the same result was observed i.e. identical growth rates for both strains (data not shown). Thus, ClpB of *L. monocytogenes* does

not seem to be implicated in cold stress adaptation, despite the fact that it is induced under those conditions, contrary to the situation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp (54).

It was previously shown that *L. monocytogenes* has a higher survival rate to lethal temperatures when previously exposed to a sub-lethal temperature (50, 61). This phenomenon is known as induced thermotolerance, in contrast to basal thermotolerance, and has been described in many bacteria. ClpB was shown to be required for induced thermotolerance in the cyanobacterium *Synechococcus* sp (13), and in the eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* (63). In order to test the involvement of ClpB in induced thermotolerance of *L. monocytogenes*, wild type L028 and  $\Delta clpB$  mutant strains were both incubated in liquid BHI medium at 37°C until an OD<sub>600</sub> of 0.3. The cultures were divided in two, one half was maintained at 37°C and the other was preincubated at 48°C for 20 minutes, and both cultures were then subjected to a 60°C heat treatment. As shown in FIG. 7, preincubated wild type cells present an increased resistance to lethal heat shock, since after 5 minutes incubation at 60°C, the survival rate is approximately 100 fold higher than for untreated cells. In contrast, no induced thermotolerance could be observed for the  $\Delta clpB$  strain, which remained as sensitive to lethal temperatures as the untreated cells. Consequently, contrary to the situation in wild type L028, a preincubation at 48°C does not protect *clpB* cells, revealing a role for ClpB in induced thermotolerance.

## DISCUSSION

Clp-HSP100 proteins are a ubiquitous family of ATPases acting both as chaperones and as ATPase subunits for the Clp ATP-dependent protease. Most of them are induced by stress and are implicated in stress tolerance. Moreover, Clp proteins are involved in crucial steps of the infectious process in many Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as in lower eukaryotes. In *L. monocytogenes*, ClpC, ClpP and ClpE are involved in virulence and are required for thermotolerance and resistance to salt stress and their expression is thermoinducible (17, 47, 48, 59). Their synthesis is under the negative control of CtsR, a repressor that binds to a heptad operator sequence in the promoter region (46).

Analysis of the complete sequence of *L. monocytogenes* EGDe (19) revealed several new *clp* genes. As in its closest relative *B. subtilis*, we noted the presence of genes encoding orthologs to ATPase subunits ClpY (65.5% identity) and ClpX (81% identity), and the proteolytic subunit ClpQ (78.5% identity). Surprisingly and contrary to the situation in *B. subtilis*, there are two additional *clp* genes, both harboring potential binding sites for the CtsR repressor in their promoter region. One of the encoded proteins shared 40% amino acid sequence identity with the ClpP proteolytic subunit of *L. monocytogenes* and is now referred to as ClpP2. Interestingly, a similar situation was recently described in *Bacillus thuringiensis*, in which two copies of ClpP are also present (14). In this bacterium, each copy seems to be implicated in a different cellular function, since ClpP1 is required for cell division at 25°C, corresponding to the insect host temperature, and is thus required for the virulence of *B. thuringiensis*, whereas ClpP2 is only required for sporulation and motility. However, only the *clpP1* copy is under the control of the CtsR homologue. But in *L. monocytogenes*, both *clpP* genes appear to be repressed by CtsR and are probably expressed under the same conditions. However, *clpP2* apparently cannot complement the  $\Delta clpP1$  deletion mutant



for virulence or stress resistance, suggesting that these two genes are not redundant and probably participate in different cellular functions.

The second new *clp* gene revealed during our analysis has no orthologue in the low G+C Gram-positive model bacterium *B. subtilis*, but shares strong similarities with *clpB* of *L. lactis*. We performed a systematic search for ClpB homologues to determine the extent of its distribution among low G+C Gram-positive bacterial genomes, allowing us to identify *clpB* genes in most of them. Indeed, unlike the situation in *B. subtilis*, ClpB orthologs are found in all staphylococci, clostridia, and enterococci as well as in *L. lactis*, *Listeria innocua* and most bacilli. Streptococci seem to be the only group without this homologue, despite the presence in *S. mutans* of a ClpB-like protein presenting the characteristically long spacer region between both ATP-binding-sites (37). However, the very diverging sequence places this paralogue far from all the other known eubacterial *clpB* genes, suggesting a recent acquisition by horizontal transfer. Consequently, ClpB ATPases are well represented among low G+C Gram-positive bacteria.

Examination of the *clpB* promoter sequence revealed a typical  $\sigma^A$  promoter and a potential CtsR binding site. In this work, we showed *in vivo*, using *B. subtilis* as a heterologous host, that CtsR of *L. monocytogenes* represses expression of a transcriptional fusion between the promoter of *clpB* and a reporter gene. Furthermore, this repression was lost during growth at 48°C. We constructed a *ctsR* mutant of *L. monocytogenes* and showed that *clpB* expression was increased in this strain. It is interesting to note that the CtsR regulon was not fully induced at 42°C since the level of expression in the *ctsR* mutant strain at 37°C was higher, indicating an adaptive response to the heat stress instead of a threshold effect.

We showed *in vitro* that CtsR binds directly to the *clpB* promoter region. The gel mobility shift experiments reveal a single protein/DNA complex. This was

confirmed by DNase I footprints in which only one protected region was observed, corresponding to the predicted CtsR box and overlapping the transcriptional start site.

A detailed DNA motif analysis of the complete genome of *L. monocytogenes* allowed us to determine that there appears to be only five members of the CtsR regulon: the *ctsR-clpC* operon, *clpP*, *clpE*, *clpB* and *clpP2*, since these are the only genes preceded by a likely CtsR binding site.

Stress induction of *clp* genes is generally correlated with a role for Clp proteins in stress resistance. Indeed, studies on Clp ATPase activities have shown both a chaperone activity allowing solubilisation of stable aggregates and proteolysis in association with ClpP. However, unlike the other Clp-ATPases, ClpB does not associate with the ClpP proteolytic subunit and has no effect on protease activity (73). As a consequence, ClpB is suggested to act exclusively as a chaperone. This was supported by the essentiality of the *clpB* gene in *E. coli* for growth at high temperature (67), a condition known to induce accumulation of misfolded proteins and requiring chaperone activity. This activity was first demonstrated for the Hsp104 homologue of the yeast (52) and ClpB was also shown to rescue aggregated proteins in association with DnaK, DnaJ and GrpE, forming a multi-chaperone system in *Thermus thermophilus* (43) and in *E. coli* (20, 77).

In agreement with this chaperone activity, ClpB has been shown to have three closely related functions: i) resistance to high temperature stress in several Gram-negative bacteria such as *H. pylori*, *B. suis*, and *E. coli* (1, 12, 32, 67), ii) induced-thermotolerance to lethal stress in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. (13) and in the eukaryote *S. cerevisiae* (38, 63). HSP101, a member of the Clp/HSP100 family present in plants, has also been shown to be implicated in induced-thermotolerance in both *Arabidopsis thaliana* (58) and maize (49). iii) The third function is the cold acclimatization of *Synechococcus* sp, suggesting a dual function in heat and cold stress

responses in this cyanobacterium. However, until now very few data were available about ClpB function in Gram-positive bacteria, among which only two have been described to date: in *Streptomyces albus G* (22) and in *Lactococcus lactis* (30). No obvious phenotype had been associated with the respective *clpB* mutants even though the genes were shown to be thermoinducible. Indeed, the  $\Delta clpB$  mutant of *L. lactis* was still resistant to temperature, salt and puromycin stress (30), and no thermosensitivity was observed in the *S. albus* mutant (C. Grandvalet, personal communication). Our results demonstrate that, as in other Gram-positive bacteria, ClpB does not seem to be required for stress resistance of *L. monocytogenes* including salt, heat, cold and puromycin treatments, even though *clpB* was shown here to be induced by heat, and was previously shown to be induced by cold stress (39). Nevertheless, we demonstrate here that ClpB is required for induced thermotolerance, which allows a better survival in lethal conditions when cells have been exposed to a non-lethal stress.

Since ClpB is required for induced thermotolerance of *L. monocytogenes*, this may contribute to the persistence of this bacterium and the health hazard it constitutes. Indeed, this bacterium has the ability to grow in a wide range of temperatures, even during the refrigeration process or after a HTSTP (High Temperature Short Time Pasteurization), and is considered as one of the most thermotolerant bacteria among non-spore forming food-borne pathogens (11, 15). It is clear that the ability of *L. monocytogenes* to grow at high temperatures is an important problem for the sterilization process and our results suggest that ClpB may be partially responsible for this adaptation faculty. In this context, it is interesting to note that a spontaneous nisin resistant strain of *L. monocytogenes* 412, a commonly used antibiotic in the food industry, was recently described (23). This mutant had an increased expression of three loci including *clpB*. However, we constructed a deletion mutant of *clpB* in this *L. monocytogenes* 412 mutant strain and did not observe any

restoration of sensitivity to nisin. Moreover, overexpression of *clpB* in a  $\Delta$ *ctsR* LO28 background did not lead to nisin resistance (A. Chastanet, unpublished results). Although a potential role for ClpB in nisin resistance cannot be excluded, it is clearly not sufficient, as there were multiple mutations in the strain isolated by Gravesen and co-workers.

