

Microbiologie / Microbiology

# L'état de la méthylation de l'ADN régule la virulence et la réponse au stress chez *Salmonella*

Abdelwaheb Chatti \*, Ahmed Landoulsi

Unité de biochimie des lipides et interaction des macromolécules en biologie, 03/UR/0902, laboratoire de biochimie et biologie moléculaire, faculté des sciences de Bizerte, Zarzouna 7021, Tunisie

Reçu le 8 avril 2008 ; accepté après révision le 10 juin 2008

Disponible sur Internet le 2 juillet 2008

Présenté par Jean Rosa

## Résumé

La méthylation de l'ADN est un événement post-répliatif, qui apporte une information secondaire à celle constituée par la séquence primaire de l'ADN. L'addition de cette information implique des enzymes (méthyltransférases) qui méthylent l'ADN sur des sites de reconnaissance spécifiques. Cette modification de l'ADN peut jouer un rôle de régulation de différents processus chez la cellule procaryote et eucaryote. Il a été bien élucidé que la méthylation du N6-adenine au niveau de la séquence GATC est catalysée par la Dam méthylase. Vu le modèle semi-conservatif de la réplication, l'ADN néosynthétisé est hémiméthylé transitoirement. Cet état de l'ADN constituerait un signal reconnu par différents facteurs qui peuvent activer ou réprimer certains processus cellulaires, en les liant ainsi au cycle cellulaire. Chez *Escherichia coli*, la suppression du gène *dam* produit plusieurs phénotypes indiquant des fonctions multiples de la méthylation : (i) modulation de l'expression des gènes, (ii) réparation de l'ADN, (iii) initiation de la réplication et (iv) stabilisation du chromosome. **Pour citer cet article :** A. Chatti, A. Landoulsi, C. R. Biologies 331 (2008).

© 2008 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

## Abstract

**The DNA-methylation state regulates virulence and stress response of *Salmonella*.** The DNA methylation is a post-replicative event that provides secondary information to that formed by DNA. Addition of this information involves DAM methyltransferase, which methylates DNA on specific sites (5'-GATC-3'). This modification of DNA may play a role in regulating various processes in eukaryote or prokaryote cells. It was well understood that deoxyadenosine methyltransferase (DAM) methylates the adenine of the GATC sequence. Following DNA replication, however, DNA is transiently hemimethylated, and the new strand is then methylated by DAM. In *Escherichia coli*, removing the *dam* gene produces several phenotypes indicating multiple functions of methylation: (i) modulation of gene expression, (ii) DNA repair, (iii) initiation of replication, and (iv) stabilising the chromosome. **To cite this article:** A. Chatti, A. Landoulsi, C. R. Biologies 331 (2008).

© 2008 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Mots-clés :** *Salmonella* ; Méthylation ; Virulence ; Stress

**Keywords :** *Salmonella*; DNA methylation; Virulence; Stress

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [chattiabdel@yahoo.fr](mailto:chattiabdel@yahoo.fr) (A. Chatti).

## 1. Introduction

Les *Salmonella* ne cessent de perfectionner leurs capacités de résistance et d'adaptation aux conditions défavorables. Actuellement, une émergence de la résistance aux antibiotiques de ces germes pathogènes a été remarquée, aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement. Cette importante prévalence a incité les chercheurs à chercher d'autres alternatives plus efficaces. Parmi les nouveaux aspects du contrôle de la réponse au stress et de la virulence de *Salmonella*, on trouve le phénomène de méthylation de l'ADN.

La méthylation de l'ADN est la modification de l'une des quatre bases azotées de l'acide désoxyribonucléique. Cette modification consiste en l'ajout d'un groupement méthyle ( $-\text{CH}_3$ ) à la place d'un atome d'hydrogène. Bien que les quatre bases azotées puissent être méthylées, l'adénine est le plus fréquemment modifiée chez les procaryotes. La méthylation de l'ADN, aussi bien chez les procaryotes que les eucaryotes, est en étroite relation avec la réplication de l'ADN.

