

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

FACULTÉ DE PHARMACIE

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 142774 5

ANNÉE 2005

THÈSE N° 332 / 1



CLOSTRIDIUM DIFFICILE :
ANALYSE D'UN CLUSTER DE GÈNES CODANT
POUR DES PROTÉINES DE SURFACE

THÈSE
POUR LE DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 26 octobre 2005

par

M^{lle} Cécile DENÈVE

née le 04 mai 1981 à Harfleur

EXAMINATEURS DE THÈSE

Madame le Professeur Sylvie ROGEZ

Madame le Professeur Marie-Cécile PLOY.

Madame Sylvie DELEBASSÉE, Maître de conférences

Madame Claire JANOIR, Maître de Conférences

Monsieur Christian MARTIN, Praticien hospitalier

Président

Juge

Juge

Juge

Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE

Monsieur le Professeur **HABRIOUX** Gérard

ASSESSEURS

Madame le Professeur **CHULIA** Dominique

Monsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférences

PROFESSEURS

BENEYTOUT Jean-Louis

BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE

BOTINEAU Michel

BOTANIQUE – CRYPTOLOGAMIE

BROSSARD Claude

PHARMACIE GALENIQUE

BUXERAUD Jacques

CHIMIE ORGANIQUE – CHIMIE THERAPEUTIQUE

CARDOT Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

CHULIA Albert

PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique

PHARMACIE GALENIQUE

DELAGE Christiane

CHIMIE GENERALE – CHIMIE MINERALE

DREYFUSS Gilles

PARASITOLOGIE

DUROUX Jean-Luc

PHYSIQUE – BIOPHYSIQUE

GHESTEM Axel

BOTANIQUE – CRYPTOLOGAMIE

HABRIOUX Gérard

BIOCHIMIE FONDAMENTALE

LACHATRE Gérard

TOXICOLOGIE

MOESCH Christian

HYGIENE – HYDROLOGIE – ENVIRONNEMENT

LOUDART Nicole

PHARMACODYNAMIE

ROGEZ Sylvie

BACTERIOLOGIE – VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES

ALLAIS Daovy	PHARMACOGNOSIE
BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE
CARDI Patrice	PHYSIOLOGIE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
COMBY Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DELEBASSEE Sylvie	BACTERIOLOGIE – VIROLOGIE
DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
EA KIM Leng	PHARMACODYNAMIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE
JAMBUT Anne Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LARTIGUE Martine	PHARMACODYNAMIE
LIAGRE Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MOREAU Jeanne	IMMUNOLOGIE
PARTOUCHE Christian	PHYSIOLOGIE
POUGET Christelle	PHARMACIE GALENIQUE
ROUSSEAU Annick	BIOMATHEMATIQUES
SIMON Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIANA Marylène	PHARMACIE GALENIQUE
VIGNOLES Philippe	INFORMATIQUE

PROFESSEUR ASSOCIE

BAMBA Moriféré

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUTY Jean-Michel

ANGLAIS

REMERCIEMENTS

Je remercie les membres du jury :

Madame le Professeur Sylvie Rogez, pour me faire l'honneur de participer à l'examen de mon travail et de présider ce jury.

Mesdames Sylvie Delebassée, Claire Janoir, Marie-Cécile Ploy et Monsieur Christian Martin pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je tiens à remercier particulièrement le Professeur Anne Collignon, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire à la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry et m'avoir permis de réaliser ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements au Docteur Claire Janoir, pour son encadrement, ses conseils, sa patience et sa gentillesse tout au long de l'élaboration de ce travail.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire : enseignants-chercheurs, étudiants, techniciens, ..., pour leur accueil et pour tous les bons moments passés ensemble.

A mes parents,

Pour m'avoir permis de suivre et mener à bien mes longues études,
dans d'aussi bonnes conditions.

A Pettian,

Pour son soutien de tous les instants, difficiles ou non,
et pour l'intérêt qu'il porte à mes études et mon travail.

PLAN

INTRODUCTION

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

A. Infections à *Clostridium difficile*

1. Epidémiologie
2. Présentations cliniques
3. Diagnostic
4. Traitement
5. Physiopathologie

B. Régulation de l'expression des facteurs de colonisation et des facteurs de virulence

1. Exemples de régulation chez différentes bactéries
2. Régulation des facteurs de colonisation et de virulence chez *C. difficile*

TRAVAUX PERSONELS

OBJECTIFS

MATERIELS ET METHODES

A. Analyse du génome environnant le cluster de protéines de surface

B. Souches bactériennes et conditions de culture

C. Analyse du polymorphisme par PCR-RFLP

1. Extraction d'ADN
2. PCR-RFLP

D. Etude de la régulation du cluster d'intérêt

1. Choix des conditions de culture
2. Analyse de l'expression des protéines P36, P47, Cwp66 et Cwp84
3. Analyse de l'expression des gènes *slpA*, *cwp66* et *cwp84*

RESULTATS

A. Analyse du génome environnant le cluster de protéines de surface

B. Analyse du polymorphisme des gènes *orf6*, *orf7*, *orf8*, *orf9* et *orf12*

1. Amplification des gènes
2. Polymorphisme du gène *orf6*
3. Polymorphisme du gène *orf7*
4. Polymorphisme du gène *orf9*
5. Polymorphisme du gène *orf12*

C. Etude de la régulation du cluster d'intérêt

1. Analyse de l'expression des protéines P36, P47, Cwp66 et Cwp84
2. Analyse de l'expression des gènes *slpA*, *cwp66* et *cwp84*

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

INTRODUCTION

Clostridium difficile est la principale bactérie responsable de diarrhées consécutives à une antibiothérapie ; elle est également responsable de 95 % des cas de colites pseudomembraneuses. *C. difficile* est ainsi devenue la bactérie entéropathogène responsable d'infections nosocomiales la plus répandue dans les pays développés. Les modifications démographiques, telles que le vieillissement de la population, et l'extension de l'utilisation des antibiotiques contribuent à l'augmentation des infections à *C. difficile*.

L'altération de la flore intestinale normale, qui exerce naturellement sur *C. difficile* un effet de barrière, entraîne une diminution de la résistance à la colonisation et favorise ainsi son implantation. *C. difficile* va alors adhérer aux cellules épithéliales et coloniser le tube digestif grâce à différents facteurs, puis se multiplier et produire ses facteurs majeurs de virulence, les toxines A et B. Les mécanismes d'actions de ces toxines ont été en partie élucidés ; en revanche, les mécanismes de colonisation restent à l'heure actuelle encore mal connus. Cette étape fait intervenir des adhésines et des facteurs protéolytiques, dont certains sont codés par des gènes présents au sein d'un cluster codant pour différentes protéines de surface de *C. difficile*.

Nous avons donc entrepris l'analyse de ce cluster de protéines de surface et tenté de caractériser son éventuelle implication dans la virulence de *C. difficile*, plus particulièrement dans l'étape de colonisation.

Dans une première partie, nous présenterons une revue bibliographique consacrée à *Clostridium difficile*, sa pathologie, ses facteurs de colonisation et de virulence, ainsi qu'à la régulation de l'expression de ces facteurs chez *C. difficile* et chez d'autres bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

Nous développerons ensuite nos travaux expérimentaux qui ont consisté en i) une analyse informatique du génome environnant le cluster, ii) une analyse du polymorphisme du cluster au sein de l'espèce de *C. difficile* et enfin iii) une analyse de la régulation de gènes du cluster, ainsi que celle des protéines correspondantes, en fonction de diverses conditions environnementales mimant les conditions rencontrées par *C. difficile* au sein du tube digestif.

REVUE

BIBLIOGRAPHIQUE

A. Infections à *Clostridium difficile*

Clostridium difficile est un bacille à Gram positif, sporulé, anaérobie strict, non invasif, actuellement considéré comme la principale étiologie des diarrhées infectieuses nosocomiales chez l'adulte. Il peut être responsable de manifestations allant de diarrhées post-antibiotiques bénignes à des colites pseudomembraneuses parfois fatales.

1. Épidémiologie

C. difficile est l'agent le plus fréquent des diarrhées nosocomiales. D'après une étude canadienne, l'incidence des diarrhées nosocomiales à *C. difficile* est de 38 à 95 cas pour 100 000 patients-jour et de 3,8 à 8,4 cas pour 100 admissions [69]. Aucune donnée française n'est actuellement disponible.

C. difficile est présent dans la flore fécale normale de moins de 5 % des adultes sains [7] ; ce pourcentage est de l'ordre de 70 % chez les jeunes enfants puis diminue régulièrement avec l'âge pour atteindre le taux observé chez l'adulte vers 2 à 3 ans. Chez les personnes âgées, le taux de colonisation peut atteindre 10 à 20 % selon leur exposition aux antibiotiques ainsi que la durée d'hospitalisation. En effet, *C. difficile* est largement présent dans l'environnement, contaminant ainsi 20 à 70 % de l'environnement hospitalier [101].

Le réservoir de *C. difficile* est représenté par les patients diarrhéiques mais aussi les porteurs asymptomatiques qui contaminent l'environnement. La transmission passe par la voie oro-fécale et la contamination peut avoir lieu par manuportage ou à partir de l'environnement contaminé. La grande résistance des spores de *C. difficile* sur les surfaces (meubles, literie, vêtements, sols) et sur les mains des patients et du personnel soignant, la promiscuité des patients hospitalisés et la pression de sélection due aux antibiotiques favorisent la transmission du bacille [22].

2. Présentations cliniques

L'infection à *C. difficile* est associée à une prise récente ou en cours d'antibiotiques. Elle peut se manifester par une diarrhée modérée avec absence de signes généraux ou par une pathologie plus sévère comme la colite pseudomembraneuse (CPM). La CPM, souvent

accompagnée de fièvre et de douleurs abdominales, est définie de manière histopathologique : elle se caractérise par la présence d'un intense infiltrat inflammatoire et de fausses membranes fibrineuses adhérant à la muqueuse rectale et colique. Ces symptômes, d'apparition souvent brutale, peuvent se compliquer d'un mégacôlon toxique, de déséquilibre électrolytique et de perforation intestinale ; en cas de complications, le taux de mortalité atteint 35 à 50 % [3].

Le problème des rechutes est important puisque 15 à 35 % des patients ayant subi un premier épisode diarrhéique imputable à *C. difficile* rechutent dans les deux mois ; de plus, le risque de rechutes ultérieures multiples augmente après une première rechute, posant des problèmes thérapeutiques. Les rechutes correspondent à deux phénomènes distincts : pour environ la moitié des cas, il s'agit d'une récurrence, c'est-à-dire la persistance malgré le traitement de la souche pathogène, parfois sous forme sporulée, dans le tube digestif ; pour l'autre moitié, il s'agit d'une réinfection avec une souche différente de la souche responsable de l'épisode initial [5].

3. Diagnostic

Le diagnostic des infections à *Clostridium difficile* devrait être systématique en cas de diarrhée nosocomiale et doit être envisagé chez les patients présentant une diarrhée aiguë et des facteurs de risques d'infections liées au bacille. En raison de la gravité des complications, il doit être posé rapidement. Ce diagnostic repose sur la mise en évidence de la bactérie ou des toxines dans les selles, ainsi que sur le sérotypage.

3.1. Mise en évidence de *C. difficile*

La culture et l'isolement de *C. difficile* à partir d'un échantillon de selles s'effectuent sur gélose sélective CCFA (Cycloserine Cefoxitine Fructose Agar) pendant 36 heures minimum en anaérobiose.

L'identification macroscopique est assez aisée : les colonies de *C. difficile* sont circulaires à bords irréguliers et présentent une fluorescence vert chartreuse en lumière U.V. à 360 nm, ainsi qu'une odeur caractéristique dite de « crottin de cheval » [59].

L'identification formelle peut être réalisée par l'analyse qualitative et quantitative des acides gras volatils en chromatographie en phase gazeuse ou par l'analyse de l'équipement enzymatique grâce à des galeries d'identification [59].

3.2. Détection des toxines

La mise en évidence des toxines dans les selles peut se faire par la recherche d'un effet cytopathogène ou par des méthodes immuno-enzymatiques.

La détection de la toxine B par la recherche de l'effet cytopathogène à partir d'un filtrat stérile de selles reste une méthode de référence, en raison de la facilité de réalisation et d'interprétation ainsi que de sa sensibilité. L'inoculation d'un filtrat contenant la toxine B sur une culture cellulaire (cellules fibroblastiques animales ou humaines, cellules rénales, cellules Hela,...) provoque, au bout de 48 heures d'incubation, un arrondissement des cellules, puis leur détachement et un effet de « globulisation ». La spécificité de cette réaction peut être confirmée par sa neutralisation par un antisérum [59,29].

De nombreuses techniques de détection antigénique des toxines sont actuellement disponibles et permettent la mise en évidence des toxines A et B grâce à des anticorps monoclonaux pour la plupart ou polyclonaux ; ces tests immuno-enzymatiques et immuno-chromatographiques sont caractérisés par leur rapidité et leur spécificité.

Actuellement, le développement de la PCR en temps réel permet de réaliser la recherche des gènes des toxines A et B à partir d'échantillons de selles avec une grande sensibilité et une spécificité excellente [8].

L'association de la culture de *C. difficile* à partir d'un échantillon de selles et de la détection antigénique des toxines A et B à partir d'un filtrat stérile de selles semble être désormais recommandé pour le diagnostic d'une infection à *C. difficile* en routine [28].

3.3. Typage des souches de *C. difficile*

Le sérogroupage reste encore aujourd'hui la méthode de typage phénotypique de référence. Il est basé sur l'agglutination des différentes souches de *C. difficile* à l'aide d'antisérums obtenus à partir d'immunisations de lapins avec des souches formolées [27] ; il permet ainsi de définir onze sérogroupes désignés A B C D F G H I K X S, le séro groupe A étant subdivisé en une vingtaine de sous-groupes (A1 à A20). Une corrélation entre ces sérogroupes et le type toxinogénique ainsi que le contexte clinique de leur isolement a été observée : les sérogroupes A, C, G, H et K sont par exemple le plus souvent toxinogènes et pathogènes, alors que les sérogroupes B, D, I et X sont le plus souvent non toxinogènes ; les sérogroupes B, F et X sont exclusivement retrouvés chez l'enfant ou le nouveau-né asymptomatique [61,29].

D'autres techniques de typage ont été développées et sont basées sur des marqueurs génomiques : restriction de l'ADN chromosomique (restriction enzymatique de l'ADN chromosomique et électrophorèse en champ pulsé, ribotypage), PCR (AP-PCR et RAPD, PCR-ribotypage, AFLP ou rep-PCR), polymorphisme des gènes de virulence (toxines, flagelline, S-layer), et MLST [61].

4. Traitement

Le traitement des infections digestives liées à *C. difficile* dépend de la sévérité de la pathologie. La recommandation thérapeutique est bien établie pour les premiers épisodes ; en revanche, le traitement des rechutes reste encore à l'heure actuelle problématique [26].

En premier lieu, l'antibiothérapie supposée à l'origine de l'infection doit être stoppée ; cette première mesure conduit généralement à une guérison rapide des diarrhées modérées et possède l'avantage de diminuer les risques de rechutes ultérieures, probablement grâce à une reconstitution plus rapide de la flore colique [26].

Dans le cas de pathologies plus sévères ou de symptômes persistants, l'administration de métronidazole (1 g/j), ou en deuxième intention de vancomycine (0,5 à 2 g/j) *per os* est alors recommandée [3,26].

En cas de complications, le recours à la chirurgie est parfois nécessaire [26].

Le traitement des rechutes multiples a pour but d'éliminer les formes végétatives et les spores de *C. difficile* et de rétablir une flore colique de barrière. Il consiste généralement en l'administration de traitements antibiotiques plus ou moins associés à des composés non antibiotiques : résines échangeuses d'anions telles que la cholestyramine [78], probiotiques, en particulier *Saccharomyces boulardii* mais l'efficacité de ces mesures n'est pas toujours démontrée [26,89].

Le traitement des porteurs sains n'est pas recommandé car il n'est pas efficace pour l'éradication du portage [52].

5. Physiopathologie

La pathogenèse de l'infection à *C. difficile* comprend deux étapes principales.

La flore intestinale normale exerce naturellement sur *C. difficile* un effet de barrière. L'altération de cette flore entraîne donc une diminution de la résistance à la colonisation. La colonisation du tube digestif par *C. difficile* fait alors intervenir différents facteurs, adhésines et facteurs protéolytiques, dont certains n'ont été identifiés que récemment [50].

L'effet pathogène de *C. difficile* résulte ensuite de la sécrétion en quantité importante de deux toxines, qui sont les facteurs majeurs de virulence : les toxines A et B (Figure 1). Par ailleurs, une autre toxine a été décrite, la toxine binaire, ou ADP-ribosyltransférase spécifique de l'actine, dont le rôle dans la pathogenèse n'est pas encore très clair, mais dont la présence semble corrélée à la sévérité de l'infection [2].

5.1. Colonisation et facteurs de virulence accessoires

La rupture de l'effet de barrière est le plus souvent liée à une antibiothérapie : la clindamycine, les céphalosporines et l'amoxicilline associée à l'acide clavulanique sont considérées comme les molécules les plus à risque [11] mais il est désormais admis que tous les antibiotiques, exceptés les aminosides, sont susceptibles d'entraîner une infection à *C. difficile*. Certaines chimiothérapies anticancéreuses ont aussi été incriminées [13], ainsi que tous les facteurs entraînant des modifications de l'écosystème digestif ou la motilité intestinale (laxatifs, lavements barytés, anti-acides, ralentisseurs du transit, chirurgie gastro-intestinale) [3]. Un âge supérieur à 65 ans, des maladies sous-jacentes, une immunodépression ou la durée d'hospitalisation font partie des facteurs de risques liés à l'hôte [11].

La colonisation par une souche virulente de *C. difficile* fait généralement suite à une contamination d'origine exogène, en particulier par les spores du bacille. La contamination d'origine endogène ne représente qu'une faible proportion des cas, le taux de portage chez l'adulte ne dépassant pas les 5% [7]. Les facteurs de colonisation, ou facteurs de virulence accessoires, comprennent des adhésines et des enzymes hydrolytiques et protéolytiques.