A deletion of *clpB* is associated with a reduction in virulence in several eukaryotes and Gram-negative bacteria: *L. major* (29), *L. donovani* (6, 34, 35), *S. typhimurium* (69), *Y. enterocolitica* (2) and *F. novicida* (24). However the exact function of ClpB, and more generally Clp homologues, in the virulence of pathogens is still unclear because their targets have not yet been discovered. For this reason, one can argue that Clp proteins, because of their central role in protein folding, are important factors for efficient growth and cell fitness. ClpP proteolytic subunits, for example, are generally not redundant in the genome, have pleiotropic roles and their deletion, even in optimum conditions, greatly affects growth (5, 44). In most cases, Clp proteins involved in virulence are also required for stress survival, and since infection is one of the most stressful conditions encountered by bacteria one can argue that effects observed in a *clp* deletion mutant are due to a deficiency in cell fitness. We have shown here that ClpB is not required for stress survival of *L. monocytogenes*, with the exception of induced thermotolerance at 60°C. Thus, the significant reduction in *L. monocytogenes* virulence of the *clpB* mutant cannot be explained by a reduction in survival ability or in adaptation to stressful conditions but is more likely due to a specific alteration in a key process for pathogenic development, where ClpB probably acts as a chaperone.

In conclusion, our results demonstrate a role for ClpB in induced thermotolerance and present the first evidence for a role of ClpB in virulence of *L. monocytogenes*, and the first phenotype for a ClpB protein in Gram-positive bacteria.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to G. Rapoport for critical reading of the manuscript and we thank P. Berche in whose laboratory part of this work was carried out and A. Gravesen for *L. monocytogenes* strain 412. This work was supported by research funds from the Institut Pasteur, Centre National de Recherche Scientifique, Université Paris 7, European Commission (grant QLG2-CT-1999-01455), Ministère de la Défense (Délégation Générale pour l'Armement, Grant 0034069004707501) and the Programme de Recherche Fondamentale en Microbiologie, Maladies Infectieuses et Parasitaires of the Ministère de la Recherche. Isabelle Derré and Arnaud Chastanet were the recipients of a fellowship from the Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie and Arnaud Chastanet was the recipient of a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and the CANAM (Caisse Nationale d'Assurance Maladie et Maternité des Travailleurs Non Salariés des Professions Non Agricoles).

## REFERENCES

1. **Allan, E., P. Mullany, and S. Tabaqchali.** 1998. Construction and characterization of a *Helicobacter pylori* *clpB* mutant and role of the gene in the stress response. *J Bacteriol* **180**:426-9.
2. **Badger, J. L., B. M. Young, A. J. Darwin, and V. L. Miller.** 2000. *Yersinia enterocolitica* ClpB affects levels of invasin and motility. *J Bacteriol* **182**:5563-71.
3. **Barnett, M. E., A. Zolkiewska, and M. Zolkiewski.** 2000. Structure and activity of ClpB from *Escherichia coli*. Role of the amino- and -carboxyl-terminal domains. *J Biol Chem* **275**:37565-71.
4. **Chastanet, A., J. Fert, and T. Msadek.** 2003. Comparative genomics reveal novel heat shock regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **47**:1061-1073.
5. **Chastanet, A., M. Prudhomme, J. P. Claverys, and T. Msadek.** 2001. Regulation of *Streptococcus pneumoniae* *clp* Genes and Their Role in Competence Development and Stress Survival. *J Bacteriol* **183**:7295-307.
6. **Clos, J., L. Klaholz, M. Kroemer, S. Krobitsch, and S. Lindquist.** 2001. Heat shock protein 100 and the amastigote stage-specific A2 proteins of *Leishmania donovani*. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **190**:47-50.
7. **Cossart, P., and M. Lecuit.** 1998. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *Embo J* **17**:3797-806.
8. **de Crecy-Lagard, V., P. Servant-Moisson, J. Viala, C. Grandvalet, and P. Mazodier.** 1999. Alteration of the synthesis of the Clp ATP-dependent protease affects morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. *Mol Microbiol* **32**:505-17.

9. **Derre, I., G. Rapoport, and T. Msadek.** 2000. The CtsR regulator of stress response is active as a dimer and specifically degraded in vivo at 37 degrees C. *Mol Microbiol* **38**:335-47.
10. **Derré, I., G. Rapoport, and T. Msadek.** 1999. CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* **31**:117-132.
11. **Doyle, M. P., K. A. Glass, J. T. Beery, G. A. Garcia, D. J. Pollard, and R. D. Schultz.** 1987. Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. *Appl Environ Microbiol* **53**:1433-8.
12. **Ekaza, E., J. Teyssier, S. Ouahrani-Bettache, J. P. Liautard, and S. Kohler.** 2001. Characterization of *Brucella suis clpB* and *clpAB* mutants and participation of the genes in stress responses. *J Bacteriol* **183**:2677-81.
13. **Eriksson, M. J., and A. K. Clarke.** 1996. The heat shock protein ClpB mediates the development of thermotolerance in the cyanobacterium *Synechococcus sp.* strain PCC 7942. *J Bacteriol* **178**:4839-46.
14. **Fedhila, S., T. Msadek, P. Nel, and D. Lereclus.** 2002. Distinct *clpP* genes control specific adaptive responses in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol* **184**:5554-62.
15. **Fleming, D. W., S. L. Cochi, K. L. MacDonald, J. Brondum, P. S. Hayes, B. D. Plikaytis, M. B. Holmes, A. Audurier, C. V. Broome, and A. L. Reingold.** 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N Engl J Med* **312**:404-7.
16. **Gahan, C. G., J. O'Mahony, and C. Hill.** 2001. Characterization of the *groESL* operon in *Listeria monocytogenes*: utilization of two reporter systems (*gfp* and *hly*) for evaluating *in vivo* expression. *Infect Immun* **69**:3924-32.

17. **Gaillot, O., E. Pellegrini, S. Bregenholt, S. Nair, and P. Berche.** 2000. The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **35**:1286-94.
18. **Gibson, T. J.** 1984. Studies on the Epstein-Barr virus genome. Ph.D. thesis. University of Cambridge, Cambridge, UK.
19. **Glaser, P., L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, A. Amend, F. Baquero, P. Berche, H. Bloecker, P. Brandt, T. Chakraborty, A. Charbit, F. Chetouani, E. Couve, A. de Daruvar, P. Dehoux, E. Domann, G. Dominguez-Bernal, E. Duchaud, L. Durant, O. Dussurget, K. D. Entian, H. Fsihi, F. G. Portillo, P. Garrido, L. Gautier, W. Goebel, N. Gomez-Lopez, T. Hain, J. Hauf, D. Jackson, L. M. Jones, U. Kaerst, J. Kreft, M. Kuhn, F. Kunst, G. Kurapkat, E. Madueno, A. Maitournam, J. M. Vicente, E. Ng, H. Nedjari, G. Nordsiek, S. Novella, B. de Pablos, J. C. Perez-Diaz, R. Purcell, B. Remmel, M. Rose, T. Schlueter, N. Simoes, A. Tierrez, J. A. Vazquez-Boland, H. Voss, J. Wehland, and P. Cossart.** 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**:849-52.
20. **Goloubinoff, P., A. Mogk, A. P. Zvi, T. Tomoyasu, and B. Bukau.** 1999. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:13732-7.
21. **Gottesman, S., S. Wickner, and M. R. Maurizi.** 1997. Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes & Development* **11**:815-823.
22. **Grandvalet, C., P. Servant, and P. Mazodier.** 1997. Disruption of *hspR*, the repressor gene of the *dnaK* operon in *Streptomyces albus* G. *Molecular Microbiology* **23**:77-84.
23. **Gravesen, A., K. Sorensen, F. M. Aarestrup, and S. Knochel.** 2001. Spontaneous nisin-resistant *Listeria monocytogenes* mutants with increased expression of a



- putative penicillin-binding protein and their sensitivity to various antibiotics. *Microb Drug Resist* 7:127-35.
24. **Gray, C. G., S. C. Cowley, K. K. Cheung, and F. E. Nano.** 2002. The identification of five genetic loci of *Francisella novicida* associated with intracellular growth. *FEMS Microbiol Lett* 215:53.
  25. **Hanawa, T., M. Fukuda, H. Kawakami, H. Hirano, S. Kamiya, and T. Yamamoto.** 1999. The *Listeria monocytogenes* DnaK chaperone is required for stress tolerance and efficient phagocytosis with macrophages. *Cell Stress Chaperones* 4:118-28.
  26. **Hava, D. L., and A. Camilli.** 2002. Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol Microbiol* 45:1389-406.
  27. **Hensel, M., J. E. Shea, C. Gleeson, M. D. Jones, E. Dalton, and D. W. Holden.** 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* 269:400-3.
  28. **Hirata, H., T. Fukazawa, S. Negoro, and H. Okada.** 1986. Structure of a -galactosidase gene of *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Bacteriology* 166:722-7.
  29. **Hubel, A., S. Krobitch, A. Horauf, and J. Clos.** 1997. *Leishmania major* Hsp100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite. *Mol Cell Biol* 17:5987-95.
  30. **Ingmer, H., F. K. Vogensen, K. Hammer, and M. Kilstrup.** 1999. Disruption and analysis of the *clpB*, *clpC*, and *clpE* genes in *Lactococcus lactis*: ClpE, a new Clp family in gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 181:2075-83.
  31. **Johansson, J., P. Mandin, A. Renzoni, C. Chiaruttini, M. Springer, and P. Cossart.** 2002. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 110:551-61.