## 2. Rôles de la méthylation de l'ADN

Durant le cycle cellulaire, la réplication du chromosome est initiée au niveau d'une origine, appelée *oriC*. L'une des caractéristiques d'*oriC* est la présence d'un nombre élevé de sites GATC. Ces sites sont méthylés par le produit du gène *dam*. La suppression du gène *dam* produit plusieurs phénotypes indiquant des fonctions multiples de la méthylation : (i) l'initiation de la réplication, (ii) réparation de l'ADN, (iii) modulation de l'expression des gènes et (iv) la stabilisation du chromosome.

### 2.1. La méthylation contrôle l'initiation de la réplication de l'ADN

L'initiation de la réplication est soumise à une étroite régulation et elle est liée au cycle cellulaire. Le contrôle de cet événement réside au niveau de la régulation de la fréquence et la détermination du moment propice à l'initiation au cours du cycle cellulaire, ce qui permet à la bactérie de garder un rapport masse/ADN correct. Chez *E. coli*, la réplication du chromosome débute au niveau de la séquence spécifique, *oriC*. Cette origine minimale de réplication (245 pb) contient un nombre de sites GATC, cibles pour la Dam méthylase, statistiquement élevé [1]. Afin de trouver une signification à l'abondance des sites GATC, Russell et Zinder [2] ont montré que l'activité de la réplication des plasmides

*oriC* isolés à partir de mutants *dam* d'*E. coli* ne représente que 30 à 50% de celle des plasmides *oriC* méthylés. L'efficacité de la transformation des souches *dam*<sup>-</sup> par les plasmides *oriC* est très réduite et les plasmides transformants ne sont pas stables à l'état autonome. Des résultats similaires ont été démontrés chez *Salmonella typhimurium* [3]. Ces données rendent difficile l'explication de la viabilité de ces mutants, d'autant plus que l'initiation de la réplication chez ces souches dépend d'*oriC* et de la protéine DnaA.

L'analyse de l'ADN des mutants *dam* transformés par des plasmides *oriC* méthylés a montré que l'ADN plasmidique reste sous la forme hémiméthylée deux heures après la transformation. Cette forme hémiméthylée d'*oriC* serait ainsi réfractaire à l'initiation, à moins qu'elle ne soit convertie en forme méthylée par la Dam méthylase.

### 2.2. Réparation des mésappariements

Parmi les processus cellulaires activés par l'hémiméthylation, on trouve la réparation des mésappariements introduits dans l'ADN [4,5]. Ainsi, l'ADN hémiméthylé constituerait la forme d'ADN reconnue par les protéines de réparation MutHLS. En outre, une analyse du génome entier d'*E. coli* a révélé que les tétranucléotides GATC ne sont pas séparées par plus que 2 kb. Ceci suggère que cette distribution permettrait une réparation de mésappariement sur la totalité du chromosome [6]. Une analyse analogue des génomes d'autres bactéries pathogènes serait importante.

### 2.3. La transposition

La transposition, phénomène sévèrement contrôlé, est un autre événement dont la fréquence peut être augmentée par l'asymétrie de la méthylation de l'ADN nouvellement répliqué. Chez les mutants *dam*, la fréquence de la transposition est stimulée [7] pour certains transposons ayant des sites GATC dans le promoteur du gène de la transposase.

### 2.4. Expression des gènes

Chez *E. coli*, l'expression de certains gènes ayant des sites GATC dans leurs promoteurs dépend aussi de l'état de la méthylation de ces sites. Par exemple, le promoteur proximal (*dnaA2p*) du gène *dnaA* et celui du gène *mioC* requièrent une méthylation complète de leurs sites GATC pour une activité normale [8].