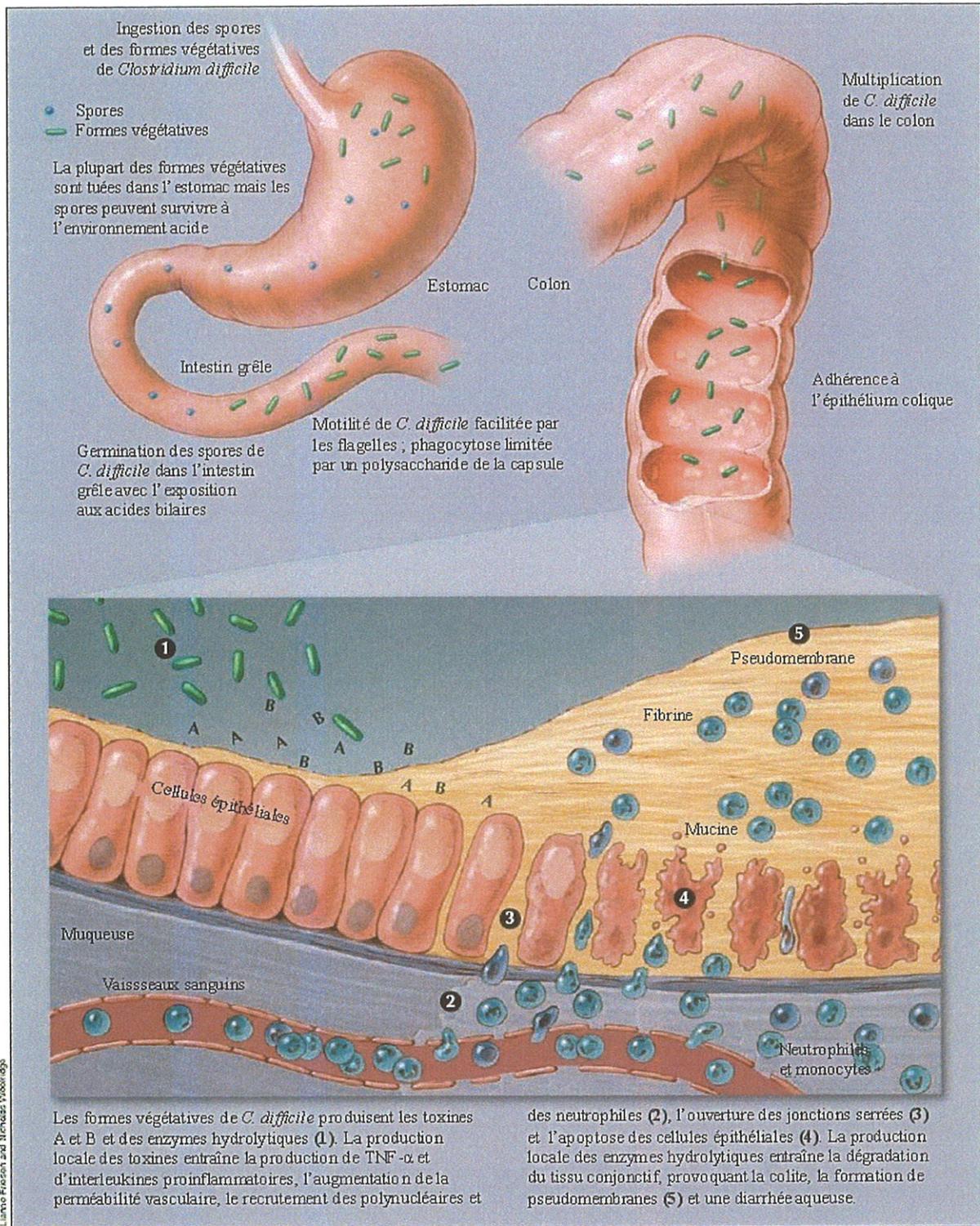


Figure 1. Pathogénèse des infections liées à *Clostridium difficile*
[d'après Poutanen S.M. (78)]

a. Facteurs d'adhésion

L'adhésion de *C. difficile* à la muqueuse intestinale est un phénomène essentiel pour la colonisation. Sa persistance dans le tractus gastro-intestinal continuellement lavé par les fluides intestinaux nécessite des structures spécifiques qui permettent l'adhésion aux cellules hôtes. *C. difficile* est capable d'adhérer à différentes cellules en culture ainsi qu'à la muqueuse intestinale humaine [30]. L'adhésion aux cellules Caco-2 comprend deux mécanismes distincts : la liaison directe à un récepteur cellulaire encore inconnu situé à la surface basolatérale des cellules et une interaction avec certaines protéines des fibres de la matrice extracellulaire, telles la fibronectine, le fibrinogène, la vitronectine et les collagènes I, III, IV et V [21].

■ Les protéines de la couche S

C. difficile possède à sa surface, comme de nombreuses bactéries, une couche cristalline en deux dimensions appelée « couche S » (« S-layer »). Elle est composée de protéines ou de glycoprotéines, dont les sous-unités forment un réseau recouvrant entièrement la cellule. Les couches S possèdent de nombreuses fonctions biologiques comme l'adhésion cellulaire, la protection contre la phagocytose et des propriétés antigéniques [10].

Toutes les souches de *C. difficile* présentent une couche S composée de deux couches protéiques superposées, chacune constituée d'une protéine particulière, de taille variable. La fine couche externe est constituée par une protéine de poids moléculaire moyen 36 kDa appelée P36, alors que la couche interne, épaisse, est constituée par une protéine glycosylée de poids moléculaire moyen 47 kDa appelée P47 [20]. Ces deux protéines dérivent d'un précurseur commun, codé par le gène *slpA*, après clivage en deux sites : en N-terminal pour libérer le peptide signal, puis à l'intérieur du précurseur pour libérer les deux protéines matures [18]. Ce sont les protéines de surface majoritaires de *C. difficile*.

La protéine P36 correspond à la partie N-terminale du précurseur. Elle présente une grande variabilité, mais il existe une forte identité intersérogrupe (excepté pour le sérogrupe A) ; la protéine P36 pourrait donc être l'antigène dominant déterminant le sérogrupe [54]. La protéine P47 correspond à la partie C-terminale du précurseur. Elle est relativement conservée entre les différentes souches et possède une homologie avec la partie d'ancrage de l'autolysine CwlB de *Bacillus subtilis* [18]. La P47 adhère aux cellules Hep-2 en culture, à l'épithélium de la muqueuse digestive humaine via des composants de la bordure en brosse ainsi qu'aux composants de la matrice extracellulaire de la lamina propria sous-jacente (collagène-I, thrombospondine et vitronectine) [17].

■ L'adhésine Cwp66

La protéine Cwp66 (Clostridial Wall Protein de 66 kDa) est une protéine de surface de *C. difficile* qui présente une structure en trois domaines : le peptide signal, le domaine N-terminal présentant des homologies avec la partie d'ancrage de CwlB de *B. subtilis*, et le domaine C-terminal, très variable et exposé à la surface de la bactérie. L'inhibition partielle de l'adhésion de *C. difficile* à des cellules en culture par les protéines recombinantes et par des anticorps dirigés contre les parties N-terminale et C-terminale démontre les propriétés d'adhésines de cette protéine [99].

■ La protéine de liaison à la fibronectine Fbp68

La protéine Fbp68, qui présente des homologies avec d'autres protéines de liaison à la fibronectine présentes chez diverses espèces bactériennes, est associée à la surface de *C. difficile*. Elle est capable de se lier à la fibronectine en solution ou immobilisée ainsi qu'à d'autres composants de la matrice extracellulaire, comme le fibrinogène ou la vitronectine. Des anticorps dirigés contre Fbp68 entraînent une inhibition partielle de l'attachement de la bactérie à la fibronectine et à des cellules Vero en culture, ce qui indique que cette protéine pourrait avoir un rôle dans l'adhésion de *C. difficile* aux tissus hôtes [45].

■ La protéine de choc thermique GroEL

La protéine GroEL appartient à la famille des protéines chaperonnes Hsp60. Après un choc thermique à 48 °C, cette protéine est exprimée à la surface de la bactérie ainsi que dans le milieu extracellulaire ; parallèlement, l'adhésion de *C. difficile* à différentes cellules en culture est augmentée. Par ailleurs, des anticorps dirigés contre GroEL inhibent partiellement cette adhésion, suggérant un rôle de cette protéine dans l'adhésion de *C. difficile* [46].

■ Les flagelles

Les gènes *fliC* et *fliD*, codant respectivement la flagelline et la protéine de coiffe du flagelle, sont présents et exprimés chez toutes les souches de *C. difficile*, y compris les souches non flagellées. Ces deux protéines se lient au mucus caecal murin et FliD adhère fortement aux cellules Vero [93]. Les flagelles joueraient donc un rôle dans la colonisation en permettant l'échappement aux lavages par les fluides digestifs grâce à l'adhésion au mucus, la traversée de ce mucus grâce à la mobilité qu'ils confèrent à la bactérie et enfin en participant à l'adhésion aux entérocytes [94].

b. Facteurs enzymatiques

■ **Enzymes hydrolytiques**

Toutes les souches de *C. difficile*, toxinogènes ou non, produisent certaines enzymes telles une hyalurodinase, une chondroïtine-4-sulphatase et une collagénase ; l'activité enzymatique semble corrélée à la virulence des souches et à la quantité de toxines produites [88].

■ **Enzymes protéolytiques**

C. difficile présente une activité protéolytique de surface [76], plus importante chez les souches les plus virulentes [87].

La protéine Cwp84 (Clostridial Wall Protein de 84 kDa) codée par le gène *cwp84*, très conservé, est une cystéine protéase qui présente aussi une structure en trois domaines : peptide signal, domaine N-terminal catalytique, et domaine C-terminal homologue au domaine d'ancrage de l'autolysine CwlB de *B. subtilis* [85]. Cette protéase pourrait être impliquée soit dans la dégradation des tissus de l'hôte, soit dans la maturation de certaines protéines de la surface bactérienne [50].

c. Cluster de protéines de surface

Le gène codant pour cette protéase, *cwp84*, est situé au sein d'un cluster de gènes portant 17 cadres de lecture ouverts (ORF) orientés dans le même sens (Figure 2). Parmi eux, 11 présentent une structure similaire en trois domaines : peptide signal, domaine homologue au domaine d'ancrage pariétal N-terminal de l'autolysine CwlB de *B. subtilis* et domaine variable « fonctionnel » [55]. Au sein de ce cluster, sont présents différents gènes codant des protéines de surface de *C. difficile*, dont les gènes *slpA* et *cwp66*. Le gène *slpA* est cotranscrit de manière très importante, tout au long de la phase de croissance, avec le gène *orf6* situé en amont ; cette observation est corrélée au fait que les protéines de la couche S sont les protéines majoritaires de la surface bactérienne. Dans ce contexte, il est logique de penser que le gène *orf6* code aussi une protéine importante de la surface bactérienne, même si sa fonction est inconnue à ce jour [85]. Le gène *cwp66* est co-transcrit avec deux autres gènes dont les fonctions sont inconnues : *orf8*, qui possède une structure similaire en trois domaines, et *orf9* [85]. Deux autres cadres de lectures appartenant à ce cluster possèdent des homologies importantes avec des protéines connues : Orf7, analogue de SecA, et Orf12, amidase potentielle.

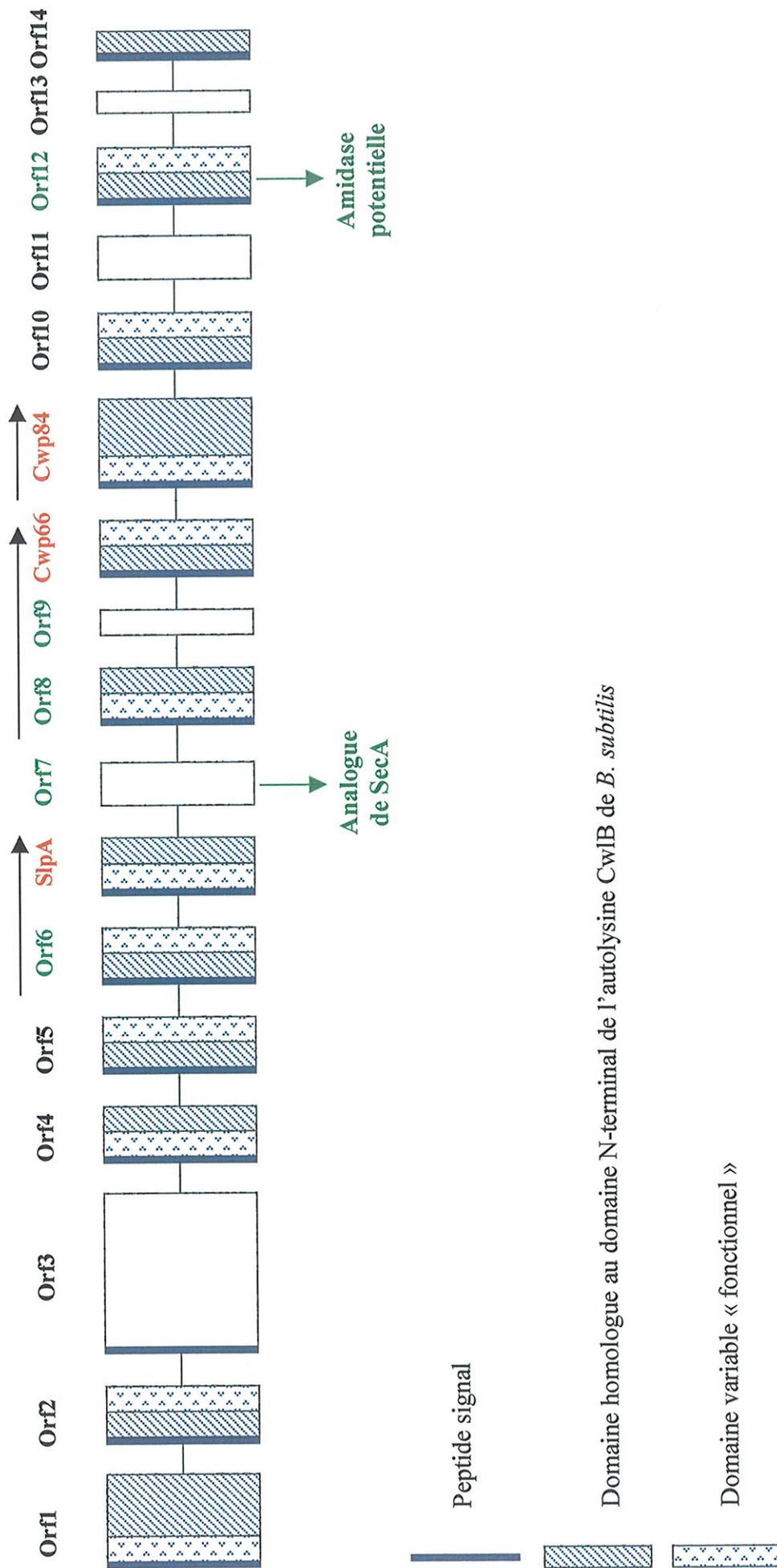


Figure 2. Organisation schématique du cluster de gènes de 37 kb codant pour les protéines de *Clostridium difficile*

5.2. Facteurs majeurs de virulence : les toxines A et B

a. Structure

Les toxines A et B de *C. difficile* sont des polypeptides de haut poids moléculaire, respectivement 308 et 270 kDa. Elles partagent une structure similaire, constituée de trois domaines : domaine catalytique, domaine de liaison aux récepteurs et domaine de translocation (Figure 3) [53].

Le domaine enzymatique, situé en position N-terminale, se compose de 546 acides aminés pour la toxine B et de 659 acides aminés pour la toxine A [34,48].

Le domaine C-terminal est constitué d'éléments répétitifs ou CROPs (combined repeated oligopeptides) de 20 à 50 acides aminés ; ces éléments sont indispensables pour la liaison des toxines à leurs récepteurs des cellules cibles ainsi qu'à leur endocytose [37]. La toxine A se lie au disaccharide Gal β 1-4GlcNac présent sur de nombreuses cellules humaines [58]. La toxine B se lie à un grand nombre de cellules, indiquant que son récepteur cellulaire, encore inconnu, est ubiquitaire [97].

Le domaine intermédiaire transmembranaire pourrait être responsable de la translocation de la toxine dans le cytosol. Cette translocation s'opère par endocytose, puis se produit une acidification de l'endosome ; une étude récente a démontré que seule la partie N-terminale (domaine enzymatique) de la toxine B est libérée de l'endosome pour gagner le cytosol [74].

b. Effets physiologiques

La toxine A est une entérotoxine létale et cytotoxique. Elle induit une inflammation intense avec infiltration massive de la muqueuse intestinale par des polynucléaires et des cellules mononuclées, une nécrose de l'épithélium intestinal et une accumulation de fluide dans le tube digestif [51]. La toxine B est une cytotoxine 100 à 1000 fois plus puissante que la toxine A mais possède aussi une activité entérotoxique inflammatoire [86]. Les deux toxines altèrent l'intégrité structurale des cellules en culture en désorganisant le cytosquelette d'actine.

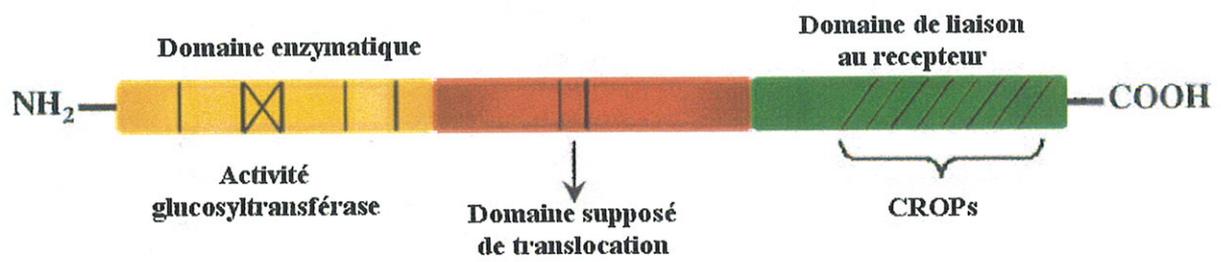


Figure 3. Structure des toxines A et B de *C. difficile*
[d'après Voth D.E. (97)]

c. Mécanisme d'action

Une fois libérées dans le cytosol de l'entérocyte, les toxines vont interagir avec leur cible moléculaire, les protéines de la famille Rho (Rho, Rac et Cdc42) qui possèdent un rôle fondamental dans le maintien de l'intégrité du cytosquelette d'actine et des jonctions intercellulaires.

Le domaine enzymatique de chaque toxine catalyse une réaction de glucosylation de ces protéines par transfert d'une molécule de glucose d'un UDP-glucose sur la thréonine en position 37 chez Rho ou en position 35 chez Rac et Cdc42 [77]. Cette inactivation entraîne alors une désorganisation des filaments d'actine au niveau basal et apical, ainsi que la dissociation de l'actine avec la protéine de la plaque cytoplasmique des jonctions serrées, ZO-1. L'altération des jonctions serrées des cellules épithéliales entraîne l'augmentation de la perméabilité para-cellulaire responsable de la diarrhée et favorise le passage des toxines vers la lamina propria (Figure 4) [73].

Les toxines A et B possèdent de plus une activité indirecte sur la lamina propria les rendant responsables d'une inflammation intense, via la production de cytokines (TNF α , IL-6, IL-8) et le recrutement des polynucléaires.

Enfin, ces deux toxines induisent l'apoptose par des phénomènes dépendants ou non de l'inactivation des protéines Rho [66,35].