32. **Kim, K. I., K. M. Woo, I. S. Seong, Z. W. Lee, S. H. Baek, and C. H. Chung.** 1998. Mutational analysis of the two ATP-binding sites in ClpB, a heat shock protein with protein-activated ATPase activity in *Escherichia coli*. *Biochem J* **333** ( Pt 3):671-6.
33. **Kim, Y. I., I. Levchenko, K. Fraczkowska, R. V. Woodruff, R. T. Sauer, and T. A. Baker.** 2001. Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase. *Nat Struct Biol* **8**:230-3.
34. **Krobitsch, S., S. Brandau, C. Hoyer, C. Schmetz, A. Hubel, and J. Clos.** 1998. *Leishmania donovani* heat shock protein 100. Characterization and function in amastigote stage differentiation. *J Biol Chem* **273**:6488-94.
35. **Krobitsch, S., and J. Clos.** 1999. A novel role for 100 kD heat shock proteins in the parasite *Leishmania donovani*. *Cell Stress Chaperones* **4**:191-8.
36. **Lau, G. W., S. Haataja, M. Lonetto, S. E. Kensit, A. Marra, A. P. Bryant, D. McDevitt, D. A. Morrison, and D. W. Holden.** 2001. A functional genomic analysis of type 3 *Streptococcus pneumoniae* virulence. *Mol Microbiol* **40**:555-71.
37. **Lemos, J. A., and R. A. Burne.** 2002. Regulation and Physiological Significance of ClpC and ClpP in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **184**:6357-66.
38. **Lindquist, S., and G. Kim.** 1996. Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:5301-6.
39. **Liu, S., J. E. Graham, L. Bigelow, P. D. Morse, 2nd, and B. J. Wilkinson.** 2002. Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Appl Environ Microbiol* **68**:1697-705.
40. **Lupas, A., M. Van Dyke, and J. Stock.** 1991. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**:1162-4.

41. **Mei, J. M., F. Nourbakhsh, C. W. Ford, and D. W. Holden.** 1997. Identification of *Staphylococcus aureus* virulence genes in a murine model of bacteraemia using signature-tagged mutagenesis. *Mol Microbiol* **26**:399-407.
42. **Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
43. **Motohashi, K., Y. Watanabe, M. Yohda, and M. Yoshida.** 1999. Heat-inactivated proteins are rescued by the DnaK.J-GrpE set and ClpB chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:7184-9.
44. **Msadek, T., V. Dartois, F. Kunst, M.-L. Herbaud, F. Denizot, and G. Rapoport.** 1998. ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol. Microbiol.* **27**:899-914.
45. **Msadek, T., F. Kunst, A. Klier, G. Rapoport, and R. Dedonder.** 1990. The Deg signal transduction pathway: mutations and regulation of expression of *degS*, *degU* and *degQ*, p. 245-255. In M. M. Zukowski, A. T. Ganesan, and J. A. Hoch (ed.), *Genetics and Biotechnology of Bacilli*, vol. 3. Academic Press, San Diego.
46. **Nair, S., I. Derre, T. Msadek, O. Gaillot, and P. Berche.** 2000. CtsR controls class III heat shock gene expression in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **35**:800-11.
47. **Nair, S., C. Frehel, L. Nguyen, V. Escuyer, and P. Berche.** 1999. ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology* **31**:185-196.
48. **Nair, S., E. Milohanic, and P. Berche.** 2000. ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **68**:7061-8.
49. **Nieto-Sotelo, J., L. M. Martinez, G. Ponce, G. I. Cassab, A. Alagon, R. B. Meeley, J. M. Ribaut, and R. Yang.** 2002. Maize HSP101 plays important roles

- in both induced and basal thermotolerance and primary root growth. *Plant Cell* **14**:1621-33.
50. **Pagan, R., S. Condon, and F. J. Sala.** 1997. Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **63**:3225-32.
  51. **Park, S. K., K. I. Kim, K. M. Woo, J. H. Seol, K. Tanaka, A. Ichihara, D. B. Ha, and C. H. Chung.** 1993. Site-directed mutagenesis of the dual translational initiation sites of the *clpB* gene of *Escherichia coli* and characterization of its gene products. *J Biol Chem* **268**:20170-4.
  52. **Parsell, D. A., A. S. Kowal, and S. Lindquist.** 1994. *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104 protein. Purification and characterization of ATP-induced structural changes. *J Biol Chem* **269**:4480-7.
  53. **Polissi, A., A. Pontiggia, G. Feger, M. Altieri, H. Mottl, L. Ferrari, and D. Simon.** 1998. Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **66**:5620-5629.
  54. **Porankiewicz, J., and A. K. Clarke.** 1997. Induction of the heat shock protein ClpB affects cold acclimation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* **179**:5111-7.
  55. **Porankiewicz, J., J. Wang, and A. K. Clarke.** 1999. New insights into the ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond. *Mol Microbiol* **32**:449-58.
  56. **Portnoy, D. A., V. Auerbuch, and I. J. Glomski.** 2002. The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *J Cell Biol* **158**:409-14.
  57. **Qoronfleh, M. W., C. A. Bortner, P. Schwartzberg, and B. J. Wilkinson.** 1998. Enhanced levels of *Staphylococcus aureus* stress protein GroEL and DnaK homologs early in infection of human epithelial cells. *Infect Immun* **66**:3024-7.

58. **Queitsch, C., S. W. Hong, E. Vierling, and S. Lindquist.** 2000. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**:479-92.
59. **Rouquette, C., C. de Chastellier, S. Nair, and P. Berche.** 1998. The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages. *Molecular Microbiology* **27**:1235-1246.
60. **Rouquette, C., M.-T. Ripio, E. Pellegrini, J.-M. Bolla, R. I. Tascon, J.-A. Vázquez-Boland, and P. Berche.** 1996. Identification of a ClpC ATPase required for stress tolerance and *in vivo* survival of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology* **21**:977-987.
61. **Rowan, N. J., and J. G. Anderson.** 1998. Effects of above-optimum growth temperature and cell morphology on thermotolerance of *Listeria monocytogenes* cells suspended in bovine milk. *Appl Environ Microbiol* **64**:2065-71.
62. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual*, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
63. **Sanchez, Y., and S. L. Lindquist.** 1990. HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* **248**:1112-5.
64. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.
65. **Schirmer, E. C., J. R. Glover, M. A. Singer, and S. Lindquist.** 1996. HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* **21**:289-296.
66. **Squires, C., and C. L. Squires.** 1992. The Clp proteins: proteolysis regulators or molecular chaperones? *J. Bacteriol.* **174**:1081-1085.

67. **Squires, C. L., S. Pedersen, B. M. Ross, and C. Squires.** 1991. ClpB is the *Escherichia coli* heat shock protein F84.1. *J. Bacteriol.* **173**:4254-4262.
68. **Tabor, S., and C. C. Richardson.** 1987. DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:4767-4771.
69. **Turner, A. K., M. A. Lovell, S. D. Hulme, L. Zhang-Barber, and P. A. Barrow.** 1998. Identification of *Salmonella typhimurium* genes required for colonization of the chicken alimentary tract and for virulence in newly hatched chicks. *Infect Immun* **66**:2099-106.
70. **Viala, J., and P. Mazodier.** 2002. ClpP-dependent degradation of PopR allows tightly regulated expression of the *clpP3 clpP4* operon in *Streptomyces lividans*. *Mol Microbiol* **44**:633-43.
71. **Viala, J., G. Rapoport, and P. Mazodier.** 2000. The *clpP* multigenic family in *Streptomyces lividans*: conditional expression of the *clpP3 clpP4* operon is controlled by PopR, a novel transcriptional activator. *Mol Microbiol* **38**:602-12.
72. **Vicente, M. F., F. Baquero, and J. C. Perez-Diaz.** 1985. Cloning and expression of the *Listeria monocytogenes* haemolysin in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **30**:77-79.
73. **Woo, K. M., K. I. Kim, A. L. Goldberg, D. B. Ha, and C. H. Chung.** 1992. The heat-shock protein ClpB in *Escherichia coli* is a protein-activated ATPase. *J Biol Chem* **267**:20429-34.
74. **Yamamoto, T., H. Sashinami, A. Takaya, T. Tomoyasu, H. Matsui, Y. Kikuchi, T. Hanawa, S. Kamiya, and A. Nakane.** 2001. Disruption of the genes for ClpXP protease in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in persistent infection in mice, and development of persistence requires endogenous gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* **69**:3164-74.