### 2.5. La Dam méthyltransférase contrôle la virulence de *Salmonella*

Plusieurs travaux ont montré que l'inactivation du gène *dam* cause l'atténuation de la virulence de nombreuses bactéries pathogènes : *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Erwinia chrysanthemi*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Vibrio cholerae* [9] et *Hemophilus influenzae* [10]. L'effet de la mutation *dam* sur la virulence a été étudié pour la première fois chez *Salmonella typhimurium*, en utilisant des modèles animaux [11,12], en l'occurrence des souris Balb/C. Des résultats similaires ont été trouvés chez des souris de la lignée *Swiss albinos* [13,14]. Cette mutation présente plusieurs effets pleiotropiques, touchant l'état de virulence, tels que l'instabilité de l'enveloppe membranaire, une fuite protéinique et des vésicules membranaires, une réduction de la sécrétion de la protéine SipC codée par l'îlot de pathogénicité I [15] et une augmentation de la sensibilité à la bile [16,17]. En outre, des analyses histopathologiques ont démontré que cette mutation affecte, *in vitro*, l'adhésion et l'invasion de *Salmonella typhimurium* [18]. L'ensemble de ces résultats plaide en faveur d'une éventuelle conception de vaccin, en utilisant cette souche atténuée. En outre, la Dam méthyltransférase pourrait être une cible potentielle d'antibiotiques.

### 2.6. La méthylation contrôle la résistance aux antibiotiques

Récemment, il a été démontré que la méthylation de l'ADN chez *E. coli* contrôle la résistance à certains antibiotiques. Ainsi, la Dam méthylase intervient dans la régulation de l'expression de certains gènes codant pour les pompes à efflux. En effet, la surproduction de la DAM méthylase augmente cinq fois la résistance à l'acide nalidixique [19]. Le mécanisme de contrôle de la résistance aux antibiotiques par la méthylation de l'ADN est encore inconnu. Des études sur un tel mécanisme pourraient aider les chercheurs à résoudre le problème de la résistance aux antibiotiques.

## 3. La protéine SeqA

### 3.1. *SeqA* : un modulateur de l'initiation de la réplication de l'ADN

Au cours de la réplication de l'ADN, les séquences GATC au niveau de l'origine *oriC* ne sont pas méthylées immédiatement, mais elles restent à l'état hémiméthylé pendant le tiers du cycle cellulaire. Ce retard est dû à la séquestration d'*oriC* hémiméthylée par une protéine

appelée SeqA [20]. Par conséquent, la méthylation du brin nouvellement synthétisé est bloquée et l'origine de la réplication reste à l'état hémiméthylé, ce qui retarde toute initiation précoce. La protéine SeqA, nécessaire à la séquestration, module négativement l'initiation de la réplication de l'ADN [20,21].

La protéine SeqA pourrait agir, soit (i) directement au niveau d'*oriC* comme un facteur impliqué dans les interactions coopératives, soit (ii) comme un agent influençant la sensibilité de ces interactions avec la régulation des signaux physiologiques, soit (iii) selon ces deux mécanismes ensemble [20].

Des analyses génétiques et biochimiques ont montré que la protéine SeqA joue un rôle essentiel dans la séquestration du promoteur du gène *dnaA*. Ceci suggère que la séquestration pourrait être impliquée dans les interactions entre les protéines SeqA et DnaA [20]. Il a été démontré que les sites GATC au niveau d'*oriC* restent à l'état hémiméthylé pendant une longue période après le passage de la fourche répliquative ainsi que les sites GATC situées au niveau de la région promotrice du gène *dnaA*, ce qui bloquera sa transcription [22,23].

La séquestration bloque l'initiation de la réplication durant le tiers du cycle cellulaire [23], alors qu'*oriC* peut s'en échapper passivement grâce à l'action de la Dam méthylase [24]. Chez des cellules *dam*<sup>-</sup>, les initiations sont asynchrones et les temps d'inter-initiation sont variables, ceci étant expliqué par une séquestration défectueuse [25,26].