Les différents effets des toxines A et B entraînent une inflammation intense avec destruction des cryptes intestinales et d'importantes lésions de l'épithélium. Les pseudomembranes observées dans les colites pseudo-membraneuses sont constituées de polynucléaires, de fibrine et de débris cellulaires.

d. Organisation génétique de l'élément toxigénique

Les toxines A et B sont codées par les gènes *tcdA* et *tcdB* présents sur un locus chromosomique de 19,6 kb. Cet élément toxigénique, ou locus de pathogénicité (PaLoc), est constitué, en plus des gènes codant TcdA et TcdB, de trois cadres de lecture ouverts supplémentaires : *tcdD* et *tcdE*, orientés dans le même sens que les gènes des toxines, et *tcdC* orienté en sens opposé (Figure 5). Les gènes *tcdA*, *tcdB*, *tcdD* et *tcdE* peuvent être transcrits sous forme d'un ARNm polycistronique de 17,5 kb ou sous forme d'ARNm

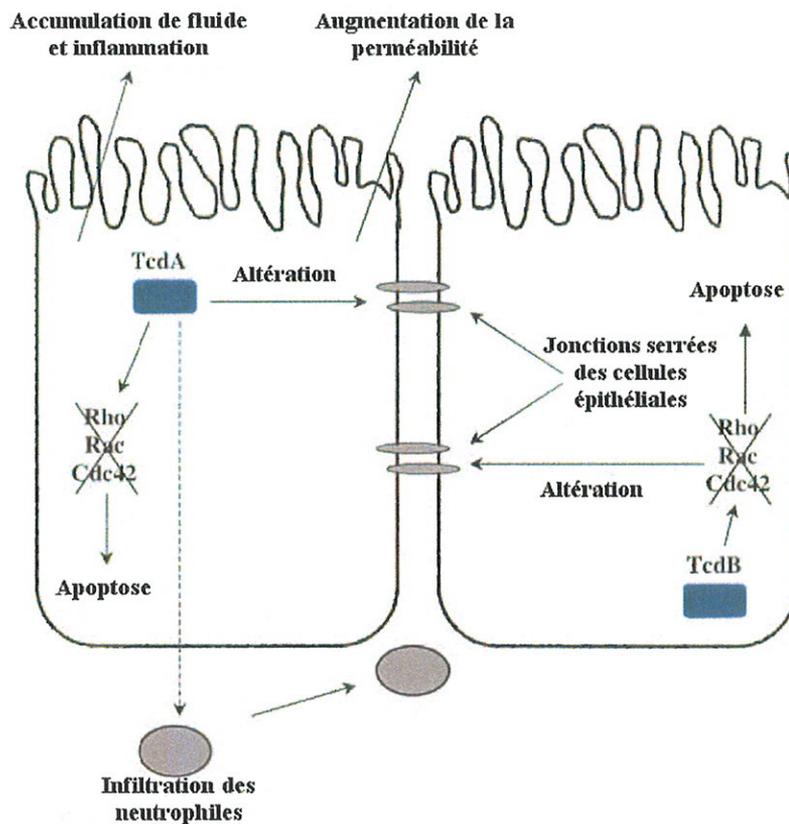
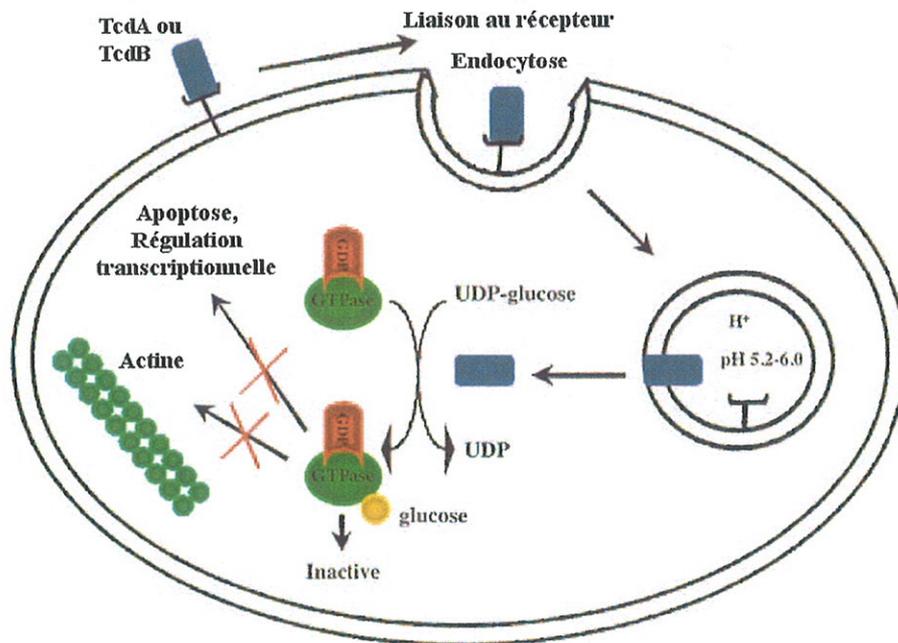


Figure 4. Mode d'action des toxines A et B [d'après Voith D.E. (97)]

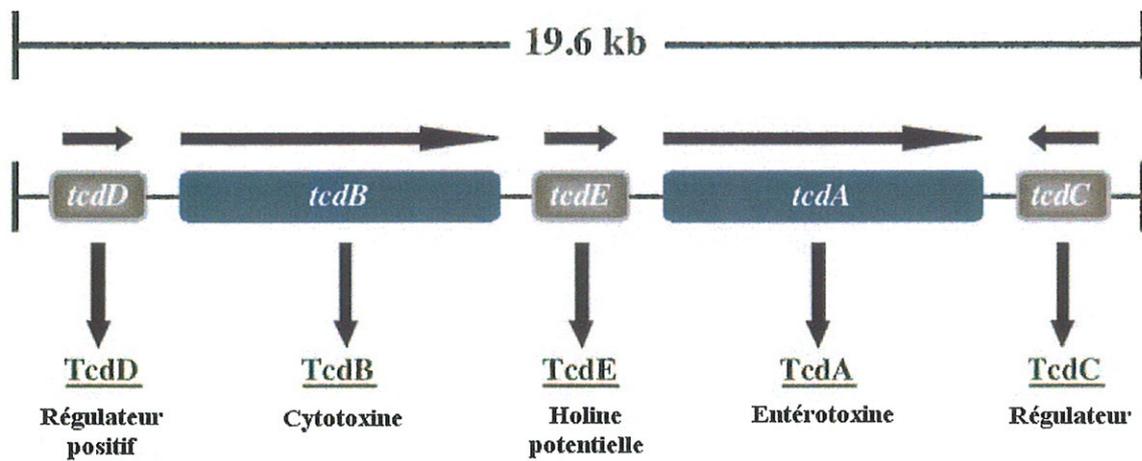


Figure 5. Organisation génétique du locus de pathogénicité de *C. difficile*
[d'après Voth D.E. (97)]

monocistroniques [43]. Chez les souches non toxigènes, un fragment de 127 bp occupe la place de cet élément toxigénique [42].

Le gène *tcdC* serait un régulateur négatif de l'expression de TcdA et TcdB [49], alors que *tcdD* agit comme un facteur sigma alternatif de RNA-Polymerase, exerçant ainsi un contrôle positif sur la régulation des toxines A et B [69,67]. TcdE, qui présente des homologies avec des protéines cytolitiques de bactériophages, les holines, agirait en lysant la membrane bactérienne, permettant ainsi la libération des toxines A et B dans le milieu extra-cellulaire [92].

e. Polymorphisme du locus PaLoc

L'étude du polymorphisme du locus PaLoc, et particulièrement des gènes *tcdA* et *tcdB*, a permis de classer les variants en vingt groupes, ou toxinotypes I à XX [80,81,82]. Parmi eux, se trouvent des toxinotypes particuliers, dont le toxinotype VIII, caractéristique des souches du sérotype F selon Delmée, délétes en toxine A. Des souches pathogènes de *C. difficile* ne produisant pas de toxine A ont été décrites à plusieurs reprises [14,64,95]. Ces souches portent une délétion sur le gène *tcdA* et apparaissent toxine A-négative avec les tests immunologiques commerciaux [64,80]. La pathogénicité de ces souches particulières pourrait s'expliquer par la présence d'une partie de la toxine A, par une modification de l'activité de la toxine B, ou encore par la présence d'une toxine hybride entre la toxine B et la toxine LT de *C. sordellii* [23].

Le modèle de pathogénicité de *C. difficile* est résumé dans la figure 6.

B. Régulation de l'expression des facteurs de colonisation et des facteurs de virulence

La régulation de l'expression des gènes bactériens en fonction des différents facteurs environnementaux permet une adaptation rapide des bactéries au milieu dans lequel elles se trouvent ; pour les bactéries pathogènes, ce phénomène est particulièrement important lorsqu'elles passent du milieu environnemental à leur hôte. Ainsi, la plupart du temps, les bactéries pathogènes n'expriment leurs facteurs de virulence (adhésines, exoprotéines à

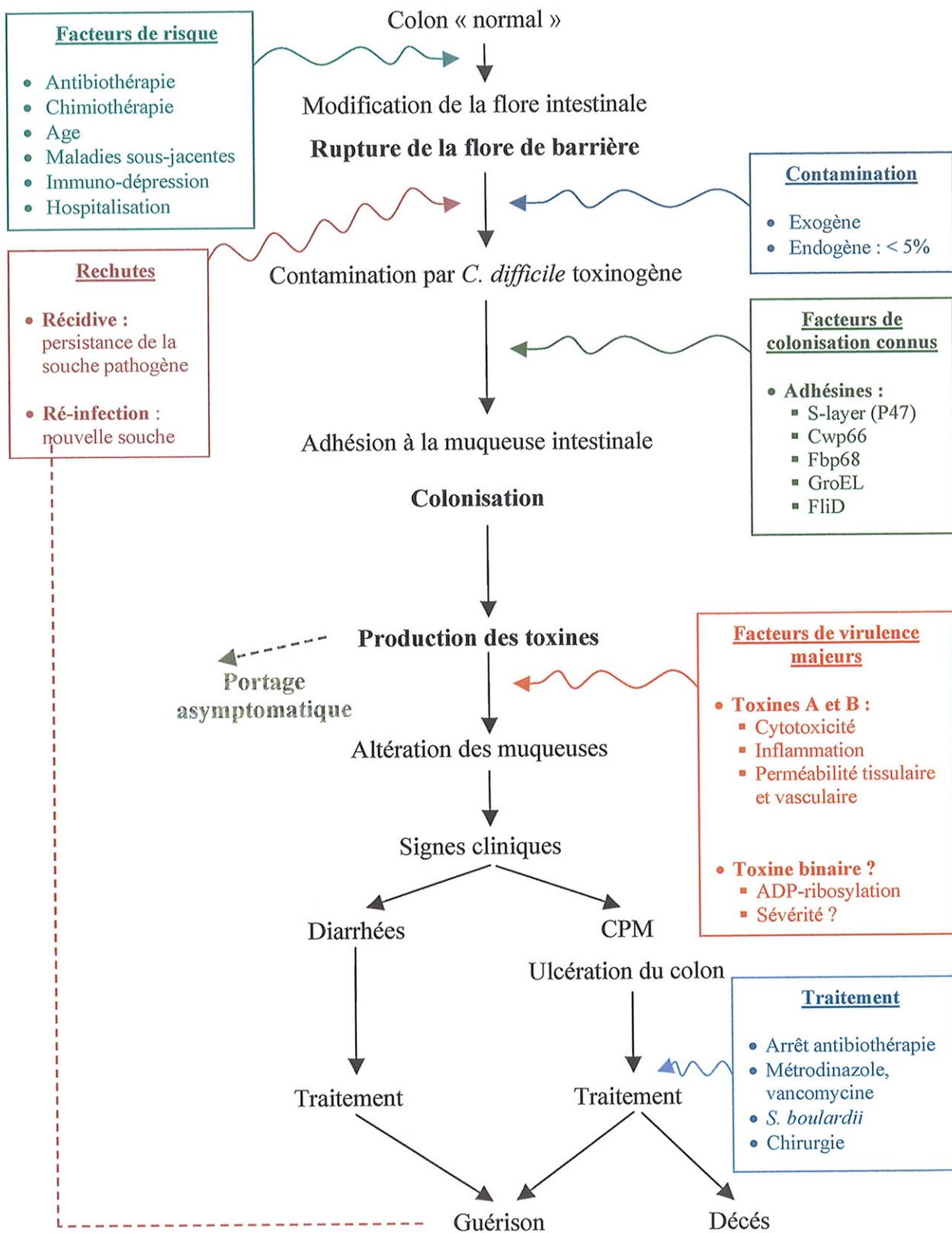


Figure 6. Physiopathologie des infections digestives liées à *C. difficile*.

[d'après M. Delmée (29) et F. Barbut (4)]

propriétés toxiques) que chez leur hôte. Elles répondent ainsi aux signaux environnementaux en mettant en jeu des systèmes complexes de régulation. De nombreux facteurs environnementaux peuvent exercer une régulation sur ces facteurs de virulence : antibiotiques, fer, osmolarité, température et pH, entre autres.

1. Exemples de régulation chez différentes bactéries

Les concentrations subinhibitrices d'antibiotiques, bien qu'étant incapables de tuer les bactéries mises en leur présence, peuvent interférer avec la colonisation et la virulence de certaines bactéries, aussi bien à Gram positif que à Gram négatif.

Le fer est un élément essentiel à la croissance de quasiment toutes les cellules vivantes ; il est nécessaire à de multiples fonctions cellulaires, en particulier aux systèmes enzymatiques. En raison de la quantité très limitée de fer libre dans les cellules de mammifères, les microorganismes ont dû développer des systèmes de capture du fer lié chez l'hôte : ces systèmes sont nécessaires à leur survie chez leur hôte et donc liés à leur virulence. Au même titre que d'autres facteurs comme l'osmolarité, la température ou le pH, la transition d'un milieu riche en fer à un milieu pauvre en fer est un marqueur important de l'environnement hôte qui entraîne la régulation de l'expression de nombreux gènes bactériens [25].

1.1. Régulation des facteurs de colonisation et d'adhésion

a. Régulation par des antibiotiques

Chez *Staphylococcus aureus*, des concentrations subinhibitrices de ciprofloxacine induisent une augmentation de l'expression de protéines liant la fibronectine, augmentant l'adhésion de certaines souches résistantes aux quinolones [12]. Chez *Listeria monocytogenes*, la pénicilline, l'amoxicilline associée à l'acide clavulanique ainsi que la vancomycine stimulent de manière significative l'adhésion à des cellules Hep-2 en culture [1].

En revanche, chez *Vibrio cholerae* et *Aeromonas hydrophyla*, ces mêmes antibiotiques entraînent une diminution de l'adhésion [1]. D'autres études ont montré une diminution de l'adhérence avec l'ofloxacine chez des souches uropathogènes d'*Escherichia coli* [6] et l'association piperacilline – tazobactam chez *Pseudomonas aeruginosa* [36].

b. Régulation par le fer

Des études récentes ont montré que le taux de fer libre dans l'environnement pouvait jouer un rôle dans la régulation des facteurs d'adhésion de certaines bactéries comme *S. aureus*. La protéine IsdA, impliquée dans l'adhésion de *S. aureus* à de nombreux ligands, tels le fibrinogène et la fibronectine, n'est exprimée que dans des conditions de privation de fer [25]. La protéine de surface FrpA, qui interviendrait dans l'adhérence de *S. aureus* aux supports inertes, n'est exprimée que dans des conditions de déplétion en fer, et le gène correspondant fait partie d'un opéron régulé par le senseur de fer Fur [71].

c. Régulation par d'autres facteurs environnementaux

Chez les Streptocoques du groupe B, commensaux de la flore vaginale, l'adhésion est maximale à pH 4, pH vaginal normal, par rapport à un pH neutre. Les protéines de surface semblent jouer un rôle dans cette adhésion, puisque le traitement des bactéries à la trypsine entraîne une baisse de 75 % de ce phénomène [91].

Chez les Streptocoques du groupe A, l'hyperosmolarité, ainsi qu'une température basse ou une déplétion en fer, entraîne une diminution de la transcription du gène *emm*, qui code pour la protéine M antiphagocytose [68]. En revanche, chez *Salmonella typhi*, l'hyperosmolarité entraîne une augmentation de l'expression des gènes d'invasion *cpxA*, *invG* et *prgH*, alors qu'un pH acide (pH 5) diminue leur expression [60].

Les taux d'oxygène et de dioxyde de carbone permettent également de réguler certains facteurs de colonisation. L'expression de la protéine F de *S. pyogenes*, responsable de l'adhésion à la fibronectine, est diminuée en présence de faibles concentrations d'O₂ [96].

1.2. Régulation des enzymes hydrolytiques et des toxines

a. Régulation par les antibiotiques

La synthèse de certains facteurs de virulence est inhibée en présence de concentrations subinhibitrices d'antibiotiques : c'est le cas chez *S. aureus* pour les α - et δ -hémolysines, la DNase, la lipase, la coagulase et la toxine du syndrome de choc toxique 1 (TSST-1) [38] ; des effets similaires ont été identifiés chez *Streptococcus pyogenes*, ou encore *Bacteroides fragilis*

[39,40]. Une étude plus récente a rapporté une inhibition de la transcription des gènes de certaines exoprotéines de *S. aureus*, dont *spa*, *hla* et *spr* (codant respectivement pour la protéine A, l' α -hémolysine et une sérine protéase) par des concentrations subinhibitrices de clindamycine [47]. La diminution de l'expression de certaines de ces protéines, ainsi que celle des entérotoxines A et B, de la β -hémolysine, entre autres, a aussi été rapportée avec le linézolide [9].

b. Régulation par le fer

De nombreuses toxines bactériennes sont régulées par le fer. C'est le cas de la toxine Shiga de *Shigella dysenteriae*, des toxines Shiga-like de *E. coli* entérohémorragique et de l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa*, chez qui l'expression est augmentée en condition de déplétion en fer ; en revanche, l'expression de la toxine diphtérique de *Corynebacterium diphtheriae* est augmentée en présence d'un milieu riche en fer [63].

c. Régulation par d'autres facteurs environnementaux

La composition en nutriments est aussi impliquée dans la régulation de certains facteurs de virulence : l'expression de la cystéine protéase SpeB de *S. pyogenes* est diminuée en présence de glucose, bien que cette enzyme ne contribue pas à l'obtention des nutriments essentiels à la bactérie [75]. De même, l'expression de SpeB et celle d'autres exoprotéines des Streptocoques du groupe A, est diminuée en présence de fortes concentrations d'O₂ et de faibles concentrations de CO₂ [72].

La diversité des facteurs environnementaux auxquels les bactéries répondent, soit par une régulation transcriptionnelle, soit par des modifications post-traductionnelles, leur permet une adaptation importante au milieu dans lequel elles se trouvent.

2. Régulation des facteurs de colonisation et de virulence de *C. difficile*

La régulation des différents facteurs impliqués dans la pathogénicité de *C. difficile* est encore assez peu connue, en particulier ce qui concerne les facteurs de colonisation.

2.1. Régulation environnementale des toxines A et B

La transcription des gènes *tcdA* et *tcdB* est soumise à une régulation par des facteurs environnementaux. L'expression des deux toxines est régulée par la température, grâce à l'action du facteur sigma TcdD sur leurs promoteurs : leur expression, faible à 22 et 42°C, devient maximale à 37°C, température de l'hôte, d'où le grand intérêt de cette régulation thermique [56]. La présence de glucose ou de sucres rapidement métabolisables dans le milieu en début de phase stationnaire diminue l'expression des deux toxines, ainsi que la transcription de *tcdD*, indiquant ainsi l'implication du facteur sigma dans la répression catabolique de ces deux toxines [31].

2.2. Régulation environnementale des facteurs de colonisation

L'adhérence de *C. difficile* à des cellules Vero en culture est modifiée par différents facteurs environnementaux ; il faut cependant noter que l'adhésion, maximale en phase stationnaire, est comparable chez les souches toxigènes et non toxigènes et qu'elle ne semble pas être augmentée par la production des toxines. L'adhésion de *C. difficile* aux cellules en culture est multipliée par trois en condition d'hyperosmolarité (NaCl 500 mM) ; l'hyperosmolarité entraînerait des modifications morphologiques et physico-chimiques, en particulier au niveau de l'hydrophobicité de la surface bactérienne, modifiant ainsi les propriétés adhésives. Un milieu riche en calcium permet également d'augmenter de plus de dix fois l'adhérence de *C. difficile* aux cellules, alors que le magnésium n'influence pas ce phénomène. La déplétion en fer permet aussi d'accroître l'adhésion ; cette augmentation des propriétés adhésives pourrait permettre à la bactérie d'adhérer et de coloniser les tissus cibles afin de faciliter l'acquisition de fer à partir de tissus encore sains. L'acidité du milieu entraîne également une augmentation de l'adhérence de *C. difficile* [98].