75. **Yuan, G., and S. L. Wong.** 1995. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* *groE* regulatory mutants: evidence for *orf39* in the *dnaK* operon as a repressor gene in regulating the expression of both *groE* and *dnaK*. *Journal of Bacteriology* **177**:6462-8.
76. **Yuan, G., and S. L. Wong.** 1995. Regulation of *groE* expression in *Bacillus subtilis*: the involvement of the  $\lambda$ -like promoter and the roles of the inverted repeat sequence (CIRCE). *Journal of Bacteriology* **177**:5427-33.
77. **Zolkiewski, M.** 1999. ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation. A novel multi-chaperone system from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274**:28083-6.

**TABLE 1. Strains used in this study**

Strains	Genotype	Source/Reference
<i>Listeria</i>		
<i>monocytogenes</i>		
LO28	virulent <i>L. monocytogenes</i> reference strain	(72)
LM 2000	$\Delta clpB$	This study
LM 2001	$\Delta ctsR::aphA3$	This study
<i>Bacillus subtilis</i>		
168	<i>trpC2</i>	Laboratory stock
QB4991	<i>trpC2 ctsR amyE::('lacZ aphA3)</i>	(10)
QB8059	<i>trpC2 amyE::(clpB'-bgaB cat) ctsR</i>	pDL73/74 QB4991
QB8060	<i>trpC2 amyE::(clpB'-bgaB cat) ctsR thrC::(pxylctsRLmo spc)</i>	pxyl59/60 QB8059



**TABLE 2. Plasmids used in this study**

Plasmid	Description	Source or Reference
pMAD	pE194 derivative with a thermosensitive origin of replication for deletion replacement of genes in Gram-positive bacteria	M. Arnaud and M. Débarbouillé, unpublished
pMAD $\Delta clpB$	pMAD derivative, for deletion replacement of the <i>L. monocytogenes clpB</i> gene	This study
pMAD $\Delta ctsR$	pMAD derivative, for deletion replacement of the <i>L. monocytogenes ctsR</i> gene	This study
pDL	Integrative plasmid for constructing transcriptional fusions with the <i>B. stearothermophilus bgaB</i> gene	(75)
pDL73/74	pDL derivative carrying a <i>clpB'</i> - <i>bgaB</i> fusion	This study
pXT	plasmid allowing integration at the <i>thrC</i> locus and expression from the P <sub>xylA</sub> xylose-inducible promoter	(9)
pxyl59/60	pXT derivative carrying the <i>ctsR</i> coding sequence of <i>L. monocytogenes</i>	(46)

## LEGENDS

**FIG. 1.** Alignment of the ClpB amino acid sequence of *L. monocytogenes* with those of *E. coli* and *L. lactis*. Numbers indicate positions in the amino acid sequence. Identical residues are shaded. The conserved nucleotide-binding regions are boxed. Conserved Walker motifs (A Box, B Box) and predicted ClpN and coiled-coil motifs are overlined.

**FIG. 2.** *clpB* is negatively regulated by CtsR in the heterologous host *B. subtilis*. Levels of expression of *clpB'*-*bgaB* (strain QB8060, *clpB'*-*bgaB* *ctsR* *pxylctsRLmo*) in LB medium at 37°C in the presence (□) or absence of xylose (■) are shown. Symbols indicate - galactosidase activities expressed as Miller units/mg protein as a function of time.

**FIG. 3.** (A) Primer extension analysis of *clpB* expression at 37°C (lanes 1, 2) or following a 10 minute heat-shock at 42°C (lanes 3, 4). Total RNA (20 µg) extracted from *L. monocytogenes* L028 (lanes 1, 3) and LM2001 ( *ctsR*) (lanes 2, 4), was used as a template for reverse transcriptase. The corresponding DNA sequence is shown on the left. (B) Nucleotide sequence of the *L. monocytogenes* L028 *clpB* promoter region. Potential -35 and -10 promoter sequences are overlined; the transcriptional start site is indicated by +1; the CtsR direct-repeat operator sequence is indicated by arrows; the potential ribosome binding site (RBS) sequence is underlined; the translational start site is boxed, and the deduced amino acid sequence is indicated below the nucleotide sequence.

**FIG. 4.** (A) CtsR binds specifically to the *clpB* promoter region. DNA binding reactions were performed with radiolabelled DNA fragments (10000 cpm) corresponding to the *clpB* promoter region. Lane 1, no protein; lane 2, 7ng; lane 3, 70ng; lane 4, 700ng. (B, C)

DNase I footprinting analysis of CtsR binding to the *clpB* promoter region. Each lane contains 50000 cpm of radiolabelled DNA fragment corresponding to the non-template strand (B) or the template strand (C) of the *L. monocytogenes clpB* promoter region. Fragments were incubated with increasing amounts of purified CtsR: lane 1, no protein; lane 2, 35ng; lane 3, 350ng; lane 4, 3500ng. Lane A+G: Maxam and Gilbert reactions of the corresponding DNA fragment. Brackets indicate regions protected by CtsR. (D) Nucleotide sequence of the *clpB* promoter region. The DNase I protected area is boxed and arrows indicate the CtsR direct-repeat recognition sequence. Positions are numbered relative to the translational initiation codon.

**FIG. 5.** ClpB is involved in virulence of *L. monocytogenes*. Survival curves of Swiss mice after intravenous inoculation with  $5 \cdot 10^5$  bacteria of the wild type L028 (●) or the mutant strain *clpB* (■).

**FIG. 6.** (A) ClpB is not required for stress resistance. The L028 wild type strain and the *clpB* mutant strain were grown exponentially at 37°C with aeration in BHI medium until the OD<sub>600</sub> reached 0.3. The culture was divided on two and one-half was subjected to a stress. Stresses assayed were temperature shifts to 42°C, 44°C, 48°C or 55°C, addition of puromycin to a final concentration of: 15 (pmc15), 30 (pmc30) or 60 (pmc60) µg/ml, 0.01% SDS or 2% NaCl. Values represent the percent of cells with respect to the control culture performed in the absence of stress (grown in BHI at 37°C), two hours after the stress was applied. In all cases, there was no significant difference in the growth curves between the wild type and the mutant strain. (B) ClpB is not involved in adaptation to cold stress. Cultures of wild type (■) and *clpB* (●) strains were inoculated at 5°C with aeration, and growth was followed for 4 days.

**FIG. 7** ClpB is required for induced thermotolerance. Cultures of wild type L028 and *clpB* mutant strains were grown exponentially until OD<sub>600</sub> reached 0.3. One-half of the culture was preincubated for 20 minutes at the non-lethal temperature of 48°C while the other was maintained at 37°C. After preincubation, both cultures were then incubated at 60°C and cell survival was evaluated by plating diluted-aliquots. White bars indicate cfu values before incubation at 60°C and black bars after 5 minutes of stress.

clpN1

Eco MRLDRLNKKFSLALADAQSLAIGHENDPTEPLRLMSALLNDSGGSVSPILLTSAGIQAQQLRTDINQMLNRLPQVEGQSSDQVQP--SQDLKRVLNLCRSLA 98  
 Lmo MDLQNTFQQVQDTIADAQSLAASEIGSDVVAHFFKVILLFSSDFAKRVYDVAVTVDDALMKVIEITLKRIPVSSGGVNYGQANSCALPOLMRDALKRQ 99  
 Lla MDIEKCTTKMLALSSAQDIKAVREHGVSEVMDKRIIVFVNSVQASPTNDLSDLDQYINLIEKIIDKINSVEGSMITVGGQLSFDLFOIFTEAKKR 99

clpN2

Eco KRKEDVFEISLAFVLAALSSRGTLDADIKAAQMLTASHTOAIEMRGGESVNDQDAEQQRQALKYTIIDLTERAEQGGKLDPVIGRDEEIKRTDQVLR 197  
 Lmo QLEDDVFTSEHLIAVMDQKSNPTIARLNQKKAHQKKEALADNGGKPVTSQAAEENYALTYGDELVREYVSGKLDPVIGRDAEIRNVIRLSRK 199  
 Lla KRKGDVLDTEHILALFELKMPLTSTVSEGLTWAKAQAIEKSRGGDQVTSQAAEETVQALSYGDELVAQVSGKLDPVIGRDEEIRNVIRVLSRK 199

A box

Eco IKKNPVLI GEPGVGKTAIVEGLAQRITINGEVPSEKLRVRLALDMGALVAGAKYRGEFEEERLKAVLDLAQESNVILFIDELSTVVGAKADGAMDAGN 297  
 Lmo IKKNPVLI GEPGVGKTAIVEGLAQRIVREKDVPEGLKDETIISLDLDELVAGAKYRGEFEEERLKAVLDVKNVSDGQIILFIDESTIVGAGKTDGAMDAGN 299  
 Lla IKKNPVLI GEPGVGKTAIVEGLAQRIVREKDVPEKNDFTIISLDMGALVAGAKYRGEFEEERLKAVLNEYKKSQGQIILFIDELSTVVGAKTDSGADGN 299

