

Proposition de stage Master

Projet : «Virulence et Nucléotide Bactérien : imagerie à haute résolution »

mots clés

Microbiologie, pathogènes, imagerie, PALM

Description du projet de recherche

Ce projet vise à élucider les mécanismes moléculaires sous-jacents à la régulation de la virulence par les protéines de la famille H-NS chez les bactéries pathogènes. H-NS est une protéine qui contribue à structurer le nucléotide bactérien et qui participe à la régulation de l'expression génique. En particulier, elle inhibe la transcription de gènes de virulence (silencing). Les protéines homologues à H-NS, StpA, Hha, YdgT et Ler (spécifique des pathogènes), modulent ces régulations. Pour certaines de ces protéines, nous étudierons leur fixation sur l'ADN et les conséquences sur la structure du nucléotide par imagerie à haute résolution. Ce travail apportera un regard nouveau sur la régulation sophistiquée accomplie par le jeu de des protéines de la famille H-NS dans l'adaptation à l'environnement de bactéries pathogènes des humains et des mammifères.

Localisation de H-NS et Ler dans des cellules vivantes:

Les récents progrès de la microscopie de fluorescence à haute résolution ont permis la visualisation de la protéine H-NS ainsi que des autres protéines du nucléotide bactérien dans des *Escherichia coli* vivants (Wang *et al.*, 2011). Si pour la plupart des protéines associées au chromosome de la bactérie, HU, Fis, IHF, ou StpA la distribution se fait des manières générales dans tout le volume du nucléotide, en revanche H-NS se localise en un foyer bien déterminé par chromosome bactérien. La présence de ces foyers est dépendante de la capacité de la protéine à s'oligomériser avec elle-même et sur l'ADN. De plus une réorganisation substantielle du chromosome est observable si le gène *hns* est absent. Ces expériences suggèrent un modèle où la protéine H-NS rassemble en un seul foyer les régions du chromosome dont elle rend l'expression des gènes silencieuse. Dans le cadre de ce projet nous allons analyser les positionnements d'îlots de gènes impliqués dans la virulence des bactéries en même temps que nous analyserons le positionnement des protéines de la famille de H-NS qui régulent la virulence soit, H-NS, Ler et StpA.

Dans le cadre du stage de master et dans un premier temps les expériences déjà publiées seront reproduites. Elles seront parmi les premières à être réalisées sur la plateforme mise en place à Saclay. Nous exprimerons également la protéine homologue de H-NS, Ler qui est responsable de l'activation des gènes de virulence afin de comparer sa localisation avec celle de H-NS chez les *Escherichia coli* K12. Pour accomplir ces premières étapes nous devons cloner des protéines de fusion H-NS et Ler avec des GFP photoactivables. Ces protéines devront être dans un premier temps tester pour leur capacité à fixer l'ADN et compléter une souche *hns*-. Il faudra ensuite vérifier qu'elles sont toujours photoactivables puis les premières images pourront être obtenues en haute résolution. Ce seront les premières images du positionnement de la protéine Ler dans une bactérie.

Objet du/des stage(s)

Construction des vecteurs permettant l'expression de protéines fluorescentes (inductibles) et en faire l'imagerie *in vivo* chez les bactéries.

Valeur ajoutée du projet de recherche

Ce master permettra une première collaboration aux équipes concernées, qui permettra : pour l'équipe du CEA qui a construit un PALM dans le cadre de l'infrastructure FRISBI une première ouverture sur les équipes de la région, et une première application à l'imagerie bactérienne qui est plus difficile de par la taille des organismes. L'utilisation de la microscopie à super-résolution permet à l'équipe du LBPA de nouveaux développements pour un projet ambitieux qui propose de comprendre les remaniements de la chromatine bactérienne dans le cadre de l'expression de la virulence. Il permettra de mettre en place une collaboration durable entre les équipes.

Perspectives de valorisation du stage

Ce projet sera un des premiers pour la mise en activité et en valeur de la plateforme d'imagerie à haute résolution. L'étudiant pourra poursuivre ce travail de master par un projet de thèse portant sur l'imagerie mais ce projet pourra être étendu à l'étude de la régulation de la virulence par les protéines qui organisent la chromatine bactérienne. Les *Escherichia coli* pathogènes sont la première cause de mortalité chez les nouveau-nés dans les pays en voie de développement mais depuis quelques décennies elles sont aussi devenues des pathogènes émergents avec comme dernier événement marquant l'épidémie de août 2011 qui a touché l'Allemagne. Si ce projet relève largement de la recherche fondamentale avec un but essentiellement académique, il présente à long terme un intérêt sociétal évident.

Contacts: au LBPA ENS de Cachan: Sylvie Rimsky rimsky@lbpa.ens-cachan.fr au CEA Bruno ROBERT bruno.robert@cea.fr.