La régulation par des facteurs environnementaux de l'adhérence cellulaire est maintenant connue ; en revanche, la corrélation avec les différents facteurs d'adhésion de *C. difficile* n'a été mise en évidence que pour la protéine de choc thermique GroEL. En effet, différentes conditions de stress mimant les conditions physiologiques rencontrées par *C. difficile* au cours de son transit dans le tube digestif (choc osmotique, choc acide, déplétion en fer et concentration subinhibitrice d'antibiotique) augmentent la transcription du gène *groEL* et la production parallèle de la protéine GroEL [46].

TRAVAUX

PERSONNELS

OBJECTIFS

L'objectif général de ce travail est de continuer l'étude du cluster de protéines de surface présenté dans la revue bibliographique (Figure 2, page 19), dans le but de caractériser plus précisément son éventuelle implication dans la virulence bactérienne, et plus particulièrement dans l'étape de colonisation. Pour cela, notre travail s'est articulé autour de trois axes.

Le premier axe de recherche est l'analyse informatique (*in silico*) du génome environnant le cluster afin de mettre en évidence de nouveaux cadres de lecture présentant des homologies avec des protéines connues, et plus particulièrement avec des protéines de surface impliquées dans les phénomènes d'adhésion chez d'autres bactéries.

La deuxième partie du travail concerne la poursuite de l'étude du polymorphisme du cluster au sein de l'espèce de *C. difficile* afin de mettre en évidence une éventuelle corrélation entre le polymorphisme du cluster et la virulence ou le sérotype des souches.

Enfin, la dernière partie de cette étude a porté sur l'étude de la régulation des gènes *slpA*, *cwp66* et *cwp84* en fonction des conditions environnementales. Le but de cette étude est double : il s'agit tout d'abord de mettre en évidence l'éventuelle appartenance de ces gènes à un régulon, puis de vérifier l'existence d'une corrélation entre l'expression de ces gènes impliqués et la modulation de l'adhésion de la bactérie aux cellules en fonction des conditions environnementales [98].

MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. Analyse du génome environnant le cluster de protéines de surface

La séquence de la souche 630 de *Clostridium difficile* est désormais disponible dans sa totalité dans les banques de données (<http://www.sanger.ac.uk>). Le cluster de protéines de surface a été localisé au sein du génome de manière à identifier les séquences adjacentes situées en amont et en aval de ce cluster. Les cadres de lecture ouverts ont été recherchés sur internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), ainsi que les homologies avec des protéines connues (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

B. Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches sont conservées congelées à -80°C en présence de 20 % de glycérol. Elles sont cultivées sur gélose Columbia cystéine (Difco Laboratoires) additionnée de 5 % de sang de cheval (BioMérieux) (Annexe 1).

Les 27 souches de *C. difficile*, toxinogènes ou non et d'origines clinique et géographique variées, choisies pour l'étude du polymorphisme, sont décrites dans le tableau I. Ces souches sont cultivées en bouillon TGY (Tryptone Glucose Yeast, Difco Laboratoires, Annexe 1) régénéré, en anaérobiose à 37°C. Les souches 79-685, ATCC 46603 (Référence X) et GAI 95601 ont été choisies pour l'étude de la régulation du cluster.

C. Analyse du polymorphisme par PCR-RFLP

1. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN des 27 souches étudiées est réalisée à l'aide du kit GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Biosciences) selon le protocole détaillé par le fournisseur. L'extraction est faite à partir de 1,5 mL de culture en phase stationnaire ; l'ADN est élué dans 50 µL d'eau millipore stérile puis conservé à + 4°C. Une migration électrophorétique en gel d'agarose est réalisée sur le produit d'extraction de manière à vérifier la qualité de l'ADN.

Tableau I. Caractéristiques des souches de *C. difficile* étudiées

Sérogroupe	Nom des souches	Toxinotype	Origine clinique	Origine géographique
A	Réf. A ^{a)} (ATCC 43594) Kohn SE-810	A+ B+	CPM ^{b)}	Belgique
		A- B-	Enfant porteur asymptomatique ND ^{c)}	Angleterre France
B	Réf. B (ATCC 43593) CO 109	A- B-	Nouveau-né porteur asymptomatique	Belgique
		A- B-	ND	France
C	Réf. C (ATCC 43596) C 253 630	A+ B+	CPM	Belgique
		A+ B+	DPA ^{d)}	Italie
		A+ B+	CPM	Angleterre
D	Réf. D (ATCC 43597) 93136	A- B-	Adulte porteur asymptomatique	Belgique
		A- B-	Enfant porteur asymptomatique	France
F	Réf. F (ATCC 43598) 5168 GAI 95600 GAI 95601	A- B+	ND	Belgique
		A- B+	ND	Belgique
		A- B+	Enfant porteur asymptomatique	Japon
		A- B+	Adulte porteur asymptomatique	Japon
G	Réf. G (ATCC 43599) 95938	A+ B+	Nouveau-né porteur asymptomatique	Belgique
		A+ B+	CPM (rechute)	France
H	Réf. H (ATCC 43600) 93369 53444	A+ B+	CPM	Belgique
		A+ B+	Adulte porteur	France
		A- B-	ND	
I	Réf. I (ATCC 43601) 56026	A- B-	Nouveau-né porteur asymptomatique	Belgique
		A- B-	Enfant porteur asymptomatique	Belgique
K	Réf. K (ATCC 43602) 94416	A- B-	Nouveau-né porteur asymptomatique	Belgique
		A+ B+	CPM (rechute)	France
X	Réf. X (ATCC 43603) 36678	A- B-	Nouveau-né porteur asymptomatique	Belgique
		A- B+	ND	Belgique
S3	79685	A+ B+	CPM	France
	GAI 97480		ND	Japon

a) Ref : souches de référence du sérogroupe selon M. Delmée

b) CPM : colite pseudo-membraneuse

c) ND : non déterminée

d) DPA : diarrhée post-antibiotiques

2. PCR-RFLP

Les gènes choisis pour l'étude du polymorphisme du cluster sont les gènes *orf6*, *orf7*, *orf8*, *orf9* et *orf12* (Figure 2, page 19).

Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau II ; ces amorces ont été choisies à partir de la séquence de la souche 630 de *C. difficile*, dans les régions conservées, après comparaison avec des gènes homologues de bactéries proches comme *Bacillus subtilis*, lorsque cela était possible. L'amplification des 5 gènes à partir des ADN extraits des différentes souches a été réalisée avec le kit PuRE Taq Ready-To-Go beads PCR (Amersham Biosciences), dans un volume final de 25 µL. Les amorces sont utilisées à une concentration finale de 0,4 µM et la quantité de matrice ajoutée est de l'ordre de 200 à 300 ng. Toutes les PCR ont été réalisées sur le même schéma : cinq minutes de dénaturation à 94°C, puis 35 cycles d'amplification comprenant une minute de dénaturation à 94°C, une minute d'hybridation à température $T_M - 2^\circ\text{C}$, une minute d'élongation à 72°C, puis dix minutes d'élongation finale à 72°C. Les produits de PCR sont visualisés après migration en gel d'agarose 1% contenant du BET.

Les enzymes de restriction choisies pour l'étude par PCR-RFLP sont présentées dans le tableau III. Chaque produit de PCR est digéré par trois ou quatre enzymes : la digestion est effectuée sur 3 µL de produit de PCR avec 1 µL d'enzyme (Invitrogen, Biolabs) et 1 µL de tampon 10X correspondant dans un volume final de 10 µL, à 37°C, pendant deux heures. Les profils de digestion obtenus pour chaque souche sont comparés après migration électrophorétique en gel d'agarose 1,8 %.

D. Etude de la régulation du cluster d'intérêt

1. Choix des conditions de culture

Les conditions de culture étudiées pour la régulation du cluster par les facteurs environnementaux sont présentées dans le tableau IV.

Les concentrations de chlorure de sodium pour l'étude de l'influence de l'hyperosmolarité ont été choisies après des essais de culture en TGY supplémenté en chlorure de sodium 50 mM, 200 mM, 300 mM et 500 mM.

Tableau II. Amorces utilisées pour amplifier les gènes choisis pour l'étude de polymorphisme

Gène	Amorces	Séquence oligonucléotidique (sens 5' – 3')	Position sur le gène (pb)
<i>orf 6</i>	Orf 6 – S1	GAG TAT TAT CAA TAG GAT TGG	+17 / +37
	Orf 6 – S2	TCA TTA ATA ATG GCA GGA GC	+43 / +62
	Orf 6 – R1	GAG TAG CAT ACA CTT GTC C	+1567 / +1549
	Orf 6 – R2	AAC CCA AAT CCA GTA TAT GC	+1532 / +1513
<i>orf 7</i>	Orf 7 – S1	AGA TGA AAA CTG GTG AAG G	+296 / +314
	Orf 7 – R2	AGC ATC TAT ATG ATC TAI CC	+2196 / +2177
<i>orf 8</i>	Orf 8 – S1	CTG TAA TTA TGG CTG CTG C	+20 / +38
	Orf 8 – R1	GTC AAT TCA ACT CCA TTA CC	+1835 / +1816
	Orf 8 – R2	TTA CCA ACC TAG TAT TTT AGC	+1872 / +1852
<i>orf 9</i>	Orf 9 – S1	GAT ACA CAT GTC ATA TTA TGC	+37 / +57
	Orf 9 – R1	AGA TTT TAC TGA ATG ATA TCC	+603 / +583
<i>orf 12</i>	Orf 12 – S2	CAG GAA TGT TGT CTG TAG C	+32 / +50
	Orf 12 – R1	CAC ATT CAA CAA GTA TTG	+1924 / +1906

Tableau III. Enzymes de restriction utilisées pour l'étude du polymorphisme des gènes d'intérêt

Gène (taille)	Enzymes	Nombre de sites	Position des sites de coupure sur la souche 630
<i>orf6</i> (1587 pb)	<i>DraI</i>	3	+947, +1176, +1577
	<i>RsaI</i>	4	+830, +1136, +1394, +1413
	<i>AluI</i>	7	+124, +190, +365, +887, +1174, +1205, +1502
<i>orf7</i> (2346 pb)	<i>DraI</i>	7	+144, +347, +692, +1221, +1980, +2156, +2292
	<i>AfaI</i>	7	+371, +525, +590, +1113, +1617, +1995, +2150
	<i>HinI</i>	8	+13, +436, +628, +805, +1039, +1141, +1558, +1625
	<i>HindIII</i>	4	+872, +889, +1657, +2288
<i>orf9</i> (654 pb)	<i>AfaI</i>	2	+298, +641
	<i>DraI</i>	2	+345, +465
	<i>AluI</i>	4	+194, +349, +388, +619
<i>orf12</i> (2028 pb)	<i>AfaI</i>	5	+696, +995, +1005, +1116, +1323
	<i>DraI</i>	3	+183, +254, +377
	<i>SspI</i>	4	+662, +936, +974, +1582

Tableau IV. Conditions de culture étudiées pour la régulation du cluster

Condition de culture	Souches étudiées		
	79685	Ref. X	GAI95601
Témoin	TGY	TGY	TGY
Hyperosmolarité	NaCl 50 mM	NaCl 50 mM	NaCl 50 mM
	NaCl 200 mM	NaCl 200 mM	NaCl 200 mM
Concentration subinhibitrice d'antibiotique	Ampicilline 1 µg/mL (½ CMI)	Ampicilline 1 µg/mL (½ CMI)	Ampicilline 0,5 µg/mL (½ CMI)
Déplétion en fer	Déféroxamine 50 µM (¼ CMI)	Déféroxamine 50 µM (¼ CMI)	Déféroxamine 100 µM (¼ CMI)
Choc acide	PBS pH 4	PBS pH 4	PBS pH 4
Témoin choc acide	PBS pH 7,3	PBS pH 7,3	PBS pH 7,3

Les concentrations subinhibitrices d'antibiotique ont été choisies après détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'ampicilline pour les trois souches, en milieu liquide. Elles correspondent à la moitié de la CMI.

Les concentrations de chélateur de fer ont été choisies après détermination de la « CMI » de déféroxamine pour chacune des trois souches et correspondent au quart de la CMI.

Les souches sont cultivées de jour (environ 7 heures) pour l'obtention des bactéries en phase exponentielle ($DO \approx 0,6$) et de nuit (environ 15 heures) pour l'obtention des bactéries en phase stationnaire ($DO \approx 1,4$).

Chaque culture en conditions de stress a été divisée en trois aliquots, utilisés pour l'extraction des protéines de la couche S, l'extraction des protéines de surface et l'extraction des ARN.

Les bactéries sont centrifugées à 3000 g, 15 minutes à 4°C puis les culots sont soit utilisés immédiatement soit congelés à -80°C. Les conditions de choc acide sont produites en reprenant le culot bactérien dans 5 mL de tampon PBS à pH 4 pendant 30 minutes, à 37°C ; pour chaque culture, un témoin en PBS à pH 7,3 est effectué.

L'analyse de l'expression des protéines et des ARN est réalisée deux fois, à partir d'extractions distinctes réalisées après des cultures en phase stationnaire différentes.

2. Analyse de l'expression des protéines P36, P47, Cwp66 et Cwp84

2.1. Extraction des protéines de la couche S

Le protocole choisi pour l'extraction des protéines de la Couche S est l'extraction par la glycine [18]. Le culot bactérien est lavé deux fois, volume à volume, en tampon PBS, puis repris dans 100 μ L de glycine 0,2 M pH 2,2 et incubé 30 minutes à température ambiante. L'échantillon est centrifugé à 20000 g, 20 minutes à 4 °C, puis le surnageant est récupéré et neutralisé en tampon Tris 2 M. Les échantillons sont conservés à -20 °C, jusqu'à leur utilisation.

2.2. Extraction et dosage des protéines de surface

L'extraction des protéines de surface est réalisée selon une technique d'abrasement de la paroi bactérienne [100]. Le culot bactérien est lavé deux fois, volume à volume, en tampon PBS, puis repris dans 150 μ L de Tris 0,062 M, pH 6,8, auxquels sont ajoutés 0,25 g de billes de

verre de diamètre inférieur à 106 μm (Sigma) ; l'échantillon est vortexé à vitesse 5 pendant 4 minutes puis refroidi immédiatement dans la glace, avant d'être centrifugé à 20000 g, 20 minutes à 4 °C. Le surnageant est récupéré et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation. Les extraits de protéines de surface sont dosés par la technique de Bradford, à l'aide du réactif Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad), à 595 nm.

2.3. Analyse de l'expression des protéines

a. Expression des protéines de la couche S

Les extraits de protéines de la couche S sont analysés par migration électrophorétique en SDS-PAGE 5-12 % après dépôt d'un volume identique d'extraits pour toutes les conditions testées (20 μL). La coloration s'effectue au bleu de Coumassie. Les gels sont séchés grâce au système *GelAir Dryer* (Bio-Rad).

b. Expression des protéines totales de surface

Le profil global de protéines de surface est analysé par migration électrophorétique en SDS-PAGE 5-12 %, après dépôt d'une quantité identique de protéines pour toutes les conditions testées (15 μg). La coloration et le séchage sont réalisés comme indiqué ci-dessus.

c. Expression de Cwp66 et Cwp84

L'analyse de l'expression de Cwp66 et de Cwp84 est réalisée par Western-Blot. Après migration en SDS-PAGE, les extraits de protéines totales de surface sont transférés électriquement (système Lagon Hoefler) sur une membrane Hybond-P (Amersham-Biosciences) en tampon de transfert (Annexe 1), puis révélés avec des anticorps spécifiques. Les anticorps utilisés sont des anticorps anti-Cwp84 précédemment obtenus au laboratoire chez la souris et des anticorps anti-Cwp66-Cter obtenus précédemment chez le lapin (Agro-Bio) [99]. La membrane est saturée en tampon de blocage (TNT + 5 % lait écrémé, Annexe 1), puis mise en contact avec le premier anticorps pendant 2 heures : les anticorps anti-Cwp66 (partie C-ter) et anti-Cwp84 sont dilués respectivement au 1/2000 et au 1/1000 en tampon de

blochage. La membrane subit ensuite trois lavages de 10 minutes respectivement TNT + 0,1 % BSA - TNT + 0,1 % BSA + 0,1 % nonidet P40 - TNT + 0,1 % BSA. Les membranes sont ensuite incubées deux heures à température ambiante avec le deuxième anticorps conjugué à la phosphatase alcaline dilué au 1/20000 en tampon de blocage : anti-immunoglobuline G de lapin et anti-immunoglobulines polyvalentes de souris, pour les immuno-blots respectifs de Cwp66 et de Cwp84. La membrane est ensuite lavée comme précédemment. La révélation est effectuée en ajoutant 10 mL d'une solution de substrat de la phosphatase alcaline, le nitro blue tetrazolium, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) (Sigma), à l'abri de la lumière. Dès l'apparition de bandes, les membranes sont rincées abondamment à l'eau pour arrêter la réaction et sont ensuite séchées à l'abri de la lumière.

3. Analyse de l'expression des gènes *slpA*, *cwp66* et *cwp84*

3.1. Conditions de travail sur les ARN

Les manipulations se font dans une pièce réservée aux ARN, à température ambiante, avec des gants, des cônes filtrés, des microtubes certifiés « RNase-free ». Les réactifs utilisés sont réservés au travail sur les ARN.

La verrerie et matériel métallique utilisés sont chauffés à 200°C pendant huit heures afin d'éliminer toutes les RNases. Avant toute manipulation, la paille ainsi que le matériel ne pouvant être traité par la chaleur (boîtes de cônes, portoirs, extrémités des pipettes) sont nettoyés avec une solution de SDS à 2 %, puis rincée à l'eau RNase-free.

L'eau RNase-free est obtenue par traitement d'eau millipore stérile au diéthylpyrocarbonate (DEPC) 0,1 % (v/v) (Sigma) pendant une heure à 37°C, puis détoxifiée par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. L'eau DEPC est utilisée pour rincer le matériel décontaminé et pour préparer les tampons.

3.2. Extraction d'ARN

L'extraction des ARN totaux dans les différentes conditions de stress étudiées est effectuée par la méthode dite « au Trizol » [85], avec quelques modifications. L'extraction est faite sur 5 mL de culture en phase stationnaire (DO ≈ 1,4).

La culture est centrifugée à 4000 g, 10 minutes à 4 °C. Les culots bactériens sont soit traités immédiatement soit congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C avant un traitement ultérieur. Les ARN totaux sont repris en eau DEPC et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

3.3. Dosage des ARN totaux extraits

Les ARN extraits sont dosés dans un premier temps par la méthode spectrophotométrique par mesure de leur absorbance à 260 et 280 nm, après dilution au 1/200 en eau DEPC ; une unité d'absorbance à 260 nm correspondant à 40 ng/μL d'ARN ; un rapport $D.O_{260nm} / D.O_{280nm}$ supérieur à 1,65 traduit une extraction correcte.