B box 1

B box 2

Eco MLKPLARGELHCIGATTLDEYRQYIEKDAALERRPQKVFVPEPVVEDTINLGLKERTSLEHHVQIDDPALVAAATLSRYTAPKQLPKRAIDLIDEA 397  
 Lmo MLKPLARGELHCIGATTLDEYRQYIEKDAALERRPQKVLVPEPVEDTISILGLKERTFEIENGVININDALVAAAASLNRYITDORFLPKRAIDLVDIA 399  
 Lla MLKPLARGELHCIGATTLDEYRQYIEKDAALERRPQKVLVPEPVEDTISILGLKERTFEIENGVININDALVAAATLSKRYITDORFLPKRAIDLVDIA 399

coiled-coil

Eco ASSRFDIDSPEELDRLDHRIIDLALDQALMKEKQASKRRLQWENELDQKERTYSIHEEYVHEASLSTGTOTIKALHDAIAIADARRVCDLAR 497  
 Lmo CATIRVEIDSPEELDVTIKVQLEIEEAALKKEDDPSERKLEILOELADYKTEAQQKSKWSEKREKSKTAEVSEQIDSLHELEEAASNTYDLSK 499  
 Lla SATIRVEHMSPEELDQANRRVQLEIEEAALKKEDDPSKRRLKTIROSTAKLRSENQKLAQWAEAKKRVGNISKINELSHARHELEEAQEDNLSK 499

A box

B box

Eco VNRPIQSFPLGPTGVGKTELAKALANFDSDSAPVVRIDMSEPMKRSVSRVLGAPPVGYVGYEGGYTEAVRRPYSWILLDEYKAMPDVPFNILLQV 693  
 Lmo VNRPIQSFPLGPTGVGKTELAKALANFDSESDHVRIDMSEYMKRSVSRVLGAPPVGYVYEGGQLTEAVRNPYSVILLDEYKAMPDVPFNILLQV 699  
 Lla VNRPIQSFPLGPTGVGKTELAKALANFDSEKHMVRIDMSEYMKRSVSRVLGAPPVGYVYEGGQLTEAVRNPYSVILLDEYKAMPDVPFNILLQV 696

Eco LDDGRLTDSQGRVDFKNTVIMTSMVSDLIGERFEEID--YAHMKEVLLGVVSHNPPPEFNRIDEVVVHPLSEQHNSAQIQLRKLYKLEERY 791  
 Lmo LDDGRLTDSQGRVDFKNTVIMTSMVSNLLERFEEIGEISPELSSDVGQIQSEPKPEFLNRIDDHILFKPLQADIRQIVEVVERLQIRLADQEI 798  
 Lla LDDGRLTDSQGRVDFKNTVIMTSMVSDQYALDQVHEGGEISPELSSDVGQIRANFKPEFLNRIDDHILFKPLQADIRQIVEVVERLQIRLADQEI 796