Le gène *seqA*, codant pour un peptide de 181 acides aminés, n'est pas crucial pour la viabilité de la cellule [20]. L'effet physiologique de la protéine SeqA au niveau de l'initiation est très remarquable. Le temps nécessaire à la reméthylation des sites GATC au niveau d'*oriC* et du promoteur du gène *dnaA* est réduit à 8 min chez le mutant *seqA*, alors qu'il reste normal au niveau des autres sites répartis tout le long du génome [20]. La synchronisation des initiations normalement observées au niveau des multiples copies d'*oriC* est complètement perdue chez les cellules *seqA*<sup>-</sup> [20,21].

Utilisé comme critère de sélection, les cellules *seqA*<sup>-</sup> peuvent propager efficacement des plasmides portant des *oriC* méthylées en absence de la Dam méthylase. La persistance de l'état d'hémiméthylation des *oriC* diminue jusqu'à 5 min, mais il n'est pas complètement aboli chez les souches *seqA*<sup>-</sup>. Ce résultat suggère l'existence d'autres facteurs qui participent à la séquestration des origines nouvellement répliquées et la fixation d'*oriC* hémiméthylée au niveau de la membrane.

Les interactions directes de la protéine SeqA avec l'ADN méthylé se font tout le long d'une séquence de 150 pb située sur la moitié gauche de l'origine mini-

male, où se logent deux séries de quatre sites GATC, espacées par 15 pb. Les deux séries sont séparées par une séquence de 30 pb. Une interaction directe entre la protéine SeqA et les sites GATC méthylés est entièrement compatible avec les observations génétiques précédentes [20]. En conclusion, la méthylation est épistatique, avec un rôle négatif de la protéine SeqA au cours de la régulation de l'initiation de la réplication.

La protéine SeqA s'attache fortement à l'origine *oriC* hémiméthylée (50% de retardement pour une concentration de 6–9 nM de la protéine SeqA). Cette protéine a montré une haute interaction, aussi bien avec *oriC* hémiméthylée qu'avec un fragment de contrôle composé de la séquence *LacZ* hémiméthylée contenant 8 sites GATC et n'ayant pas montré d'aptitude à être séquestré au niveau de la membrane *in vivo* [23]. Donc, il est très probable que l'attachement de la protéine SeqA au niveau de l'ADN ne dépende que de la présence des sites GATC.

*In vivo*, la séquestration est caractérisée par deux principales propriétés : (i) elle ne se déroule qu'au niveau de locus particuliers, à savoir au niveau d'*oriC* et du promoteur du gène *dnaA*, à condition que les sites GATC au niveau de ces locus soient sous une forme hémiméthylée. La protéine SeqA se montre non responsable de la spécificité du locus [27] ; (ii) le retardement par le biais de la protéine SeqA des substrats hémiméthylés est régulé seulement par la présence ou l'absence des sites GATC, indépendamment de la composition génétique de ces substrats.

Les interactions de la protéine SeqA avec les sites GATC confère une spécificité de la séquestration pour cette forme. Ainsi, la protéine SeqA se fixe préférentiellement au niveau de la forme hémiméthylée. L'attachement de la protéine SeqA à l'ADN hémiméthylé est unique et plus efficace que sa fixation au niveau de l'ADN méthylé. Ceci assure un meilleur blocage contre l'action de la Dam méthylase.

### 3.2. *SeqA* : régulation de la virulence chez *Salmonella typhimurium*

Récemment, nous avons démontré que l'inactivation par transposition du gène *seqA* atténue la virulence de *Salmonella typhimurium* [28]. En effet, une délétion du gène *seqA* a montré des résultats similaires [29]. Cependant, la délétion de ce gène atténue la virulence uniquement après infection par voie orale. Cette atténuation pourrait être le résultat de l'instabilité de leur membrane cytoplasmique et de leur sensibilité à la bile [17].