Pour chaque extrait, une solution d'ARN diluée en eau DEPC à environ 200 ng/μL est alors analysée par le système Agilent 2100 Bioanalyser (Roche), à l'aide du kit RNA 6000 Nano Reagents & Supplies (Roche). Cette analyse comprend un dosage précis de l'extrait d'ARN, ainsi qu'une mesure des ARN 23S et 16S, dont le rapport reflète la qualité des ARN.

3.4. Analyse de l'expression des gènes par Northern-Blot

a. Migration électrophorétique des ARN totaux

La cuve d'électrophorèse utilisée est exclusivement réservée à la migration des ARN et soigneusement nettoyée avant chaque utilisation [83]. La migration des ARN s'effectue sur un gel d'agarose à 1,8 % en TBE 1X contenant 20 mM de thiocyanate de guanidine, afin de conserver les ARN sous forme dénaturée. Les dépôts sont constitués de 15 μg d'ARN, la migration se déroule à 70V pendant 6 heures.

b. Transfert et fixation des ARN :

Le transfert des ARN sur membrane Hybond™-N+ (Amersham-Biosciences) s'effectue par capillarité de nuit en tampon SSC 20X (Figure 7). Après le transfert, la membrane est récupérée et rincée délicatement en SSC 2X pour enlever les traces d'agarose, puis elle est séchée à l'air libre sur papier Whatmann. Les ARN sont fixés par chauffage 2 heures à 80°C

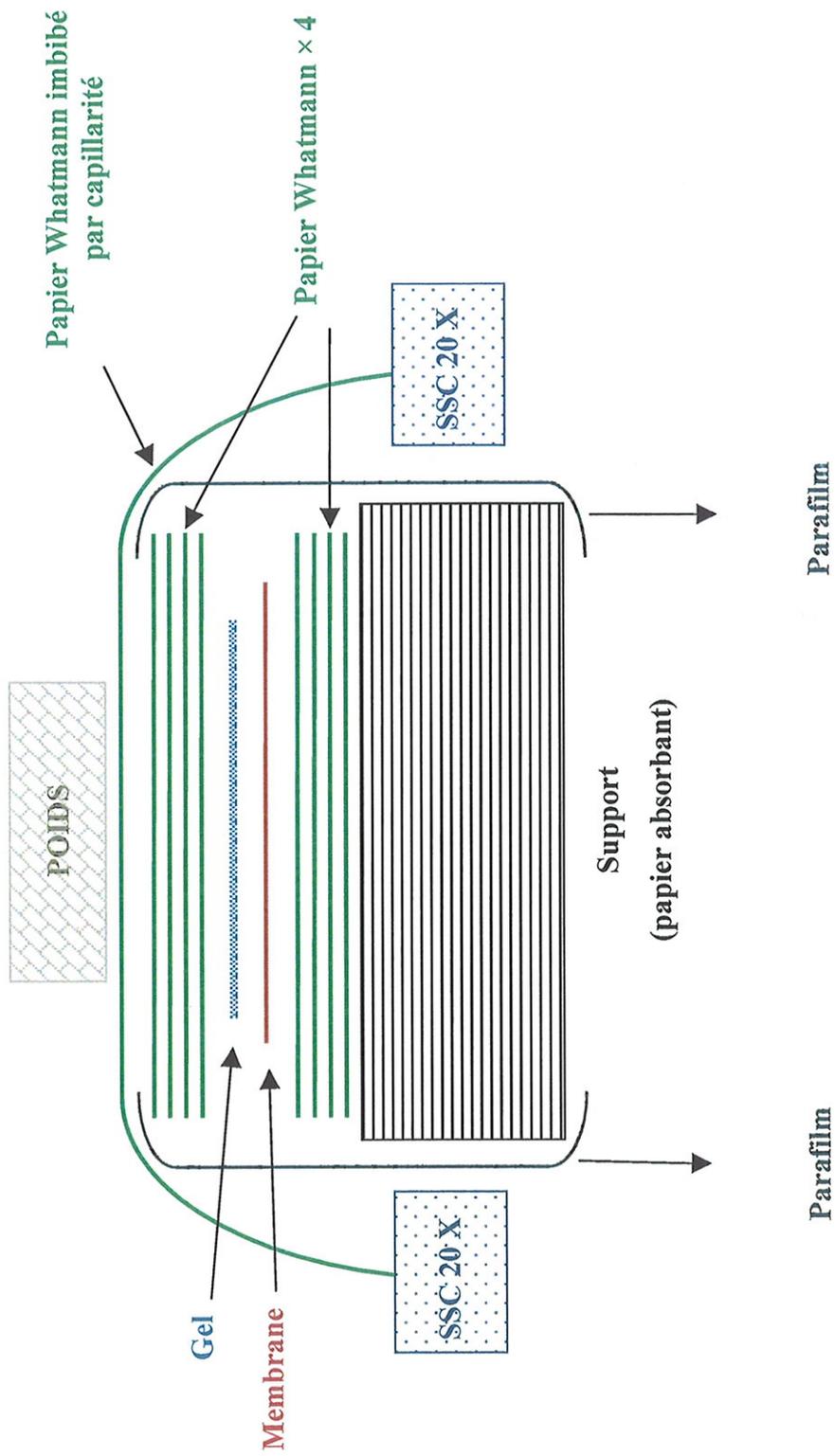


Figure 7. Montage du transfert par capillarité

en four à hybridation. Après la fixation, la membrane est conservée enveloppée dans du papier Saran à 4°C jusqu'à utilisation.

c. Préparation et marquage des sondes

Les sondes utilisées sont des produits de PCR amplifiés à l'aide d'oligonucléotides spécifiques des gènes *cwp84* et *slpA* [85] et purifiés avec le kit High Pure PCR Product Purification (Roche), selon le protocole détaillé par le fournisseur. Les produits de purification sont dosés par spectrophotométrie à 260 nm.

Le système de marquage utilisé est le kit CDP Star (Amersham Biosciences) permettant un marquage à la phosphatase alcaline. Le marquage du produit de PCR purifié et du marqueur de poids moléculaire se fait selon le protocole détaillé par le fournisseur.

La sonde marquée est utilisée extemporanément.

d. Préhybridation et hybridation

Le tampon d'hybridation est préparé extemporanément selon les indications du fournisseur (tampon d'hybridation + 0,5 M NaCl + 4 % « blocking reagent »).

La membrane est transférée dans un tube à hybridation contenant le tampon d'hybridation préchauffé à 55°C. La pré-hybridation est effectuée dans le four à hybridation à 55°C pendant 30 minutes. La sonde marquée spécifique et la sonde de poids moléculaire marquée sont ajoutées dans le tube et l'hybridation est effectuée à 55°C pendant toute une nuit sous agitation.

e. Lavages

La membrane est transférée dans un nouveau tube à hybridation et subit deux lavages successifs en tampon de lavage I (300 mL, Annexe 1), à 55°C pendant 15 minutes sous agitation. La membrane est ensuite transférée dans un troisième tube à hybridation et subit deux lavages successifs à température ambiante pendant 5 minutes en tampon de lavage II (300 mL, Annexe 1).

f. Détection – CDP-Star

La membrane est égouttée et placée sur un papier non absorbant. Un volume adéquat de réactif de détection est déposé sur la membrane, incubée à température ambiante pendant 2 à 3 minutes. La membrane égouttée est ensuite enveloppée dans du papier Saran, puis placée dans une cassette au contact d'un film autoradiographique. L'exposition dure environ une heure, puis le film est développé.

3.5. Analyse de l'expression des gènes par PCR en temps réel

a. Synthèse de l'ADN complémentaire

La synthèse de l'ADNc est effectuée à partir de 5 µg d'ARN totaux par transcription inverse avec l'enzyme SuperScript™ III RNase-H (Invitrogen) dans un volume final de 20 µL. L'efficacité de la réaction étant estimée à 100%, on considère que l'on obtient 5 µg d'ADNc, soit une concentration de 250 ng/µL. Les désoxynucléotides et les hexamères aléatoires sont ajoutés à l'ARN à la concentration finale de 0,5 mM et 12 ng/µL respectivement. L'échantillon est alors dénaturé cinq minutes à 65°C, puis refroidi quelques minutes dans la glace ; sont ajoutés 4 µL de tampon 5X, 40 U d'inhibiteur de RNase (RNase-out, Invitrogen), 5 mM de DTT et 200 U d'enzyme, puis le mélange est incubé 5 minutes à 25°C. La réaction est alors effectuée à 50°C pendant une heure, puis les enzymes sont inactivées par une incubation de 15 minutes à 70°C.

Les échantillons sont conservés à -20°C avant d'être amplifiés par PCR.

b. PCR en temps réel

Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau V. Ces amorces ont été choisies à l'aide du logiciel en ligne Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Les amorces permettant d'amplifier les gènes *slpA*, *cwp66* et *cwp84* ont été choisies dans les régions des gènes conservées entre les souches 79685 et Réf.X. Les amorces permettant d'amplifier les gènes de normalisation *16Srrna* d'une part, *gluD* et *gyrA* d'autre part, codant respectivement l'ARNr 16S, la glutamate-deshydrogénase et la gyrase, ont été choisies sur la séquence de la souche 79685 pour l'ARN 16S et de la souche 630 pour *gluD* et *gyrA*.

Tableau V. Amorces utilisées pour la PCR en temps réel

Gènes	Amorces	Séquence 5'-3'	Position (pb)	Amplicon (pb)	pb	Tm (°C)	N° accès (GenBank)	
<i>cwp84</i>	Cwp84-F	TGG TGG AAA ATA TGG ATG GAA	+400 - +420	143	21	60	AY212146.1	
	Cwp84-R	TAG TTG CAC CTT GTG CCT CA	+523 - +542		20	60		
	<i>cwp66</i>	Cwp66-F	TTG GTG GCT TAG GTA ATG AAG A	+159 - +180	123	22	59	AY211612.1
		Cwp66-R	CAT CAT TTG CAT CTG CCT TTT	+261 - +281		21	60	
Gènes d'intérêt	P36-F	TGA TGC TGC TGA AAA ATT CC	+364 - +383	120	20	59	AY004256.1	
	P36-R	CCA TCA GCC ATT ACT AGA CCA G	+462 - +483		22	59		
	P47-F	AAT GAT AAA GCA TTT GTA GTT GGT G	+1571 - +1594	125	25	59	AY004256.1	
	P47-R	ATT GGA GTA GCA TCT CCA TCA	+1675 - +1695		21	57		
<i>16Srrna</i>	ARN-F	GGG AGA CTT GAG TGC AGG AG	+597 - +616	120	20	60	AF072474	
	ARN-R	GTG CCT CAG CGT CAG TTA CA	+697 - +716		20	60		
<i>gyrA</i>	GyrA-F	CTC GTA TTG TTG GGG ACG TT	+382 - +401	146	20	60		
	GyrA-R	ATC CCC ATC AAC AGA ACC AA	+508 - +527		20	60		
<i>gluD</i>	GluD-F	ATG CAG TAG GGC CAA CAA AA	+195 - +214	135	20	60	M65250.1	
	GluD-R	TTC CAC CTT TAC CTC CAC CA	+309 - +328		20	60		

La PCR est réalisée avec le kit Light Cycler Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green I sur le thermocycleur LighCycler (Roche Diagnostics). Le système de détection des produits formés est ici l'agent intercalant SYBR[®] Green.

Les PCR sont réalisées dans un volume final de 10 µL, comprenant 5 µL d'une solution diluée de matrice d'ADNc et 5 µL de mélange constitué du réactif de PCR et des amorces spécifiques de chaque gène à la concentration finale de 0,5 µM. Le programme thermique inclut, pour tous les gènes étudiés, une dénaturation de 8 minutes à 95°C, puis 45 cycles comprenant chacun une dénaturation de 5 secondes à 95°C, une hybridation de 5 secondes à 60°C et une élongation de 6 secondes à 72°C. L'amplification est suivie d'une étape de fusion constituée d'une dénaturation de 10 secondes à 95°C, d'une réassociation des brins pendant 30 secondes à 70 °C, puis d'une fusion lente par chauffage à 95°C, à la vitesse de 0,1°C par seconde, au lieu de 20°C/s à toutes les autres étapes.

L'intensité de fluorescence due à l'incorporation de l'intercalant (SYBR Green I) dans l'ADN double-brin, qui est proportionnelle à la quantité d'ADN formé, est mesurée par l'appareil à chaque cycle en fin d'élongation, ainsi que tout au long de l'étape de fusion. Les résultats de la PCR sont exprimés en valeur de Ct (« cycle threshold », ou cycle seuil), qui correspond au nombre de cycles d'amplification nécessaires pour que la fluorescence dépasse le seuil de détection du fluorimètre. Le Ct est inversement proportionnel au logarithme du nombre de copies N_0 du transcrit présent dans l'échantillon d'ARN de départ, d'après la loi de la PCR : $N = N_0 (1+E)^n$, avec n le nombre de cycles et N le nombre de copies présent au cycle n.

L'efficacité E de la PCR pour chaque couple d'amorces est déterminée à l'aide d'une gamme de dilutions de la matrice d'ADNc : elle est calculée à partir de la pente k de la droite $Ct = f(\log[ADNc])$, à l'aide de l'équation $E = 10^{-1/k} - 1$. Une PCR de bonne qualité est caractérisée par une efficacité comprise entre 90 et 100 %.

Les gènes de normalisation sont choisis pour leur stabilité d'expression chez les bactéries dans les différentes conditions de stress étudiées.

Les résultats que nous avons obtenus sont exprimés en expression relative. Le calcul de ce rapport (R) est effectué par la différence des Ct (« méthode du $\Delta\Delta Ct$ »), avec normalisation sur chaque gène de référence (ARN16S, gyrase et glutamate-deshydrogénase), à l'aide de l'équation suivante :

$$R = (1+E_{\text{cible}})^{Ct_{\text{cible}}(\text{calibreur}) - Ct_{\text{cible}}(\text{échantillon})} \times (1+E_{\text{ref}})^{Ct_{\text{ref}}(\text{calibreur}) - Ct_{\text{ref}}(\text{échantillon})}$$

La cible représente le gène étudié et la référence le gène de normalisation ; le calibreur représente la condition témoin (culture témoin en bouillon TGY) et l'échantillon chacune des conditions de stress étudiées.

RÉSULTATS

A. Analyse du génome environnant le cluster de protéines de surface

Après localisation du cluster de protéines de surface au sein du génome de la souche 630 de *C. difficile*, 12 nouveaux cadres de lecture ouverts (Orf), de taille supérieure à 500 pb, ont été identifiés dans les séquences adjacentes (12000 pb situées en amont et en aval du cluster) déterminant ainsi un cluster élargi (Figure 8).

Les homologies retrouvées avec des protéines connues sont présentées dans le tableau VI.

La protéine Orf-1 présente une quasi-identité de séquence dans la région comprise entre les acides aminés 141 et 379 avec des ribosyltransférases agissant sur le transfert de la queuosine sur l'ARN de transfert (ARNt). La queuosine est un nucléotide hypermodifié présent à la première position des anticodons des ARNt de l'asparagine, l'aspartate, l'histidine et la tyrosine [32].

La protéine Orf-3 montre une forte homologie avec une queuosine-synthétase sur les 217 premiers acides aminés.

La protéine Orf-4 montre une homologie presque totale avec l'hélicase RuvB, impliquée dans la réparation de l'ADN [19].

La protéine Orf-7 est identique à une protéine non caractérisée mais conservée chez différentes bactéries et dont la fonction est inconnue.

La protéine Orf-8 est un homologue de la perméase GntP impliquée dans le transport et le métabolisme des acides aminés.

La protéine Orf15 montre une forte homologie avec la protéine MviN, qui serait un facteur de virulence potentiel présent à la surface de certaines bactéries comme *Clostridium tetani* ou *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [15].

La protéine Orf16 montre des homologies importantes avec différents domaines de phosphoglucomutase/phosphomannomutase présente chez différentes bactéries (*Clostridium* et *Bacillus*). Cette enzyme catalyse la conversion du glucosamine-6-phosphate en glucosamine-1-phosphate, étape nécessaire à la formation de l'UDP-N-acetylglucosamine, constituant essentiel du peptidoglycane.

Les protéines Orf17, Orf20, Orf22 et Orf25 présentent des homologies avec différentes protéines impliquées dans la biosynthèse des membranes bactériennes.

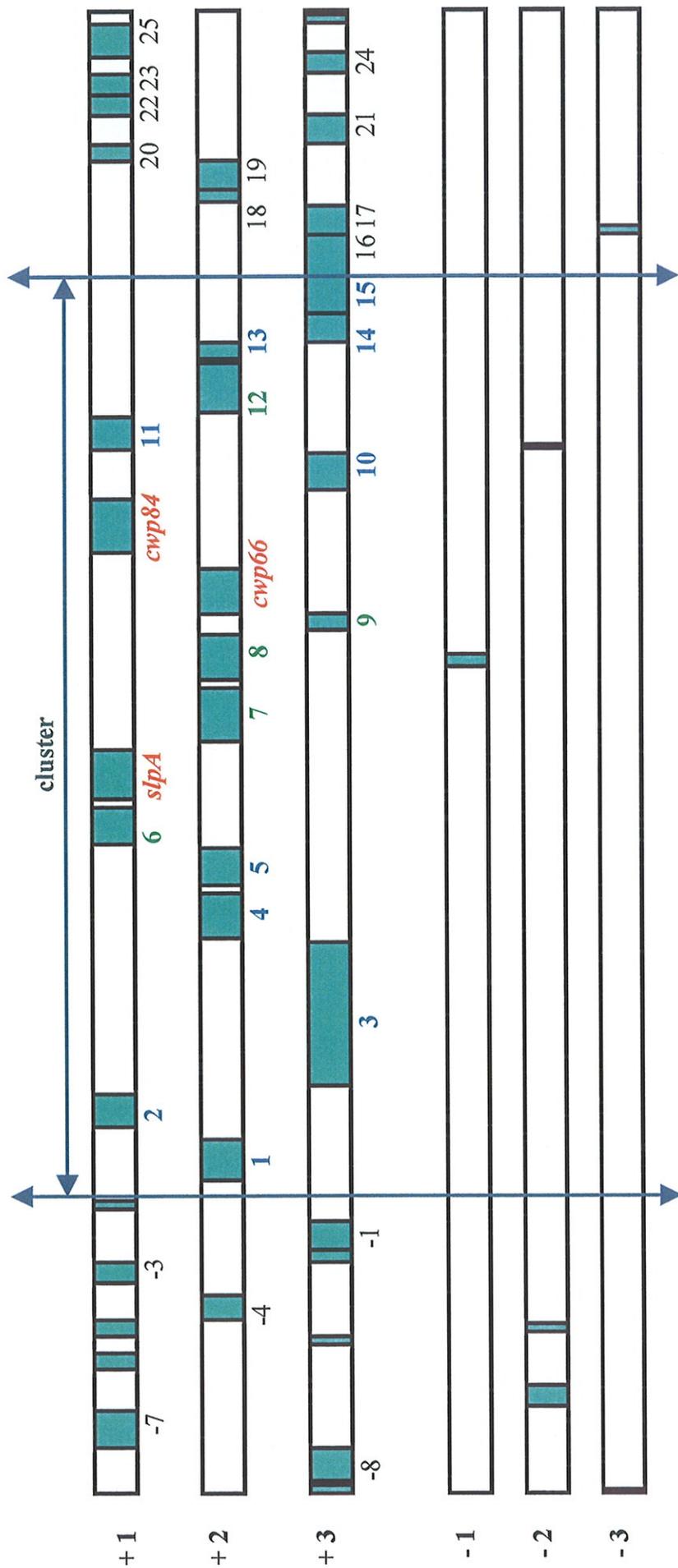


Figure 8. Organisation schématique de l'environnement du cluster de protéines de surface

(+1, +2, +3, -1, -2, -3 : cadres de lecture)

Tableau VI. Homologies retrouvées avec des protéines connues pour les cadres de lecture ouverts identifiés en amont et en aval du cluster de protéines de surface

Nom du cadre de lecture ouvert	Taille (pb)	Taille (AA)	Homologie
<i>Orf-1</i>	1140	379	queuosine ribosyltransférase (98-99%) (<i>Clostridium thermocellum</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>)
<i>Orf-3</i>	942	313	queuosine synthétase (87%) (<i>Clostridium perfringens</i>)
<i>Orf-4</i>	1020	339	RuvB (hélicase) (99,7%) (<i>Bacillus cereus</i>)
<i>Orf-7</i>	1437	478	Protéine conservée chez les bactéries mais non caractérisée, fonction inconnue (99,8%) (<i>Haemophilus</i>)
<i>Orf-8</i>	1383	460	GntP perméase (95,9%)
<i>Orf15</i>	1557	518	MviN (facteur de virulence potentiel) (95%) (<i>Clostridium tetani</i>)
<i>Orf16</i>	1707	568	Phosphomannomutase/Phosphoglucomutase (80-95%) (<i>Clostridium sp</i> , <i>Bacillus sp</i>)
<i>Orf17</i>	1074	357	Mannose-1-phosphateguanyltransférase (100%)
<i>Orf20</i>	840	279	Glycosyltransférase (94%)
<i>Orf21</i>	1191	396	Glycosyltransférase (90-95%)
<i>Orf22</i>	750	249	Glycosyltransférase (94%)
<i>Orf25</i>	1368	455	Glycosyltransférase (98-100%)

B. Analyse du polymorphisme des gènes *orf6*, *orf7*, *orf8*, *orf9* et *orf12*

1. Amplification des gènes

Les essais d'amplification pour les 5 gènes étudiés sont présentés dans le tableau VII.