Eco EEESEEAELKLLSINCPDPTVYGRFLKRIQQQENPLAQQQLSGELVGRKVRILEVNSDRVAVQ 857

Figure 1

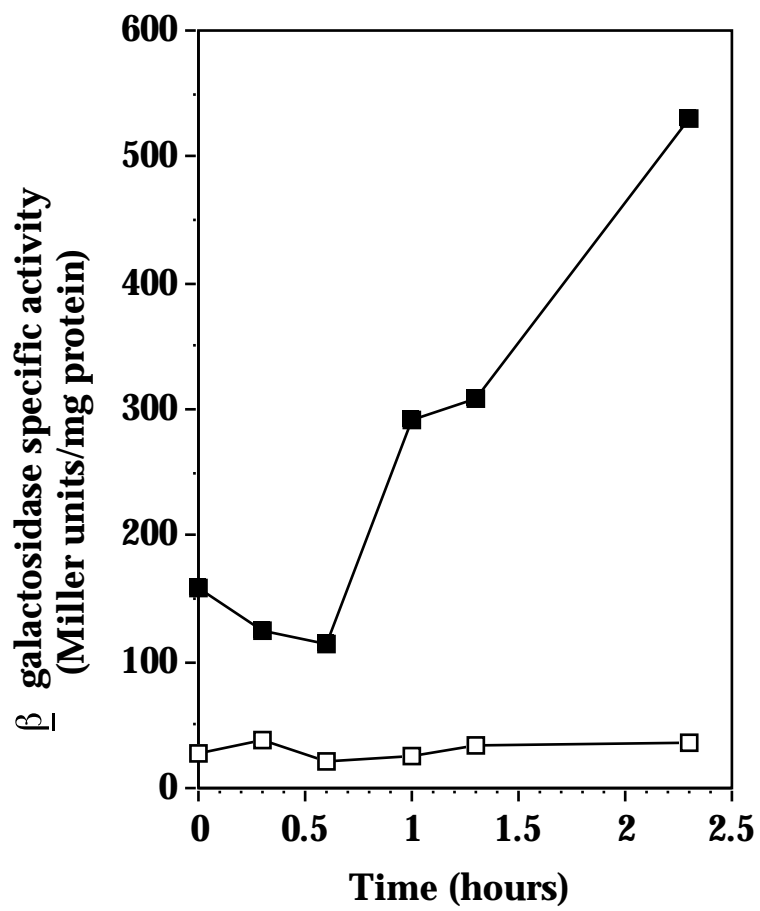


Figure 2

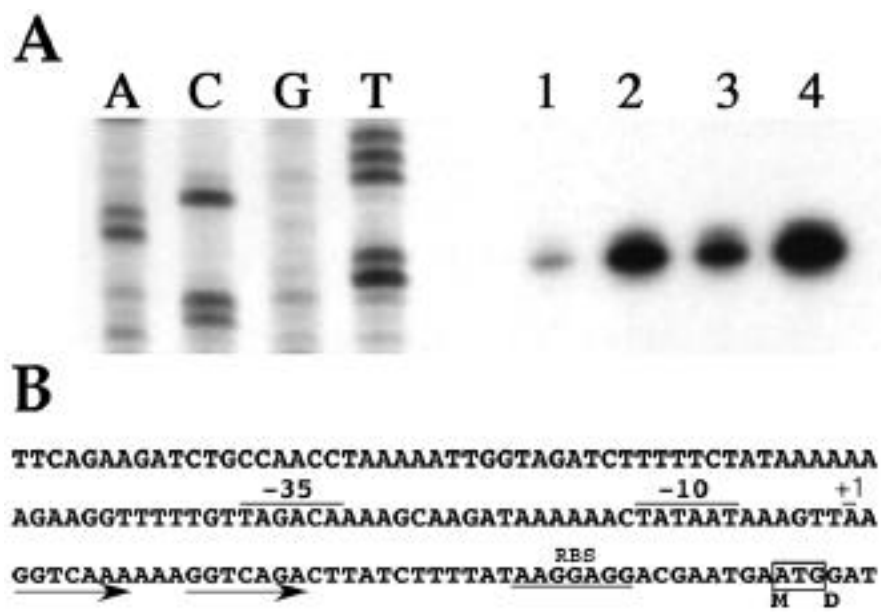


Figure 3

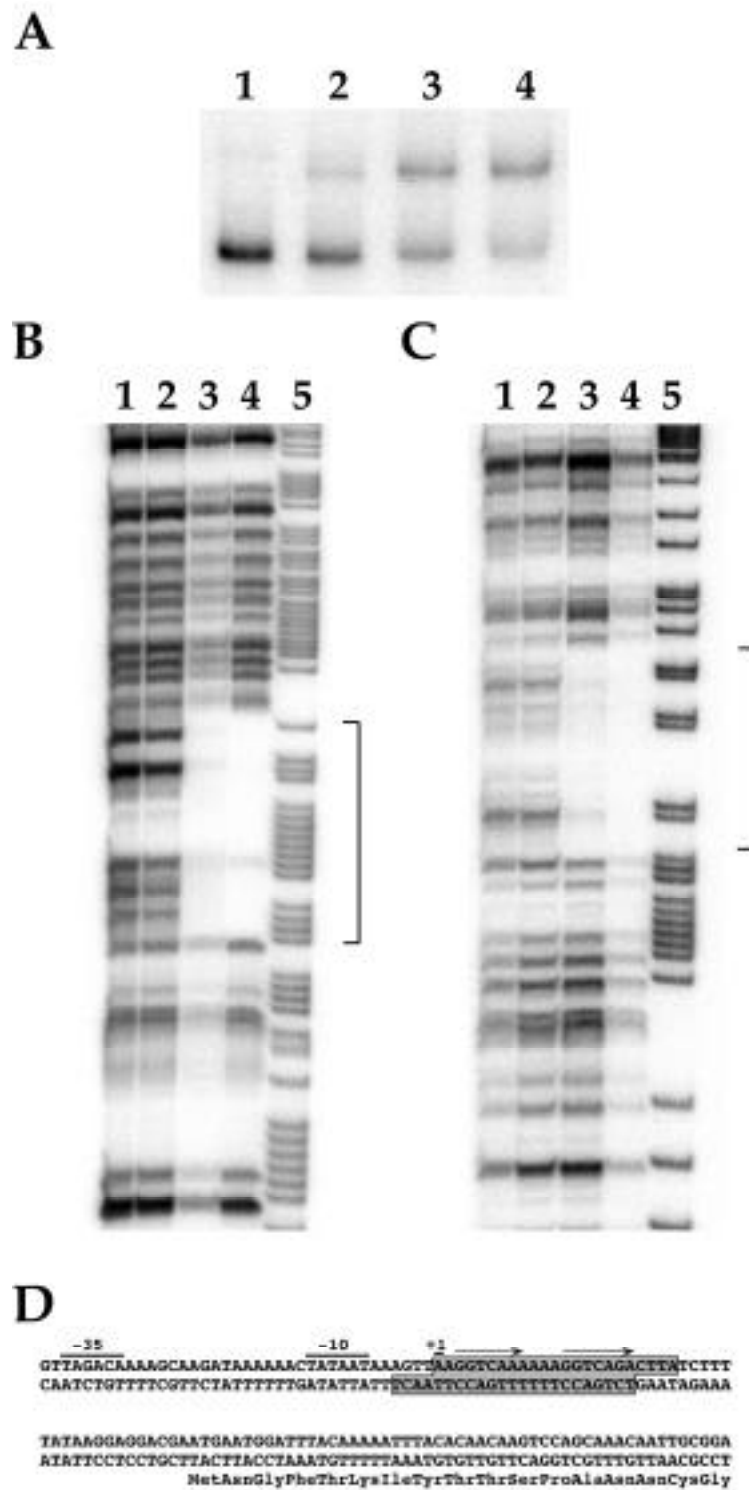


Figure 4



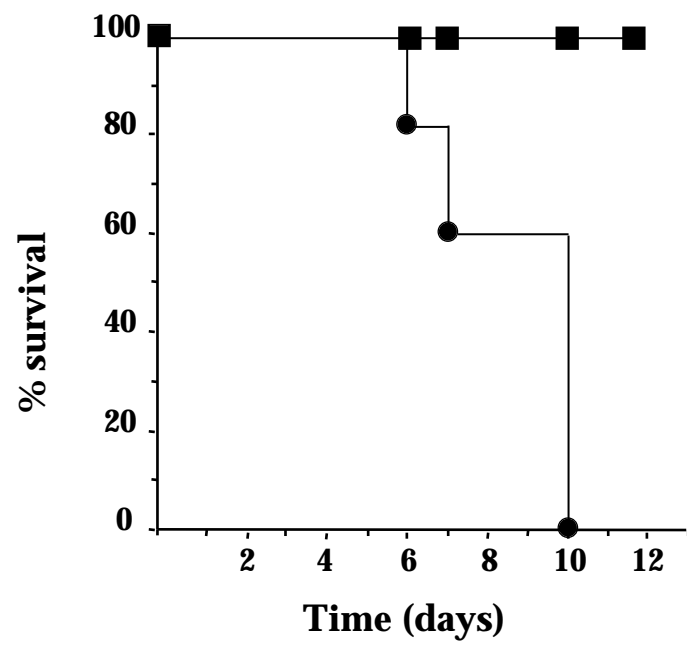


Figure 5

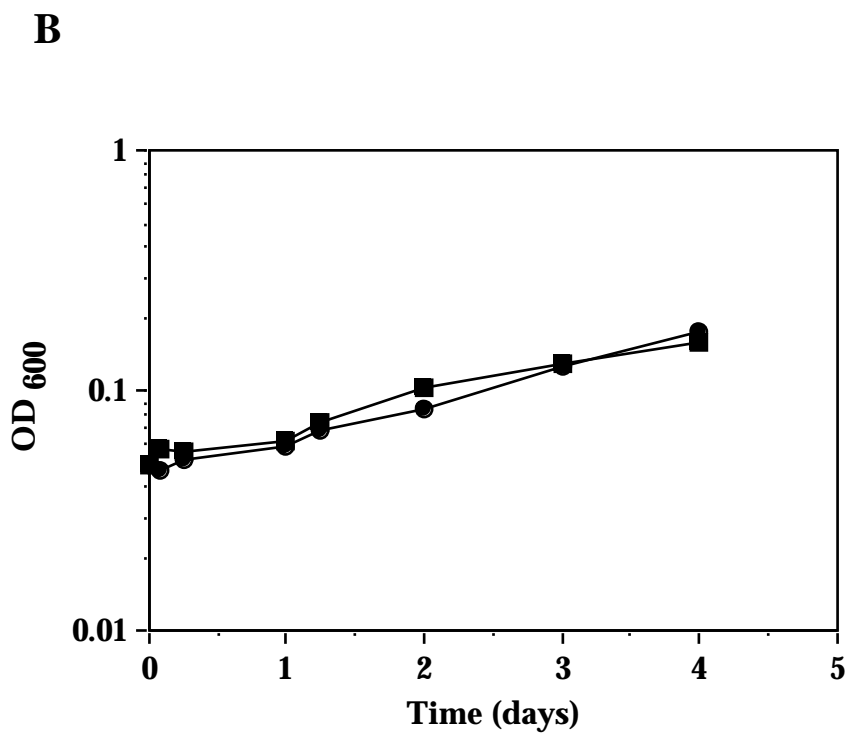
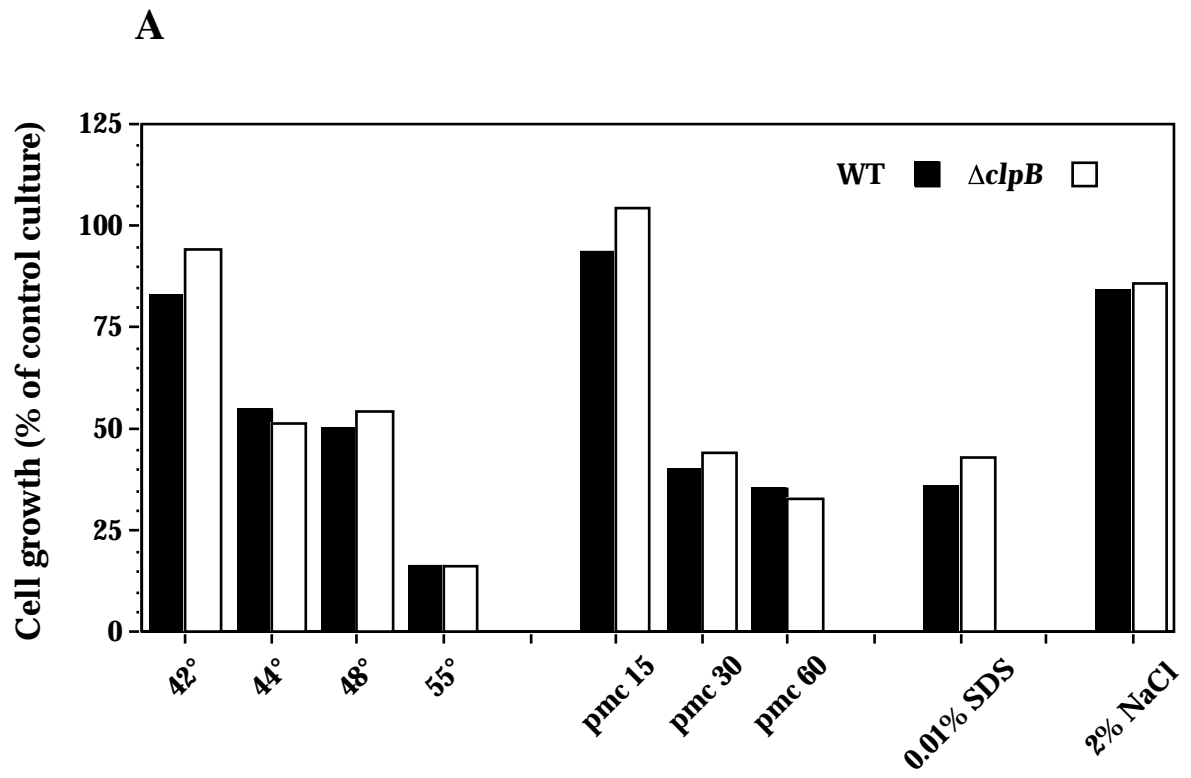