L'inactivation ou la surproduction de la Dam méthylase atténue dramatiquement la virulence de plu-

sieurs autres bactéries pathogènes [9,10]. Or, le profil de l'expression des gènes chez les mutants *dam* surproduit (*Dam<sup>SP</sup>*) et *seqA* est pratiquement identique chez *E. coli* [30]. Ceci suggère que le produit du gène *seqA* pourrait avoir un effet sur l'expression de certains gènes. La méthylation des sites GATC peut influencer l'expression des gènes par deux mécanismes différents [9,31]. D'abord, il faut noter que les séquences GATC méthylées au niveau des régions promotrices des gènes peuvent augmenter (*dnaA*), diminuer (*sulA*) ou n'avoir aucun effet sur l'initiation de la transcription. En second lieu, la Dam MT et les protéines régulatrices, telles que la protéine Cap (Global positive regulator of transcription), Lrp (Global regulatory protein) ou OxyR (Regulatory protein and sensor for oxidative stress), concurrencent pour les sites GATC. Les gènes *pap* ont deux sites GATC situés entre les promoteurs divergents de *Pap* (Pili chez *E. coli*), auxquels peuvent s'attacher la Dam MT, Lrp et *PapI*–Lrp pour contrôler le système ON–OFF des pili au niveau de la surface cellulaire [9,31]. Ce type de contrôle ON–OFF constitue ainsi un contrôle épigénétique. Chez *E. coli*, un autre contrôle épigénétique semblable, de type ON–OFF, du gène *flu*, contenant trois sites GATC, a été prouvé.

Des études utilisant des analyses par microarray ont étudié l'expression des gènes pour les mutants *dam*. Ils ont remarqué une induction de l'expression des gènes liés à la réponse SOS [32,33]. À part le régulon SOS et quelques autres gènes, les études menées diffèrent nettement concernant le nombre de gènes dont l'expression est affectée par la méthylation des sites GATC. Tandis que Oshima et al. [6] ont montré que la méthylation affecte 359 gènes, Lobner-Olesen et al. [30] ont trouvé uniquement 20 gènes affectés. Ces différences observées peuvent être dues à plusieurs effets, tels que la différence des conditions de culture ou des méthodes de préparation pour l'analyse par microarray. Des analyses protéomiques ont montré que la concentration de 93 protéines a été différente entre la souche sauvage et son mutant isogénique *dam* [6]. Récemment, la comparaison de l'expression des gènes des mutants *dam*, *seqA* et *Dam<sup>SP</sup>* a prouvé que les profils des souches *seqA*<sup>–</sup> et *Dam<sup>SP</sup>* étaient presque identiques et distincts de ceux du mutant *dam* [30]. Ce résultat confirme que la Dam MT et la protéine SeqA concurrencent pour les sites GATC au niveau de l'ADN hémiméthylé. Une surproduction de la Dam MT réduit la fixation de SeqA et engendre une altération de la transcription. Ceci est probablement dû au rôle de SeqA comme facteur important impliqué dans l'initiation de la réplication chromosomique [30].

#### 4. Le système à deux composantes PhoP/PhoQ interfère-t-il avec la méthylation de l'ADN ?

Il a été bien connu que la pathogénèse de *Salmonella* peut être contrôlée par la protéine PhoP. Cette protéine (DNA-binding protein) peut induire ou inhiber certains gènes spécifiques de virulence [34]. La liaison d'une telle protéine régulatrice à l'ADN peut bloquer la méthylation des sites cibles de la protéine Dam (séquences GATC) [35]. Ainsi, il a été démontré que la fixation de la protéine PhoP (ou des protéines régulées par PhoP) au niveau de sites GATC bloque la méthylation de l'ADN de ces sites. La méthylation de l'ADN chez *Salmonella* *phoP*<sup>-</sup> et *phoP*<sup>+</sup> a montré des différences suggérant que la fixation de la protéine PhoP a bloqué la méthylation des séquences GATC [11]. D'ailleurs, chez *Salmonella* les sites GATC protégés de la méthylation sont susceptibles d'être situés au niveau des gènes régulateurs, puisque presque tous les sites GATC chez *E. coli* sont situés dans les régions non codantes d'ADN, qui sont vraisemblablement impliquées dans la régulation de l'expression des gènes. La méthylation des sites spécifiques GATC dans des régions régulatrices de gènes pourrait moduler la fixation des protéines régulatrices à l'ADN, qui constitue alternativement un mécanisme de contrôle de l'expression des gènes de virulence [36,37].