Le gène *orf6* a pu être amplifié à partir des ADN extraits des 27 souches testées en combinant différentes températures d'hybridation et différents couples d'oligonucléotides.

Le gène *orf7* a été amplifié pour toutes les souches avec le couple d'oligonucléotides S1/R2 à la température d'hybridation de 52°C.

L'amplification du gène *orf8* a été obtenue pour 26 souches avec le couple d'oligonucléotides S1/R1 mais des bandes aspécifiques ont été retrouvées pour 23 souches avec une température d'hybridation de 54°C ou 57°C. Trois autres couples (S1/R2, S2/R1 et S2/R2) ont été testés sur la souche 630 à la température de 54°C : seul le couple S1/R2 a permis d'éliminer la présence de bandes aspécifiques, mais les souches testées par la suite n'ont pas été amplifiées. Ce gène n'a donc pas pu faire l'objet d'une étude du polymorphisme.

L'amplification du gène *orf9* a été obtenue à partir des extraits d'ADN des 27 souches avec le couple d'oligonucléotides S1/R1 à la température d'hybridation de 54°C, de même que l'amplification du gène *orf12* avec le couple d'oligonucléotides S2/R1 à la température d'hybridation de 52°C.

2. Polymorphisme du gène *orf6*

La digestion du produit d'amplification du gène *orf6* avec les enzymes *DraI*, *RsaI* et *AluI* a permis d'obtenir respectivement 5, 9 et 8 empreintes différentes pour la totalité des 27 souches (Annexe 2). Pour chaque souche, la combinaison des 3 empreintes aboutit à un profil global : 16 profils différents ont ainsi été identifiés parmi les 27 souches (Tableau VIIIa).

Tableau VII. Amplification des gènes d'intérêt pour l'étude du polymorphisme

Couple d'amorces	Température d'hybridation	Souches amplifiées
Orf 6 – S1/R1	54°C	24
Orf 6 – S1/R1	48°C	1
Orf 6 – S1/R2	56°C	1
Orf 6 – S2/R2	56°C	1
Orf 7 – S1/R2	52°C	27
Orf 8 – S1/R1	54°C	26 ^{a)}
Orf 8 – S1/R1	57°C	26 ^{a)}
Orf 8 – S1/R2	56°C	0/5
Orf 9 – S1/R1	54°C	27
Orf 12 – S2/R1	52°C	27

^{a)} présence de bandes aspécifiques pour 23 souches

Tableau VIIIa. Empreintes et profil global du gène orf6

chez les 27 souches étudiées

n°	Souches	DraI	RsaI	AluI	Profil global
1	630	1	1	1	1
2	Réf.A	2	2	2	2
3	Réf.B	2	3	2	3
4	Réf.C	1	1	1	1
5	Réf.D	3	4	3	4
6	Réf.F	1	5	5	5
7	Réf.G	1	6	6	6
8	Réf.H	4	7	3	7
9	Réf.I	1	6	6	6
10	Réf.K	1	6	5	9
11	Réf.X	1	5	7	10
12	79685	1	6	6	6
13	GAI 95600	1	5	5	5
14	GAI 95601	1	5	5	5
15	GAI 97480	1	6	6	6
16	Kohn	1	8	5	11
17	C 253	1	1	1	1
18	93136	3	4	3	4
19	93369	4	7	4	8
20	95938	1	1	6	12
21	94416	1	9	5	13
22	56026	5	9	8	14
23	53444	3	7	4	15
24	5168	1	5	5	5
25	CO 109	1	5	7	10
26	SE 810	1	6	6	6
27	36678	1	9	7	16

Tableau VIIIb. Empreintes et profil global du gène orf7

chez les 27 souches étudiées

n°	Souches	DraI	AfaI	HinfI	HindIII	Profil global
1	630	1	1	1	1	1
2	Réf.A	2	2	2	2	2
3	Réf.B	2	2	2	2	2
4	Réf.C	1	1	1	1	1
5	Réf.D	2	2	2	2	2
6	Réf.F	1	1	1	3	3
7	Réf.G	3	3	3	1	4
8	Réf.H	4	2	2	2	5
9	Réf.I	5	1	1	1	6
10	Réf.K	6	4	1	1	7
11	Réf.X	6	5	1	1	8
12	79685	6	5	1	1	8
13	GAI 95600	6	1	1	3	9
14	GAI 95601	6	1	1	3	9
15	GAI 97480	3	3	3	1	4
16	Kohn	8	1	4	1	10
17	C 253	6	1	1	1	11
18	93136	2	2	2	2	2
19	93369	4	2	2	2	5
20	95938	3	7	1	1	12
21	94416	6	4	1	1	7
22	56026	7	6	5	4	13
23	53444	2	2	2	2	2
24	5168	6	1	1	3	9
25	CO 109	6	1	1	1	11
26	SE 810	9	8	6	2	14
27	36678	6	5	1	1	8

3. Polymorphisme du gène *orf7*

La digestion du produit d'amplification du gène *orf7* avec les enzymes *DraI*, *AfaI*, *HinI* et *HindIII* a permis d'obtenir respectivement 9, 8, 6 et 4 empreintes différentes pour la totalité des 27 souches (Annexe 2). La combinaison des 4 empreintes de chaque souche aboutit à un profil global : 14 profils différents ont été identifiés pour les 27 souches (Tableau VIIIb).

4. Polymorphisme du gène *orf9*

La digestion du produit d'amplification du gène *orf9* avec les enzymes *AfaI*, *DraI* et *AluI* a permis d'obtenir respectivement 4, 3 et 6 empreintes différentes pour la totalité des 27 souches (Annexe 2). La combinaison des 3 empreintes de chaque souche aboutit à un profil global : 6 profils différents ont été identifiés pour les 27 souches (Tableau VIIIc).

5. Polymorphisme du gène *orf12*

La digestion du produit d'amplification du gène *orf12* avec les enzymes *AfaI*, *DraI* et *SspI* a permis d'obtenir respectivement 3, 2 et 3 empreintes différentes pour la totalité des 27 souches (Annexe 2). La combinaison des 3 empreintes de chaque souche aboutit à un profil global : 5 profils différents ont été identifiés pour les 27 souches (Tableau VIII d).

C. Etude de la régulation du cluster d'intérêt

1. Analyse de l'expression des protéines P36, P47, Cwp66 et Cwp84

1.1. Analyse de l'expression des protéines de la couche S (P36 et P47)

La migration des extraits de protéines de la couche S sur gel SDS-PAGE permet d'obtenir un profil particulier avec deux bandes principales correspondant à la P47 (bande d'environ 50 kDa) et à la P36 (bande d'environ 40 kDa).

Tableau VIIIc. Empreintes et profil global du gène *orf9*

chez les 27 souches étudiées

n°	Souches	AfaI	DraI	AluI	Profil global
1	630	1	1	1	1
2	Réf.A	4	2	2	2
3	Réf.B	4	2	2	2
4	Réf.C	1	1	1	1
5	Réf.D	1	3	3	3
6	Réf.F	1	1	4	4
7	Réf.G	1	1	1	1
8	Réf.H	2	2	5	5
9	Réf.I	3	1	6	6
10	Réf.K	1	1	1	1
11	Réf.X	1	1	1	1
12	79685	1	1	1	1
13	GAI 95600	1	1	4	4
14	GAI 95601	1	1	4	4
15	GAI 97480	1	1	1	1
16	Kohn	1	1	1	1
17	C 253	1	1	1	1
18	93136	1	3	3	3
19	93369	2	2	5	5
20	95938	1	1	1	1
21	94416	1	1	1	1
22	56026	3	1	6	6
23	53444	2	2	5	5
24	5168	1	1	4	4
25	CO 109	3	1	6	6
26	SE 810	1	1	1	1
27	36678	1	1	1	1

Tableau VIIIId. Empreintes et profil global du gène *orf12*

chez les 27 souches étudiées

n°	Souches	AfaI	DraI	SspI	Profil global
1	630	1	1	1	1
2	Réf.A	2	1	1	2
3	Réf.B	2	1	1	2
4	Réf.C	1	1	1	1
5	Réf.D	1	1	1	1
6	Réf.F	3	2	1	3
7	Réf.G	1	1	1	1
8	Réf.H	2	1	1	2
9	Réf.I	1	1	1	1
10	Réf.K	1	1	1	1
11	Réf.X	3	2	1	3
12	79685	1	1	1	1
13	GAI 95600	3	2	1	3
14	GAI 95601	3	2	1	3
15	GAI 97480	1	1	1	1
16	Kohn	1	1	1	1
17	C 253	1	1	1	1
18	93136	1	1	1	1
19	93369	2	1	1	2
20	95938	1	1	1	1
21	94416	1	1	1	1
22	56026	1	1	1	1
23	53444	1	1	1	1
24	5168	3	2	1	3
25	CO 109	3	2	1	3
26	SE 810	1	1	2	4
27	36678	3	2	3	5

L'expression des deux protéines de la couche S, P36 et P47, paraît diminuée en présence de concentration subinhibitrice d'ampicilline et augmentée en présence de déféroxamine en phase stationnaire, et ce pour les trois souches étudiées 79685, Réf.X et GAI 95601. En revanche, les conditions d'hyperosmolarité (NaCl 50 et 200 mM), aussi bien en phase stationnaire qu'en phase exponentielle, ne semblent pas modifier l'expression de ces protéines. De la même manière, un choc acide en phase exponentielle de croissance ne paraît pas modifier l'expression de la P36 et de la P47 (Figure 9). En ce qui concerne la souche GAI 95601, de manière surprenante, on observe un dédoublement des bandes de chacune des protéines, en phase stationnaire, excepté en présence de déféroxamine (Figure 9C), mais ce résultat n'a pas été retrouvé lors de la deuxième extraction de protéines de la couche S.

1.2. Analyse du profil global des protéines de surface

La migration d'une quantité identique d'extrait de protéines totales sur gel SDS-PAGE permet d'obtenir un profil global (Figure 10) : parmi les bandes représentatives des différentes protéines de surface, les deux bandes les plus importantes correspondent aux deux protéines de la couche S, confirmant ainsi leur caractère majoritaire en surface de la bactérie.

L'augmentation de l'expression de ces deux protéines en présence de déféroxamine semble être confirmée pour les souches RéfX et GAI95601 ; pour la souche 79685, l'expression ne semble pas être modifiée par cette condition. En revanche, la concentration subinhibitrice d'ampicilline semble augmenter l'expression des protéines P36 et P47 chez les trois souches, alors que l'hyperosmolarité (NaCl 200 mM) semble diminuer leur expression. Concernant les autres protéines de surface, on observe une modification nette du profil global en fonction des différentes conditions étudiées, qui semblent donc influencer l'expression des différentes protéines présentes en surface de la bactérie.

1.3. Analyse de l'expression de Cwp66

Les anticorps anti-Cwp66 révèlent plusieurs bandes parmi les protéines de surface d'environ 90, 50 et 30 kDa, comme cela a déjà été décrit, et une bande d'environ 60 kDa correspondant vraisemblablement à Cwp66 [99].

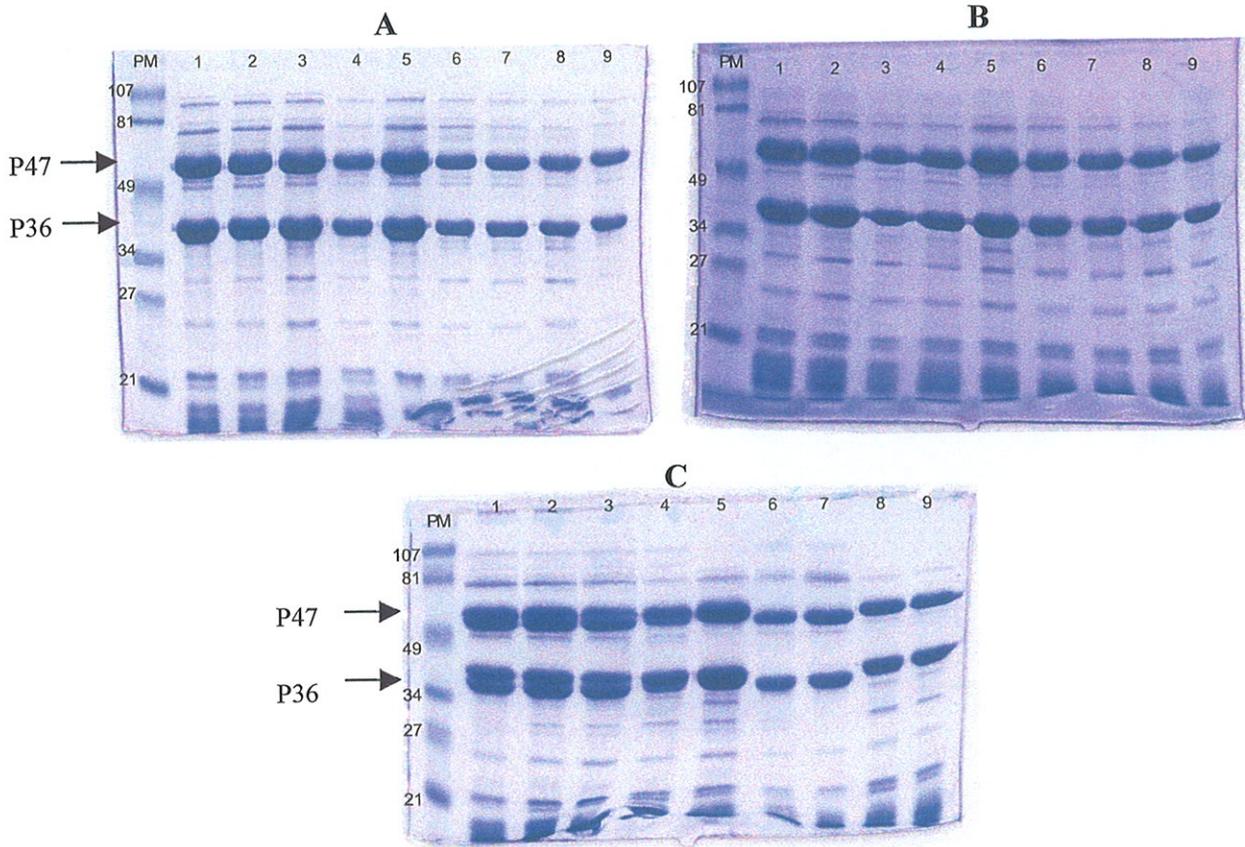


Figure 9. Migration des extraits de protéines de couche S des souches 79685 (A), Réf.X (B) et GAI95601 (C)

Un volume équivalent (20 μ L) d'extrait est déposée dans chaque puit.

1- Culture témoin ; 2-NaCl 50 mM ; 3-NaCl 200 mM ; 4-Ampicilline $\frac{1}{2}$ CMI ; 5-Déféroxamine $\frac{1}{4}$ CMI ; 6-Témoin ; 7-NaCl 200 mM ; 8-Témoin choc acide ; 9-Choc acide.

Pistes 1 à 5 : extraits de phase stationnaire. Pistes 6 à 9 : extraits de phase exponentielle

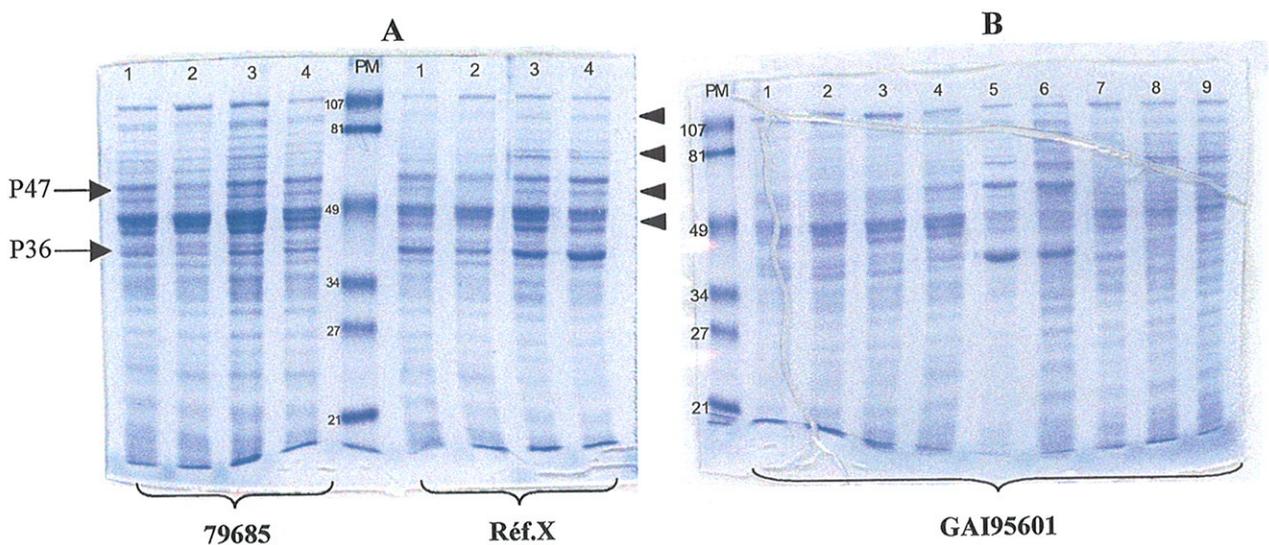


Figure 10. Migration des extraits de protéines totales des souches 79685, Réf.X (A) et GAI95601 (B)

Une quantité équivalente de 15 μ g d'extrait est déposée dans chaque puit.