Figure 6

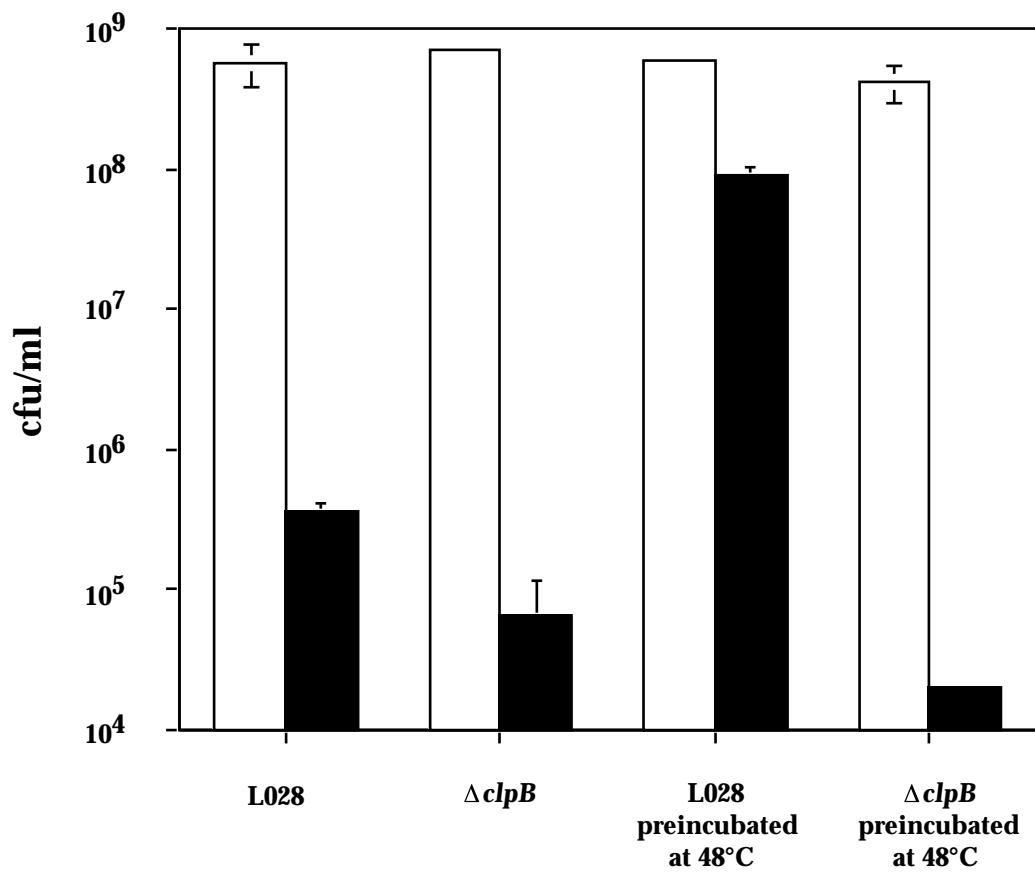


Figure 7

## **Annexe 5**

**HrcA, un régulateur largement répandu dans le monde bactérien.**

## Le système HrcA/CIRCE est largement répandu dans le monde bactérien

Espèce	Gènes cibles putatifs	motif CIRCE
Acetobacter subgen. Acetobacter	groESL	CTGGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Acholeplasma laidlawii	hrcA grpE dnaK	TTGGCACTA -N9- GAGTGCTAA
	"	TTAGCACAT -N9- CAGTGCTAT
Agrobacterium tumefaciens	groE	CTGGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Alcaligenes xylosoxydans	rpoH	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Anabaena sp	groE	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Bacillus halodurans	groESL	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
	hrcA grpE dnaK	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
	htpG	TTAGCACTC -N9- AAGTGCTAA
	TCS	CTAGGACTC -N9- GAGTGCCAA
Bacillus sp. MS	groESL	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Bacillus stearothermophilus	groESL	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
	hrcA grpE dnaK	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
	groESL	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
	hrcA grpE dnaK	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Bifidobacterium adolescentis	groESL	TTGGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Bifidobacterium denticolens	groESL	TTGGCAGTC -N9- GAGTGCTAA
Bifidobacterium inopinatum	groESL	TTGGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Bifidobacterium longum NCC2705	cspa-groel	TTGGCACTC -N9- GAGTGCTAA
	hrcA grpE dnaK	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
	groes??	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Bordetella pertussis	groESL	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Bradyrhizobium japonicum	groESL	CTAGCACTC -N9- GACTGCTAA
	groESL	TTAGCACTC -N9- GATTGCTAA
	groESL2	TCAGCACTC -N9- GACTGCTAT
Brevibacillus choshinensis	groESL	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Brucella abortus	groESL	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Brucella melitensis strain 16M	groESL	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Burkholderia pseudomallei	α <sup>32</sup> (rpoD)	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Caulobacter crescentus	groESL	TTGGCACTC -N9- GACTGCTAA
Chlamydia muridarum	hrcA grpE dnaK	CTAGCACTC -N9- GAGCGCTAA
Chlamydia pneumoniae	groESL	TTAGCACTT -N9- GAGTGCTAA
Chlamydia trachomatis	hrcA grpE	CTAGCACTC -N9- GAGCGCTAA
Chlamydomphila caviae	groESL (hypAB)	GTAGCACTT -N9- AAGTGCTAA
Chlamydomphila pneumoniae	groESL	TTAGCACTC -N9- AAGTGCTAA
Chlorobium tepidum	groESL	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Chromatium vinosum	groESL	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Clostridium acetobutylicum	groESL	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
	hrcA grpE dnaKJ	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
	htpG	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Clostridium botulinum	groESL	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Clostridium perfringens	groESL	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
	hrcA grpE dnaKJ	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
	htpG	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Clostridium thermocellum	groESL	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Corynebacterium efficiens	groEL	CTGGCACTC -N9- AAGTGCTAA
	"	CTAGCACTC -N9- GAGTGCAAG
Corynebacterium glutamicum ATCC 13032	groESL	CTGGCACTC -N9- GAGTGCCAA
	groEL	TTGGCACTC -N9- GAGTGCTAA
	"	CTAGCACTC -N9- GAGTGCAAG
Cyanothece sp. PCC 8801	groESL	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Enterococcus faecalis ATCC 29212	groESL	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Erysipelothrix rhusiopathiae	dnaJ	TTAGCACTC -N9- AATTGCTAA
Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum	groESL	TTAGCACTC -N9- AAGTGCTAA
	groESL	TTAGCACTT -N9- GAGTGCTAA
	hrcA grpE dnaKJ	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
	groEL	TTGGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Gardnerella vaginalis	groESL	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Geobacillus thermoglucosidasius	hrcA grpE dnaK	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
	groESL	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
Holospira obtusa	groESL	TTAGCACTC -N9- GACTGCTAA
Lactobacillus acidophilus	groESL	TTAGCACTT -N9- GAGTGCTAA
	"	TTAGCACTT -N9- GAGTGCTAA
Lactobacillus helveticus	groESL	TTAGCACTT -N9- GAGTGCTAA
	"	TTAGCACTA -N9- AAGTGCTAA
Lactobacillus johnsonii	groESL	TTAGCACTC -N9- AAGTGCTAA
	"	TTAGCACTT -N9- GAGTGCTAA

<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>hrcA</i>	TTAGCACTC	-N9-	AAGTGCTAA
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	<i>hrcA</i>	TTAGCACTT	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Lactobacillus zeae</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTT	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	<i>dnaJ</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
	<i>hrcA</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
	"	TTAGCACTT	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Leptospira interrogans</i>	<i>hrcA</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCCAG
<i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>copenhageni</i>	<i>groESL</i>	TAAGCACTC	-N9-	TAGTGCTAA
<i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>lai</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC	-N9-	AAGTGCTTG
	"	TAAGCACTC	-N9-	TAGTGCTAA
	<i>hrcA</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCCAG
	<i>hsp20</i>	TTAGCAATC	-N9-	AAGTGCTAA
	"	TTGGCAATC	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Listeria innocua</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hrcA</i>	TTAGCACTC	-N9-	AAGTGCTAA
	<i>groESL</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>hrcA</i>	TTAGCACTC	-N9-	AAGTGCTAA
	<i>groESL1</i>	TTGGCACTC	-N9-	GAGTGCCAA
	<i>groESL2</i>	CTAGCACTC	-N9-	GAGTGCCAA
	<i>groESL3</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
	<i>groESL4</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Mesorhizobium loti</i> plasmid <i>pMLa</i>	<i>groESL5</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Mesorhizobium loti</i> R7A symbiosis island	<i>groESL6</i>	CAAGCACTT	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Methylovorus</i> sp. <i>SS1</i>	<i>rpoH</i>	CTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Mycobacterium avium</i>	<i>groESL</i>	CTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAG
<i>Mycobacterium bovis</i> <i>bcg</i>	<i>MbaA-antigenA (groEL)</i>	CTTGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
	"	TTGGCACTC	-N9-	GAGTCGTAG
	<i>MPB57 (groES)</i>	CTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAG
<i>Mycobacterium leprae</i>	<i>ML0180 (armX)</i>	CTGGCACTC	-N9-	AAGTGCTAG
	<i>groESL</i>	CTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAG
<i>Mycobacterium leprae</i> strain <i>TN</i>	<i>groEL2</i>	CTTGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
	"	CTGGCACTC	-N9-	GAGTGCCAG
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	<i>groEL</i>	CTTGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
	"	TTGGCACTC	-N9-	GAGTGCTAG
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>groES-groEL2</i>	CTTGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
	"	TTGGCACTC	-N9-	GAGTGCTAG
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>H37Rv</i>	<i>Rv0991 (armX)</i>	TTAGCACTC	-N9-	AAGTGCTAG
<i>Mycoplasma arthritidis</i>	<i>dnaK</i>	TTAGCACTT	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Mycoplasma capricolum</i>	<i>clpB</i>	TTAGCAATT	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>clpB</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
	<i>dnaK</i>	TTAGCACTC	-N9-	AAGTGCTAA
	<i>tig</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>dnaK</i>	TTAGCACTC	-N9-	TAGTGCTAA
<i>Mycoplasma penetrans</i>	<i>MYPE4890</i>	TTAGCACTT	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>groESL</i>	TTAGCAGTT	-N9-	AAGTGCAAA
	<i>clpB</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
	<i>dnaK</i>	TTAGCACTT	-N9-	GAGTGCTAA
	<i>tig</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	<i>dnaK</i>	TTAGCACTT	-N9-	GAGTGCTAA
	<i>lon</i>	TTGGCACTC	-N9-	AAGTGCTAT
<i>Nostoc</i> sp. <i>PCC 7120</i>	<i>groEL2</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
	<i>groESL</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
	<i>alr4758</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
	<i>hrcA</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
	<i>htpG</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Oscillatoria</i> sp. <i>NKBG091600</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Paracoccus denitrificans</i>	<i>groESL</i>	TTGGCACTC	-N9-	GAGTGCCAA
<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>groEL</i>	TTTGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Ralstonia metallidurans</i>	<i>rpoH</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Ralstonia solanacearum</i> <i>GMI1000</i>	<i>rpoH</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>mopBA (groESL)</i>	TTGGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
	<i>groESL1</i>	CTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
	<i>groESL2</i>	CTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
	<i>groESL3</i>	TTGGCACTC	-N9-	GAGTGCCAC
	<i>groESL2?</i>	TTGGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>groESL</i>	CTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC	-N9-	GAGTGCTGA
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	<i>groESL</i>	TTGGCACTC	-N9-	GAGTGCTAA