#### 5. L'état de méthylation de l'ADN contrôle la réponse à certains stress et la virulence de *Salmonella*

Il est bien établi que la cible de la Dam méthylase est la séquence GATC. Ceci devrait avoir des répercussions sur la distribution des séquences GATC tout le long du chromosome. L'analyse de la fréquence et la distribution de ces sites ont montré que ces séquences ne sont pas distribuées anarchiquement. Ainsi, ces séquences ont été rencontrées essentiellement au niveau des parties codantes des gènes. Les promoteurs de la plupart des gènes contrôlés par la protéine Dam contiennent des sites GATC. Des résultats similaires ont été remarqués chez *E. coli* [6]. Ceci souligne le rôle important de la méthylation au niveau de la régulation des gènes, et particulièrement des gènes possédant des sites de liaison avec Cap et Fnr.

La fréquence et la distribution des sites GATC pourraient avoir une signification biologique. En effet, la méthylation des sites spécifiques GATC dans des régions régulatrices de gènes pourrait moduler la fixation des protéines régulatrices à l'ADN, qui constitue alternativement un mécanisme de contrôle de l'expression des gènes de virulence [36,37].

Les gènes impliqués dans la réponse à certains stress se sont montrés plus riches en ces séquences spécifiques ; par exemple : *barA*, *katG*, *katF*, *oxyR*, *dnaK*, *dnaJ*, *uvrA*, *uvrB*, *ompR*, *copR*, *lexA* (données non publiées). Toutefois, les gènes impliqués dans la virulence (les îlots de pathogénécité) de *Salmonella* se sont montrés riches en ses tétranucléotides. La régulation par le biais de GATC est probablement le résultat de la présence de ces sites au niveau des parties codantes (données non publiées).

#### 6. Conclusions et perspectives

L'ensemble des travaux menés sur le rôle de la méthylation de l'ADN chez les procaryotes et essentiellement les entérobactéries suggère une compétition entre la Dam méthylase et la protéine SeqA. Ainsi, ces deux protéines concurrencent pour les sites GATC au niveau de l'ADN hémiméthylé :

- (i) une possibilité est que les sites GATC deviennent des cibles pour la restriction et que, chez le mutant *dam*, l'absence du groupement méthyl pourrait exposer ces sites GATC à une restriction anormale. Ceci peut alternativement mener à une induction constitutive de la réponse SOS chez les mutants *dam* et *seqA* ;
- (ii) la méthylation contrôle la transcription de certains gènes impliqués directement dans la virulence ;
- (iii) la méthylation contrôle l'expression de certains systèmes de perception (PhoPQ, EnvZ/OmpR) ;
- (iv) la distribution et la fréquence des séquences GATC au niveau des gènes peut contrôler la réponse au stress (surtout le stress acide et oxydatif, résistance aux peptides cationiques).

La méthylation de l'ADN fournit un niveau additionnel de contrôle, puisque la fixation de différents facteurs de régulation à l'ADN peut être potentiellement affectée. D'ailleurs, l'altération du taux de la méthylase en réponse aux stimuli environnementaux peut contrôler l'expression (temporairement) des sous-groupes spécifiques de gènes dépendant de l'effet de la méthylation. Des questions importantes peuvent être avancées : quels sont les types de gènes de virulence régulés par la méthylation de l'ADN ? Quels sont les mécanismes impliqués dans le contrôle et l'expression coordonnée de gène de virulence par la méthylation de l'ADN ? Comment est-ce les taux de la méthylase sont changés au cours de l'infection ? La méthylation fournit-elle un système de mémoire pour aider les microbes pathogènes à

coordonner l'expression des causes déterminantes de virulence ?