A : extraits de phase stationnaire : 1-Culture témoin ; 2-NaCl 200 mM ; 3-Ampicilline $\frac{1}{2}$ CMI ; 4-Déféroxamine $\frac{1}{4}$ CMI

B : • extraits de phase stationnaire : 1-Culture témoin ; 2-NaCl 50 mM ; 3-NaCl 200 mM ; 4-Ampicilline $\frac{1}{2}$ CMI ; 5-Déféroxamine $\frac{1}{4}$ CMI

• extraits de phase exponentielle : 6-Culture témoin ; 7-NaCl 200 mM ; 8-Témoin choc acide ; 9-Choc acide

En présence de concentration subinhibitrice d'ampicilline et de déféroxamine en phase stationnaire de croissance, on observe une diminution de toutes les bandes révélées par les anticorps, pour les souches 79685 et Réf.X. En revanche, en condition d'hyperosmolarité en phase stationnaire (NaCl 50 et 200 mM) et en phase exponentielle (NaCl 200 mM), les bandes correspondant aux produits de dégradation sont plus intenses (Figures 11). Pour la troisième souche, l'analyse a été réalisée deux fois mais n'a pas permis d'obtenir de résultats interprétables.

1.4. Analyse de l'expression de Cwp84

Les anticorps anti-Cwp84 révèlent une bande d'environ 70 kDa au sein des protéines de surface de *C. difficile*.

L'expression de la protéase Cwp84 semble augmentée dans les différentes conditions de stress étudiées, en phase stationnaire (NaCl 50 et 200 mM, concentration subinhibitrice d'ampicilline et déféroxamine) et en phase exponentielle (NaCl 200 mM et choc acide). Ce résultat est observé pour les trois souches (Figure 12) ; cependant, l'augmentation semble plus modérée chez la souche Réf.X en présence de déféroxamine (piste 5).

2. Analyse de l'expression des gènes *slpA*, *cwp66* et *cwp84*

En fonction des résultats obtenus pour l'analyse de l'expression des protéines P36, P47, Cwp66 et Cwp84, nous ne nous sommes intéressés à l'analyse de l'expression des gènes que dans les conditions environnementales qui nous ont paru les plus intéressantes. Ainsi, seules l'hyperosmolarité (NaCl 200 mM), la concentration subinhibitrice d'ampicilline et la déplétion en fer (déféroxamine) en phase stationnaire de croissance ont été étudiées.

2.1. Extraction et analyse des ARN

Les ARN totaux des trois souches ont été extraits en phase stationnaire de croissance, dans les conditions d'hyperosmolarité (NaCl 200 mM), de concentration subinhibitrice d'antibiotique (ampicilline 1 µg/mL) et de déplétion en fer (déféroxamine 50 µM).

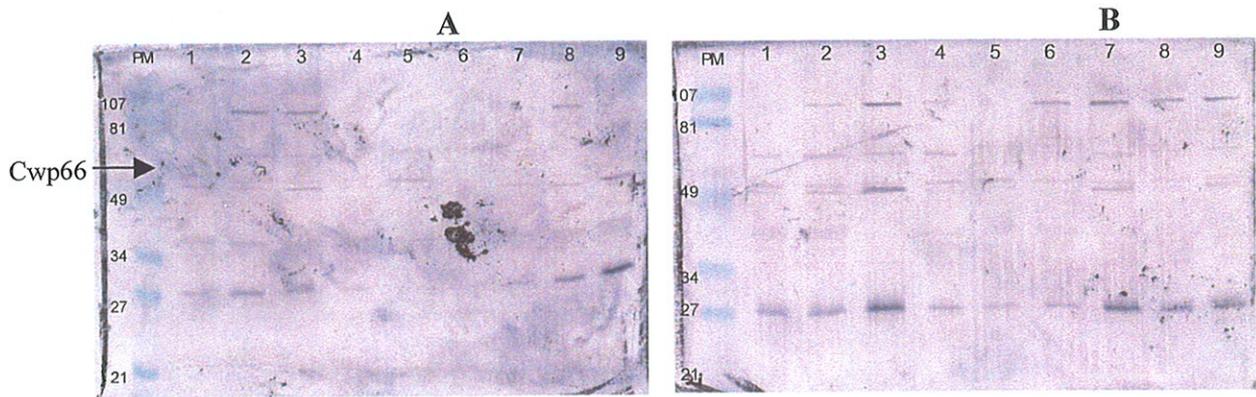


Figure 11. Immunoblot des protéines de surface des souches 79685 (A) et Réf.X (B) révélés par l'anticorps anti-Cwp66 C-ter

Une quantité équivalente (15 µg) d'extrait de protéines totales est déposée dans chaque puit.
 1-Culture témoin ; 2-NaCl 50 mM ; 3-NaCl 200 mM ; 4-Ampicilline ½ CMI ; 5-Déféroxamine ¼ CMI ; 6-Témoin ;
 7-NaCl 200 mM ; 8-Témoin choc acide ; 9-Choc acide.
 Pistes 1 à 5 : extraits de phase stationnaire. Pistes 6 à 9 : extraits de phase exponentielle

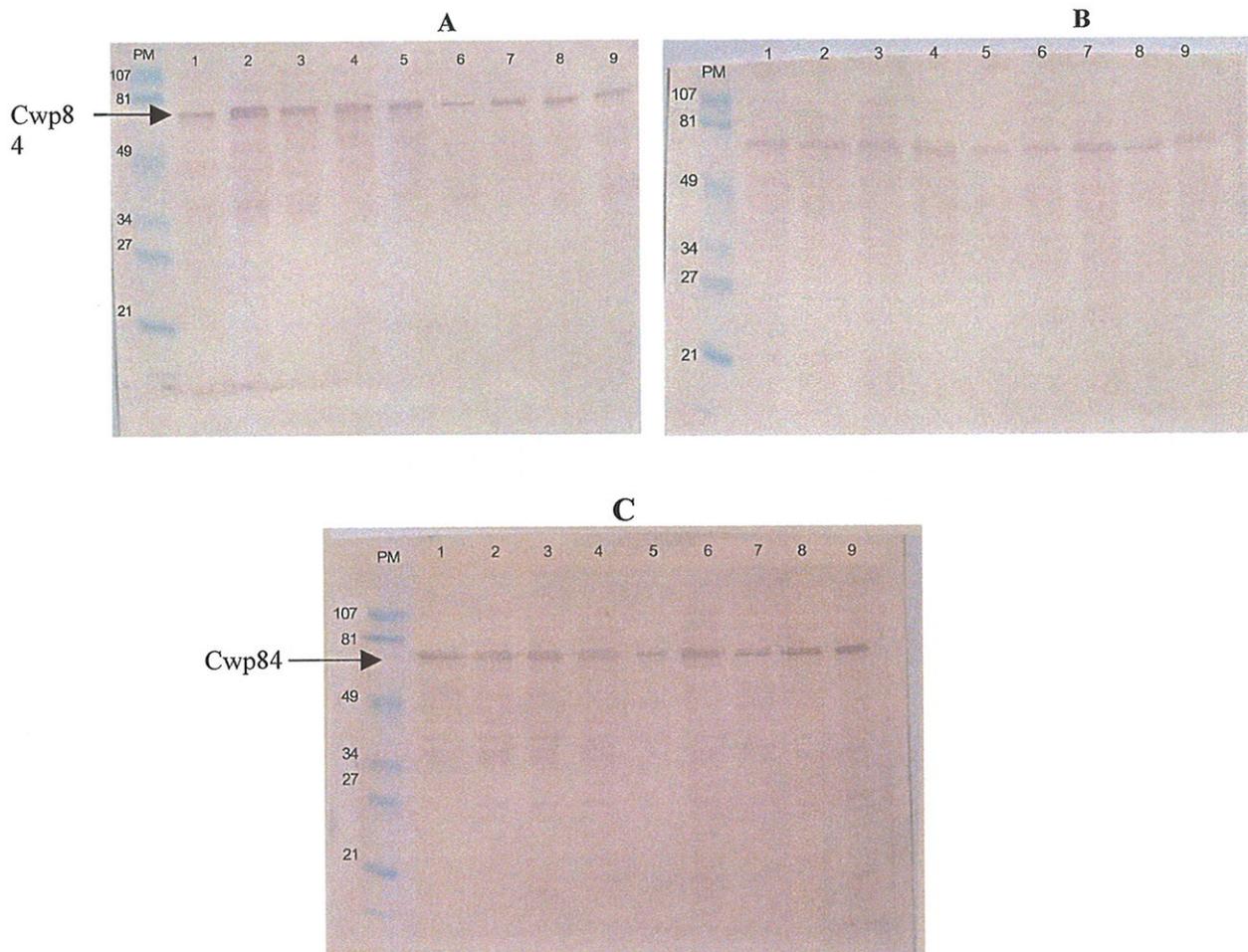


Figure 12. Immunoblot des protéines de surface des souches 79685 (A), Réf.X (B) et GAI95601 (C) révélés par l'anticorps anti-Cwp84

Une quantité équivalente (15 µg) d'extrait de protéines totales est déposée dans chaque puit.
 1-Culture témoin ; 2-NaCl 50 mM ; 3-NaCl 200 mM ; 4-Ampicilline ½ CMI ; 5-Déféroxamine ¼ CMI ; 6-Témoin ;
 7-NaCl 200 mM ; 8-Témoin choc acide ; 9-Choc acide.
 Pistes 1 à 5 : extraits de phase stationnaire. Pistes 6 à 9 : extraits de phase exponentielle

D'une manière générale, les concentrations en ARN calculées après dosage spectrophotométrique et celles déterminées par l'analyse avec le système Agilent varient assez nettement ; nous avons décidé de ne tenir compte que de celles issues des mesures Agilent, plus précises. Les concentrations varient de 1,0 à 6,5 µg/µL en fonction des souches et des conditions de culture.

Les analyses par le système Agilent ont permis également de vérifier la qualité des extraits d'ARN totaux. Cette qualité s'est avérée différente selon les souches et les conditions environnementales utilisées lors des cultures (Annexe 3). La plupart des ARN totaux extraits étaient de bonne qualité, avec un rapport ARNr 23S/16S > 1,6, alors que certains étaient assez dégradés, avec un rapport < 1,5, comme les ARN issus de la souche 79685 cultivée en condition de déplétion en fer, lors de la première extraction (Annexe 3).

2.2. Analyse de l'expression des gènes par Northern-Blot

L'hybridation des différents extraits d'ARN totaux de la souche Réf.X avec la sonde *slpA* révèle une augmentation nette de la transcription de ce gène en présence d'une concentration subinhibitrice d'ampicilline ; en revanche, l'hyperosmolarité ne semble pas modifier l'expression de ce gène et la déféroxamine semble même la diminuer (Figure 13). On peut remarquer sur ce Northern-Blot un marquage aspécifique des ARNr 16S et 23S. Par la suite, ce problème s'est accentué, rendant impossible la poursuite de l'analyse par Northern-Blot pour les autres souches et les différents gènes.

2.3. Analyse de l'expression des gènes par PCR en temps réel

En raison de la variabilité de la souche GAI 95601 ne permettant pas l'utilisation des mêmes amorces que pour les deux autres souches, nous avons limité notre étude par PCR en temps réel aux souches 79685 et Réf.X.

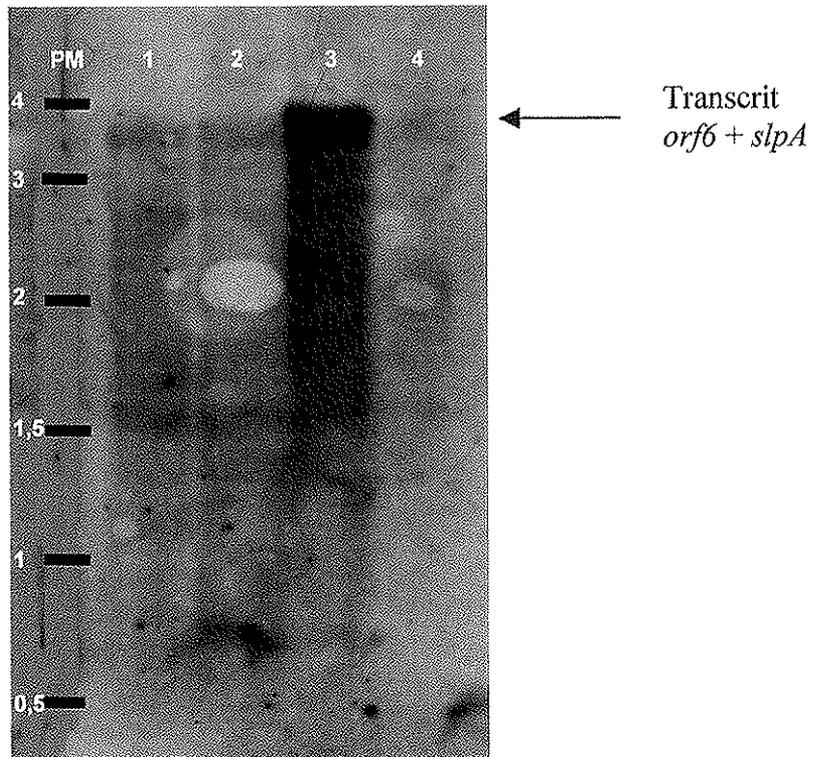


Figure 13. Northern-Blot sur les ARN totaux extraits de la souche Réf.X, après culture dans différentes conditions environnementales, sonde *slpA*

Pistes : 1 : Témoin - 2: NaCl 200 mM - 3 : Ampicilline - 4 : Déféroxamine

a. Mise au point de l'étude par PCR en temps réel

■ Essais d'amplification des gènes

Les matrices d'ADNc ont été obtenues au cours d'une seule manipulation de transcription inverse, puis l'ADNc issu de la culture témoin (TGY) a été utilisé pour la mise au point de la PCR en temps réel.

Chaque couple d'amorces a été utilisé une première fois pour amplifier les gènes correspondants chez chacune des deux souches. La matrice d'ADNc « témoin » a été utilisée aux concentrations de 0,5 et 5 ng/μL, correspondant à des dilutions au 1/500 et au 1/50 du produit de transcription inverse. La migration sur gel d'agarose permet de vérifier la présence d'un produit de PCR unique, c'est-à-dire l'absence d'amplification non spécifique (Figure 14). Cette vérification peut être également faite grâce aux courbes de fusion, la présence d'un pic unique reflétant la pureté du produit de PCR (Annexe 4). Les Ct obtenus lors de ces premiers essais étaient compris généralement entre 20 et 30, quelle que soit la souche, sauf pour la courbe de l'ARNr 16S dont le Ct pour les deux souches était voisin de 4, ce qui traduit l'abondance de cette espèce d'ARNr par rapport aux ARNm.

■ Détermination de l'efficacité des PCR pour chaque couple d'amorces

La détermination de l'efficacité des PCR à partir d'une gamme de dilution de la matrice d'ADNc a été réalisée chez la souche 79685. La figure 15 présente un exemple de courbe d'efficacité.

Les gammes ont été réalisées en fonction des Ct obtenus lors des essais d'amplification et figurent dans le tableau suivant :

Gène	Concentration de matrice (ng/μL d'ADNc)	Pente (k)	Efficacité	Concentration d'ADNc choisie dans la suite du travail
<i>16Srrna</i>	5.10 ⁻⁵ – 5.10 ⁻⁴ – 5.10 ⁻³ 5.10 ⁻² – 5.10 ⁻¹ – 5	-3,449	95,0 %	5.10 ⁻⁵ ng/μL
<i>gyrA</i>	5.10 ⁻⁴ – 5.10 ⁻³ – 5.10 ⁻² 5.10 ⁻¹ – 5	-3,439	95,3 %	5 ng/μL
<i>gluD</i>	5.10 ⁻⁴ – 5.10 ⁻³ – 5.10 ⁻² 5.10 ⁻¹ – 5	-3,431	95,6 %	5.10 ⁻² ng/μL
<i>cwp84</i>	dilution : 1/10 – 1/20 – 1/30 1/40 – 1/50 – 1/60	-3,904	80,4 %	8,33 ng/μL (dilution 1/30)
<i>cwp66</i>	5.10 ⁻⁴ – 5.10 ⁻³ – 5.10 ⁻² 5.10 ⁻¹ – 5	-3,346	99,0 %	5 ng/μL
<i>5'-slpA (P36)</i>	5.10 ⁻⁴ – 5.10 ⁻³ – 5.10 ⁻² 5.10 ⁻¹ – 5	-4,149	74,2 %	
<i>3'-slpA (P47)</i>	5.10 ⁻⁴ – 5.10 ⁻³ – 5.10 ⁻² 5.10 ⁻¹ – 5	-3,505	92,3 %	5.10 ⁻¹ ng/μL

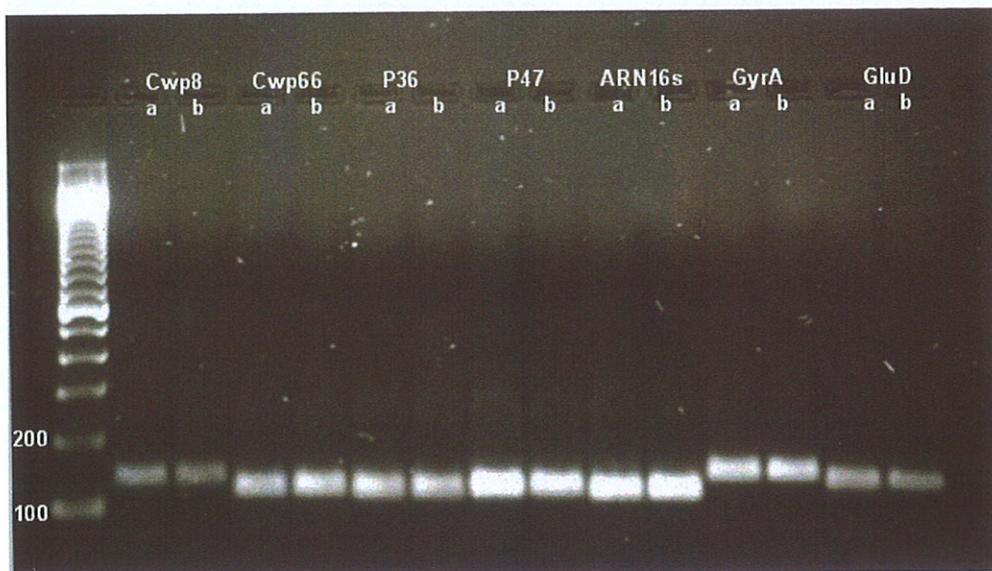


Figure 14. Migration électrophorétique des produits de PCR en temps réel (souche Réf. X)

a : matrice d'ADNc à la concentration de 5 ng/μL

b : matrice d'ADNc à la concentration de 0,5 ng/μL

La taille attendue des amplicons était la suivante (pb) : *cwp84* : 143 ; *cwp66* : 123 ; 5'-*slpA* (P36) : 120 ; 3'-*slpA* (P47) : 125 ; *16Srrna* : 120 ; *gyrA* : 146 ; *gluD* : 135.