		"	TTGGCACTC -N9- GAGTGCCAG
<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>palustris</i>	<i>groESL</i>	TTGGCACTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Rhodothermus</i>	<i>marinus</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Sinorhizobium</i>	<i>meliloti 1021</i>	<i>groESL1</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAG
<i>Sinorhizobium</i>	<i>meliloti plasmid pSymA</i>	<i>groESL2</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAG
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus subsp. aureus</i>	<i>hrcA grpE dnaKJ</i>	TTAGCACTC -N9- AAGTGCTAA
		<i>groESL</i>	TTAGCACTT -N9- GAGTGCTAA
<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis strain SR1</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTT -N9- GAGTGCTAA
<i>Streptococcus</i>	<i>agalactiae</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
		<i>hrcA grpE dnaKJ</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
		"	TTAGCAGTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Streptococcus</i>	<i>bovis</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Streptococcus</i>	<i>intermedius</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Streptococcus</i>	<i>mitis</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Streptococcus</i>	<i>mutans</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
		<i>hrcA grpE dnaKJ</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
		"	TTAGCAGTC -N9- GAGTGCTTA
<i>Streptococcus</i>	<i>oralis</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
		<i>hrcA grpE dnaKJ</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
		"	TTAGCACTT -N9- GAGTGCTAA
<i>Streptococcus</i>	<i>pyogenes</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
		<i>hrcA grpE dnaKJ</i>	TTAGCACTC -N9- GACTGCTAA
		"	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	<i>clpP</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
		<i>groESL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Streptococcus</i>	<i>sanguinis</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Streptomyces</i>	<i>albus G</i>	<i>hrcA-dnaJ2</i>	TTGGCACTC -N9- GAGTGCCAG
<i>Streptomyces</i>	<i>coelicolor</i>	<i>armX</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCCAG
		<i>groEL2</i>	CTTGCAGTC -N9- GAGTGCTAA
		<i>groES-EL1</i>	TTGGCACTC -N9- GAGTGCTAA
		"	CTGGCACTC -N9- GAGTGCCAA
		<i>hrcA-dnaJ2</i>	CTGGCACTC -N9- GAGTGCCAG
<i>Streptomyces</i>	<i>hygroscopicus</i>	<i>groEL2</i>	CTTGCAGTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Streptomyces</i>	<i>lividans</i>	<i>groEL2</i>	CTTGCAGTC -N9- GAGTGCTAA
		<i>groES-EL1</i>	TTGGCACTC -N9- GAGTGCTAA
		"	CTGGCACTC -N9- GAGTGCCAA
<i>Synechococcus</i>	<i>sp.</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Synechococcus</i>	<i>vulcanus</i>	<i>groES-EL1</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Synechocystis</i>	<i>sp.</i>	<i>groEL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
		<i>groEL2</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
		<i>groESL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Tetragenococcus</i>	<i>halophilus</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
		<i>hrcA grpE dnaK</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
		"	TTAGCACTT -N9- GAGTGCTAA
<i>Thermoanaerobacter</i>	<i>brockii</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Thermoanaerobacter</i>	<i>tengcongensis</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
		<i>hrcA grpE dnaKJ</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
	<i>thermophilic bacterium PS3</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Thermosynechococcus</i>	<i>elongatus</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Thermotoga</i>	<i>maritima</i>	<i>groESL</i>	TTAGCAGTC -N9- GAGTGCTAA
		<i>hrcA</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Ureaplasma</i>	<i>urealyticum</i>	<i>clpB</i>	TTAGCACTC -N9- AAGTGCTAA
		<i>dnaK</i>	TTAGCACTC -N9- AAGTGCCAA
<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	<i>groESL</i>	CTGGCAGTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris pv. campestris</i>	<i>groESL</i>	CTGGCAGTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris pv. phaseoli</i>	<i>groESL</i>	CTGGCAGTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Xylella</i>	<i>fastidiosa 9a5c</i>	<i>groESL</i>	TTAGCACTC -N9- GAGTGCTAA
<i>Zymomonas</i>	<i>mobilis</i>	<i>groESL</i>	TTGGCACTT -N9- GAGTGCCAG

## **Abstract:**

Bacteria have to cope with modifications of their environment, and have evolved specific survival mechanisms called stress response. In addition to their adaptive functions, stress proteins are involved in many physiological pathways including cellular differentiation and virulence development.

The main goal of this thesis was to perform a comparative analysis of the stress response in different Gram-positive pathogenic bacteria, and particularly the Clp family of proteins.

First, we characterized a new mechanism of stress response regulation in *Staphylococcus aureus*. Indeed, contrary to the situation in the model organism *Bacillus subtilis*, expression of the ubiquitous chaperones encoding operons *dnaK* and *groESL*, is under dual control by the CtsR and HrcA transcriptional regulators. Furthermore, we have shown the existence in streptococci and staphylococci, of an intermediate situation between *B. subtilis* and *S. aureus*, in which only the *groESL* operon is under dual repression. Finally, we discovered in *Streptococcus salivarius* the first example of a *clp* gene under dual regulation by CtsR and HrcA.

Secondly, we performed a functional analysis of *clp* genes of *Streptococcus pneumoniae*. We have shown that *clpC*, *clpP* and *clpE* are regulated by CtsR and that ClpP is involved in the control of natural competence for transformation and in resistance to thermal stress. In addition, we demonstrated that ClpE is required for adaptation to stress, and that ClpE and ClpC are both involved in the virulence of *S. pneumoniae*.

Finally, we characterized a new heat shock gene of *Listeria monocytogenes*, *clpB*, which is also a member of the CtsR regulon. Although ClpB is required for virulence, it is not involved in general stress resistance, but is necessary for induced thermotolerance of this bacterium.

---

**Key words:** *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, Clp, HSP, stress, regulation, repressor, chaperone, virulence, GroESL.

---



## Résumé :

Pour survivre aux modifications des conditions du milieu, les bactéries ont dû développer des mécanismes spécifiques, appelés réponses aux stress. En plus de leur rôle adaptatif, les protéines de stress sont impliquées dans diverses fonctions physiologiques comme la différenciation cellulaire ou l'expression de facteurs de virulence.

L'objectif de cette thèse était de réaliser une analyse comparative de la réponse aux stress chez différentes bactéries pathogènes à Gram-positif, et plus particulièrement des protéines de la famille Clp.

Nous avons ainsi caractérisé un nouveau mécanisme de réponse aux stress chez *Staphylococcus aureus*. En effet, contrairement à la situation chez le modèle *Bacillus subtilis*, les opérons codant les chaperons ubiquitaires DnaK et GroESL sont doublement régulés par les répresseurs transcriptionnels CtsR et HrcA. De plus, nous avons montré qu'il existe, chez les streptocoques et les lactocoques, une situation intermédiaire entre celle de *B. subtilis* et de *S. aureus* où seul l'opéron *groESL* est doublement réprimé. Enfin, nous avons mis en évidence chez *Streptococcus salivarius* le premier exemple de double régulation par CtsR et HrcA d'un gène *clp*.

D'autre part, nous avons réalisé une analyse fonctionnelle de gènes *clp* de *Streptococcus pneumoniae*. Nous avons montré que les gènes *clpC*, *clpP* et *clpE* sont régulés par CtsR et que *clpP* est impliqué dans le contrôle de la compétence naturelle, ainsi que pour la résistance au stress thermique. Par ailleurs, *clpE* est nécessaire pour l'adaptation au stress, et *clpE* et *clpC* sont requis pour la virulence du pneumocoque.

Enfin, nous avons mis en évidence chez *Listeria monocytogenes*, un nouveau gène de choc thermique, *clpB*, membre du régulon CtsR. Bien que ClpB soit nécessaire au développement de la virulence de ce microorganisme, elle n'est pas requise pour la résistance générale aux stress, mais joue un rôle dans la résistance induite aux stress létaux.

---

**Discipline :** Microbiologie

---

**Mots clés :** *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, Clp, HSP, stress, régulation, répresseur, chaperon, virulence, GroESL.

---

**Adresse du laboratoire :** Unité de Biochimie Microbienne, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75015 Paris

---