Une étude de l'effet de la méthylation de l'ADN sur les lipides et les lipopolysaccharides (LPS) pourrait aider les chercheurs à mieux comprendre les mécanismes responsables de l'atténuation de la virulence chez *Salmonella*.

## Références

- [1] N. Ogasawara, H. Yoshikawa, Genes and their organization in the replication origin region of the bacterial chromosome, *Mol. Microbiol.* 6 (1992) 629–634.
- [2] D.W. Russell, N.D. Zinder, Hemimethylation prevents DNA replication in *E. coli*, *Cell* 50 (1987) 1071–1079.
- [3] A. Aloui, A. Chatti, A. El May, A. Landoulsi, The effect of methylation on DNA replication in *Salmonella enterica* serovar typhimurium, *C. R. Biologies* 330 (2007) 576–580.
- [4] T.M. Marti, C. Kunz, O. Fleck, DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways, *J. Cell Physiol.* 191 (2002) 28–41.
- [5] A.S. Bhagwat, M. Lieb, Cooperation and competition in mismatch repair: very short-patch repair and methyl-directed mismatch repair in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 44 (2002) 1421–1428.
- [6] T. Oshima, C. Wada, Y. Kawagoe, T. Ara, M. Maeda, Y. Masuda, S. Hiraga, H. Mori, Genome wide analysis of deoxyadenosine methyltransferase-mediated control of gene expression in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 45 (2002) 673–695.
- [7] D.E. Roberts, B.C. Hoopes, W.R. McClure, N. Kleckner, IS10 transposition is regulated by DNA adenine methylation, *Cell* 43 (1985) 117–130.
- [8] R.E. Braun, A. Wright, DNA methylation differentially enhances the expression of one of the two *E. coli* dnaA promoters in vivo and in vitro, *Mol. Gen. Genet.* 202 (1986) 246–250.
- [9] D.A. Low, N.J. Weyand, M.J. Mahan, Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence, *Infect. Immun.* 69 (2001) 7197–7204.
- [10] M.E. Watson, J.R. Jarisch, A.L. Smith, Inactivation of deoxyadenosine methyltransferase (*dam*) attenuates *Haemophilus influenzae* virulence, *Mol. Microbiol.* 53 (2004) 651–654.
- [11] D.M. Heithoff, R.L. Sinheimer, D.A. Low, M.J. Mahan, An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence, *Science* 284 (1999) 967–970.
- [12] M.N. Giacomodonato, M.H. Sarnacki, R.L. Caccuri, et al., Host response to a *dam* mutant of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with a temperature sensitive phenotype, *Infect. Immun.* 72 (2004) 5498–5501.
- [13] A. Chatti, D. Daghfous, A. Landoulsi, Effect of repeated *in vivo* passage (in mice) on *Salmonella typhimurium dam* mutant virulence and fitness, *Pathol. Biol.* 56 (2008) 121–124.
- [14] A. Chatti, A. Landoulsi, Acid pre-adaptation enhances virulence of *Salmonella typhimurium dam* mutant, *Pathol. Biol.*, in press.
- [15] F. García-del Portillo, M.G. Pucciarelli, J. Casadesús, DNA adenine methylase mutants of *Salmonella typhimurium* show defects in protein secretion, cell invasion, and M cell cytotoxicity, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96 (1999) 11578–11583.
- [16] D.M. Heithoff, E.Y. Enioutina, R.A. Daynes, et al., *Salmonella* DNA adenine methylase mutants confer cross-protective immunity, *Infect. Immun.* 69 (2001) 6725–6730.
- [17] A.I. Prieto, F. Ramos-Morales, J. Casadesús, Bile-induced DNA damage in *Salmonella enterica*, *Genetics* 168 (2004) 1787–1794.
- [18] L.S. Renato, Z. Shuping, M.T. Renée, et al., Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever, *Microb. Infect.* 3 (2001) 1335–1344.
- [19] M. Adam, B. Murali, N. Glenn, S. Potter, Epigenetic inheritance based evolution of antibiotic resistance in bacteria, *BMC Evol. Biol.* 8 (2008) 52.
- [20] M. Lu, J. Campbell, E. Boye, N. Kleckner, SeqA: a negative modulator of replication initiation in *E. coli*, *Cell* 77 (1994) 413–426.
- [21] U. Von Freiesleben, K.V. Rasmussen, M. Schaechter, SeqA limits DnaA activity in replication from oriC in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 14 (1994) 763–772.
- [22] G.B. Ogden, M.J. Pratt, M. Schaechter, The replicative origin of the *E. coli* chromosome binds to cell membranes only when hemimethylated, *Cell* 54 (1988) 127–135.
- [23] J.L. Campbell, N. Kleckner, *E. coli* oriC and the dnaA gene promoter are sequestered from dam methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork, *Cell* 62 (1990) 967–979.
- [24] A. Landoulsi, A. Malki, R. Kern, et al., The *E. coli* cell surface specifically prevents the initiation of DNA replication at oriC on hemimethylated DNA templates, *Cell* 63 (1990) 1053–1060.
- [25] E. Boye, A. Løbner-Olesen, The role of Dam methyltransferase in the control of DNA replication in *E. coli*, *Cell* 62 (1990) 981–989.
- [26] A. Bakker, D.W. Smith, Methylation of GATC sites is required for precise timing between rounds of DNA replication in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 17 (1989) 5738–5742.
- [27] S. Slater, S. Wold, M. Lu, et al., *E. coli* SeqA protein binds oriC in two different methyl-modulated reactions appropriate to its roles in DNA replication initiation and origin sequestration, *Cell* 82 (1995) 927–936.
- [28] A. Chatti, D. Daghfous, A. Landoulsi, Effect of seqA mutation on the virulence of *Salmonella typhimurium*, *J. Infect.* 54 (6) (2007) e241–e245.
- [29] A.I. Prieto, M. Jakomin, I. Segura, et al., The GATC-binding protein SeqA is required for bile resistance and virulence in *Salmonella enterica* serovar typhimurium, *J. Bacteriol.* 189 (2007) 8496–8502.
- [30] A. Lobner-Olesen, M.G. Marinus, F.G. Hansen, Role of SeqA and Dam in *Escherichia coli* gene expression: a global/microarray analysis, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100 (2003) 4672–4677.
- [31] A. Hernday, M. Krabbe, B. Braaten, D. Lo, Self-perpetuating epigenetic pili switches in bacteria, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99 (2002) 16476–16570.
- [32] D.E. Waldron, A. Wallecha, P. Owen, C.J. Dorman, Competitive interaction of the OxyR DNA-binding protein and the Dam methylase at the antigen 43 gene regulatory region in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 44 (2002) 509–520.
- [33] A. Wallecha, J. Correnti, V. Munster, M. Van der Woude, Phase variation of Ag43 is independent of the oxidation state of OxyR, *J. Bacteriol.* 185 (2003) 2203–2209.
- [34] E.A. Groisman, F. Heffron, Regulation of *Salmonella* virulence by two-component regulatory systems, in: J.A. Hoch, T.J. Silhavy (Eds.), *Two-Component Signal Transduction*, American Society for Microbiology Press, Washington, DC, 1995, pp. 319–332.
- [35] M. Van der Woude, W.B. Hale, D.A. Low, Formation of DNA methylation patterns: nonmethylated GATC sequences in gut and pap operons, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 5913–5920.

- [36] W.B. Hale, M.W. Van der Woude, D.A. Low, Analysis of non-methylated GATC sites in the *Escherichia coli* chromosome and identification of sites that are differentially methylated in response to environmental stimuli, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 3438–3441.
- [37] S. Tavazoie, G.M. Church, Quantitative whole-genome analysis of DNA-protein interactions by in vivo methylase protection in *E. coli*, *Nat. Biotechnol.* 16 (1998) 566–571.