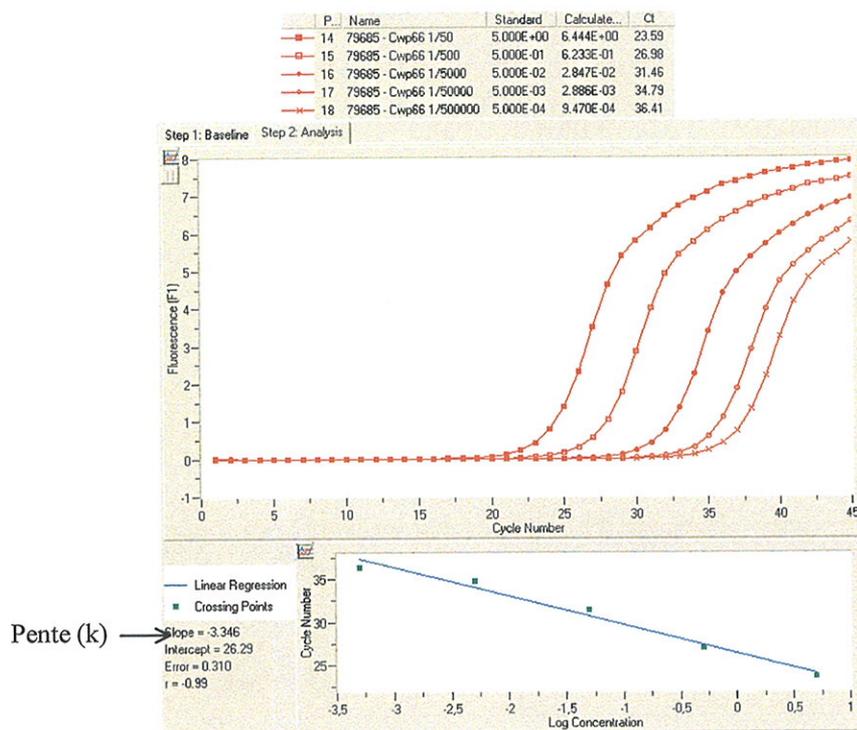


Figure 15. PCR en temps réel : courbe d'efficacité, gène *cwp66*, souche 79685

Les PCR permettant d'amplifier les trois gènes de normalisation ainsi que le gène *cwp66* et la partie 5' du gène *slpA* présentent des efficacités très correctes ($\approx 95\%$) ; en revanche, les PCR permettant d'amplifier les deux derniers gènes (*cwp84* et 3'-*slpA*, codant la protéine P36) présentent des efficacités inférieures à 90 % (tableau ci-dessus). L'amplification de *cwp84* a été réalisée, tout en tenant compte de la faible efficacité de la PCR ($\approx 80\%$), mais, disposant déjà d'un couple d'amorces permettant d'amplifier *slpA* avec une très bonne efficacité, le couple permettant d'amplifier la partie correspondant à la protéine P36 n'a pas été utilisé dans la suite de ce travail.

Ces gammes de dilutions ont aussi permis de choisir les concentrations de matrice d'ADNc utilisées pour les amplifications ultérieures : cette concentration est choisie de manière à obtenir un Ct compris entre 20 et 30.

■ Choix du gène de normalisation

L'expression de chacun des trois gènes de normalisation a été étudiée dans les différentes conditions environnementales. Le gène codant l'ARNr 16S présente une grande stabilité d'expression : en effet, son Ct ne varie que de 1,5 % chez la souche 79685 et 5,0 % chez la souche Réf.X en fonction des conditions environnementales étudiées. En revanche, l'expression des deux autres gènes, *gyrA* et *gluD*, est beaucoup plus variable : leurs Ct varient de 23 et 22 % chez la souche 79685 et 13 et 21 % chez la souche Réf.X respectivement. La figure 16 présente un exemple de courbe de quantification pour les gènes *16Srrna* (Figure 16a) et *gyrA* (Figure 16b) de la souche 79685.

Nous avons donc choisi de n'utiliser que le gène codant l'ARNr 16S pour normaliser les résultats obtenus pour les gènes d'intérêt.

b. Détermination du rapport d'expression relative

Les trois conditions de stress augmentent toutes, dans des proportions variables, l'expression des trois gènes d'intérêt étudiés chez les deux souches (Tableau IX). Pour la majorité des échantillons, les résultats obtenus ont été confirmés par l'analyse des seconds échantillons.

■ Hyperosmolarité :

L'hyperosmolarité augmente nettement la transcription du gène *cwp84* chez les deux souches : elle est en effet multipliée par un facteur 44 chez la souche 79685 et 27 chez la souche Réf.X. La transcription du gène *cwp66* est multipliée par un facteur 24 et 10

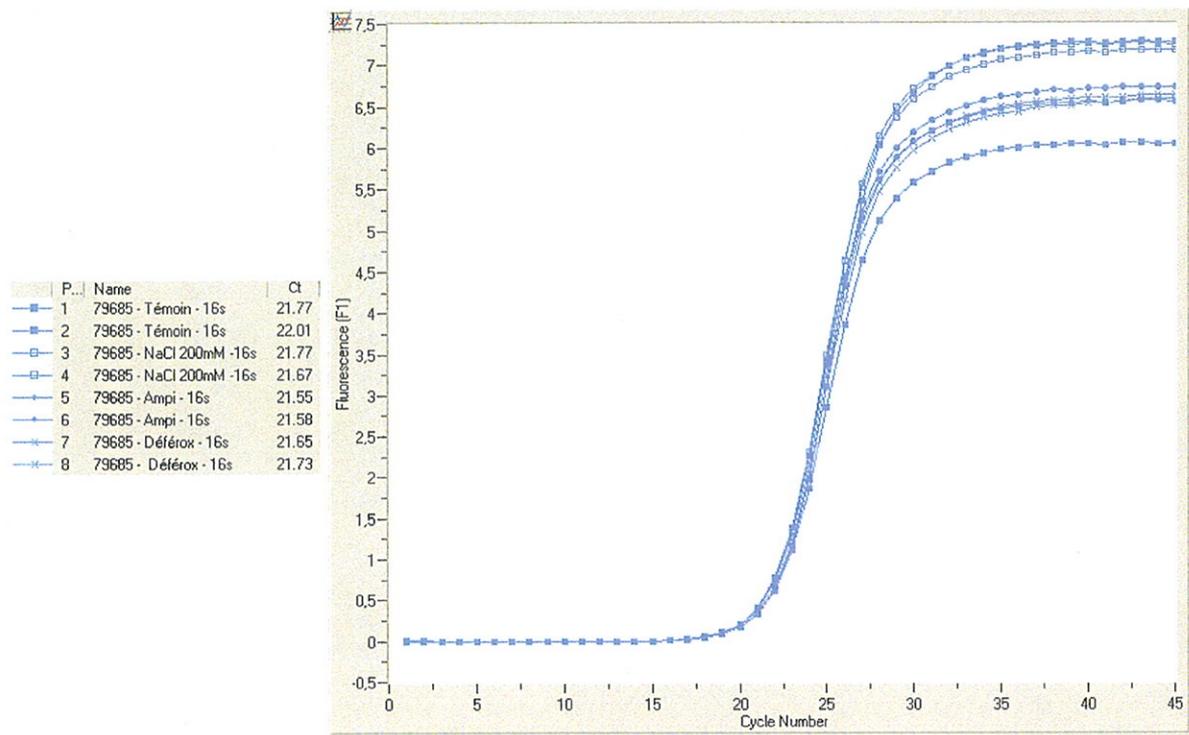


Figure 16a. Courbe de PCR en temps réel pour le gène *16Srrna* en fonction des différentes conditions environnementales étudiées

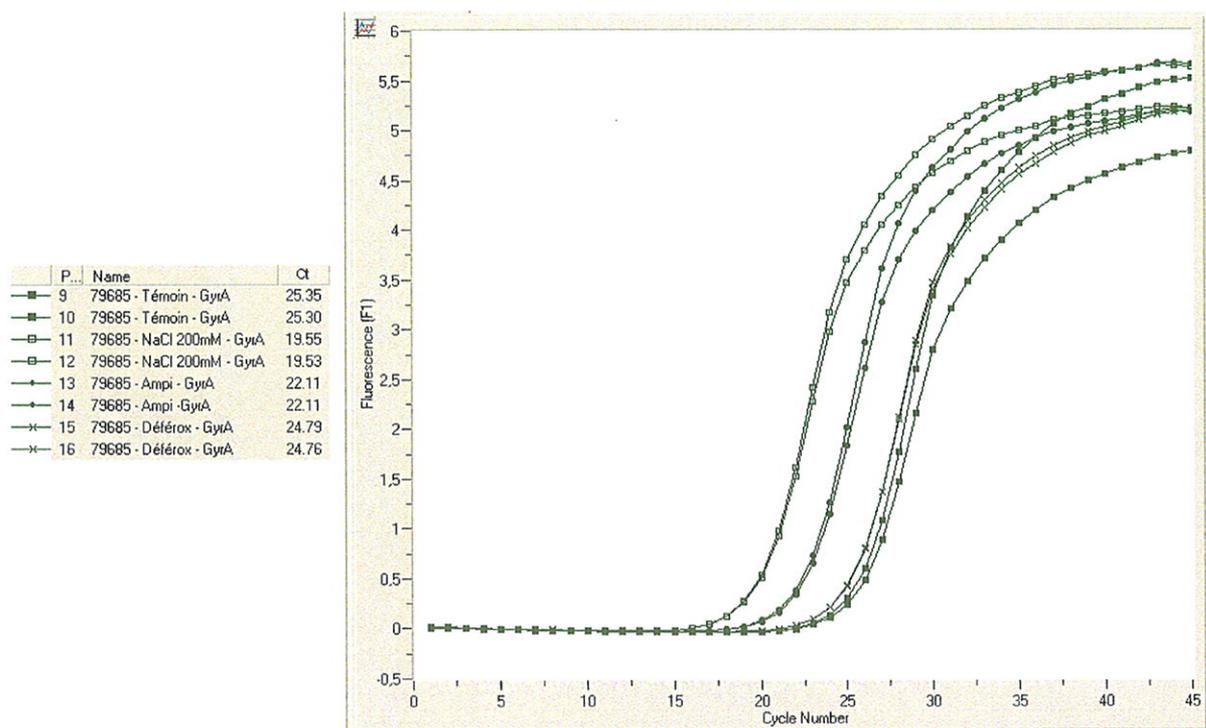


Figure 16b. Courbe de PCR en temps réel pour le gène *gyrA* en fonction des différentes conditions environnementales étudiées

respectivement chez ces deux mêmes souches. L'augmentation de la transcription du gène *slpA* est beaucoup plus modérée, puisque multipliée par un facteur 4 chez la souche 79685 et 2 chez la souche Réf.X.

■ Concentration subinhibitrice d'ampicilline

Cet antibiotique semble avoir un effet plus important chez la souche Réf.X que chez la souche 79685. En effet, chez la première souche (Réf.X), la concentration subinhibitrice d'ampicilline testée (1 µg/mL) augmente la transcription du gène *cwp84* d'un facteur supérieur à 100 et celle des gènes *slpA* et *cwp66* d'un facteur similaire (≈ 46). Chez la souche 79685, la concentration subinhibitrice testée (1 µg/mL) augmente la transcription de *cwp66* d'un facteur 8. La transcription de *cwp84* est augmentée d'un facteur 7 et celle de *slpA* de 4.

■ Déplétion en fer

Cette dernière condition montre une influence moindre sur l'expression des trois gènes étudiés. L'augmentation la plus marquée est celle du gène *cwp84* de la souche Réf.X, avec une augmentation d'un facteur 15, alors que son expression n'est quasiment pas modifiée chez la souche 79685.

Chez la souche Réf.X, la transcription de *cwp66* et *slpA* est augmentée d'un facteur 4 et 2 respectivement lors de la première analyse. Lors de la deuxième analyse, des résultats équivalents ont été obtenus, mais avec une augmentation encore plus modérée.

Chez la souche 79685, la transcription de *cwp66* est augmentée d'un facteur 1,3 alors que celle de *slpA* est nettement diminuée ($R = 0,35$) lors de la première analyse. En revanche, lors de la deuxième analyse, réalisée à partir d'ARN totaux de moins bonne qualité, les résultats obtenus sont discordants : l'expression de *Cwp66* est diminuée ($R = 0,28$), alors que celle de *slpA* est augmentée d'un facteur 1,5.

La figure 17 présente un exemple de courbe de quantification pour le gène *cwp84*.

Tableau IX. PCR en temps réel : rapports d'expression relative après normalisation

Condition	Gène	79685	Réf. X
NaCl 200 mM	<i>cwp66</i>	24,28	10,00
	<i>cwp84</i>	44,36	26,85
	<i>slpA</i>	4,20	2,06
Ampicilline ½ CMI	<i>cwp66</i>	8,47*	45,64*
	<i>cwp84</i>	7,04	112,73
	<i>slpA</i>	3,90*	47,63*
Déféroxamine ¼ CMI	<i>cwp66</i>	1,27*	4,40*
	<i>cwp84</i>	1,41	15,36
	<i>slpA</i>	0,35*	1,86*

* : conditions ayant fait l'objet de deux analyses à partir de deux extractions différentes

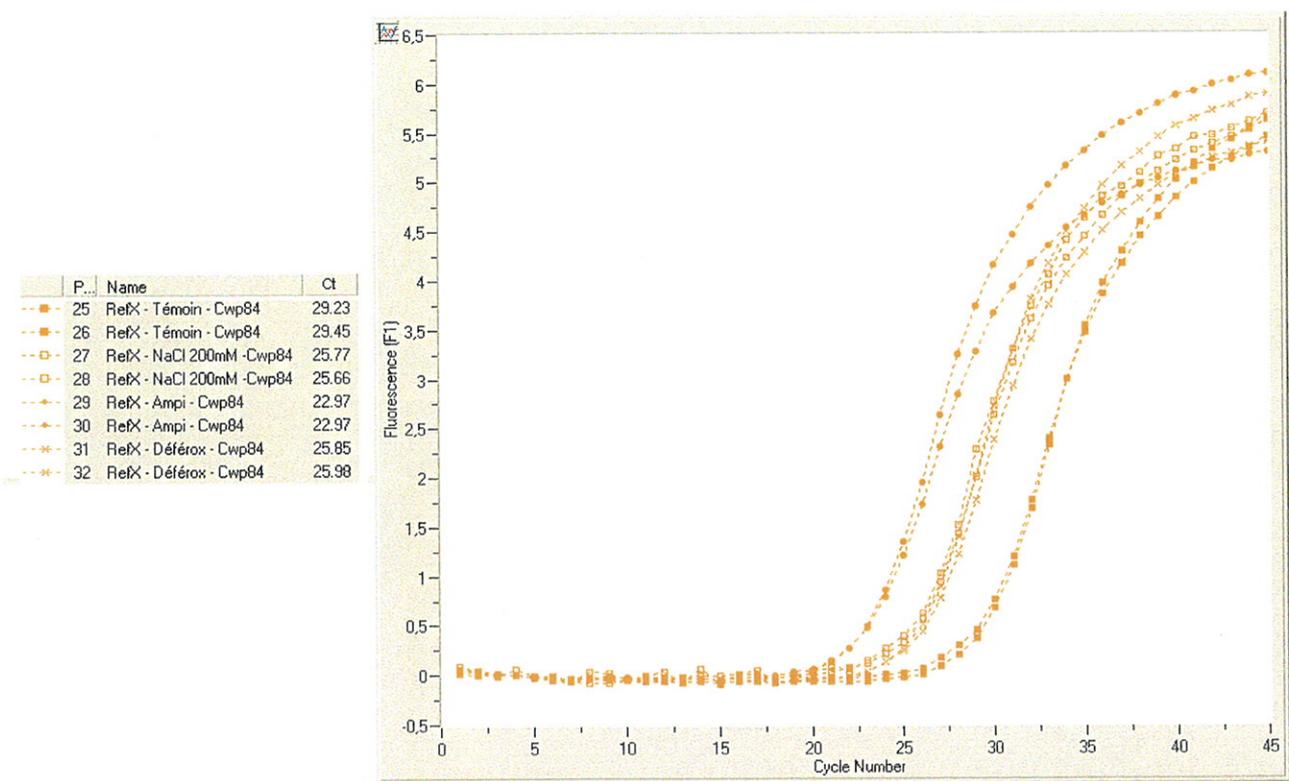


Figure 17. PCR en temps réel : souche Réf.X, gène *cwp84*

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La colonisation du tube digestif par *C. difficile* est un prérequis indispensable au développement de l'infection. Plusieurs facteurs ont été impliqués dans cette étape, dont certains codés par des gènes situés sur un cluster particulier de 37 kb caractérisé au laboratoire [55] : ainsi, les gènes codant les protéines de la couche S, l'adhésine Cwp66 et la protéase Cwp84. Ces trois protéines ont la particularité de présenter un domaine d'ancrage pariétal homologue au domaine d'ancrage de CwlB de *B. subtilis*. D'autres protéines du cluster possèdent aussi ce domaine, suggérant une localisation en surface pour toutes ces protéines. Notre objectif était de poursuivre l'analyse de ce cluster initié précédemment [55,85] afin de caractériser plus précisément son implication dans la virulence de *C. difficile*.

Nous avons localisé sur les séquences adjacentes du cluster différents gènes codant des protéines présentant des homologies importantes avec des protéines bactériennes, dont certaines pourraient avoir un rôle dans la virulence. C'est le cas des protéines Orf-1 et Orf-3, situées en amont du cluster (Figure 8, page 49), homologues respectivement de queuosine-ribosyltransférases (Tgt) et de queuosine-synthétases, présentes chez différentes bactéries, dont *Clostridium sp*, *B. cereus* et *S. aureus*. Chez *Shigella flexneri*, le gène *tgt* s'avère nécessaire à l'expression totale des gènes de virulence, en modifiant la concentration intracellulaire du régulateur transcriptionnel de la virulence VirF [32]. La protéine Orf-8, située en amont du cluster, pourrait appartenir à la famille des GntP perméases, impliquées dans le transport et le métabolisme des acides aminés. Chez *E. coli*, la présence du gène *gntP* permettrait à la bactérie de s'implanter à un endroit nutritionnel préférentiel de l'intestin de souris traitées par la streptomycine [90]. La protéine Orf15, située en aval du cluster, est un homologue de la protéine de surface MviN, facteur de virulence potentiel, présent entre autres chez d'autres espèces de *Clostridium* [15]. La protéine Orf16 est un homologue de phosphoglucomutase, enzyme intervenant dans la biosynthèse du peptidoglycane et retrouvée chez différentes espèces bactériennes. Cette protéine pourrait être impliquée dans la virulence chez *Vibrio furnissii* [57] et *Pseudomonas aeruginosa* [79]. Situées plus en aval du cluster, cinq protéines présentent des homologies avec des protéines impliquées dans la biosynthèse des membranes bactériennes.

Cependant, l'analyse de ce cluster n'a pas permis de mettre en évidence de nouvelles protéines à structure d'adhésine évidente, ni d'enzymes hydrolytiques. De plus, aucune

protéine identifiée ne semble posséder de partie homologue au domaine d'ancrage, caractéristique des protéines de surface étudiées précédemment.

Par la suite, nous avons évalué l'implication des protéines de ce cluster dans la virulence des souches et dans la détermination du sérotype. En effet, le sérotype est défini en partie par le caractère antigénique de la protéine de la couche S P36 [54], une des protéines majoritaires de la surface bactérienne, mais d'autres antigènes interviennent vraisemblablement. Des études antérieures ont montré que la protéase Cwp84, très conservée, et l'adhésine Cwp66, au contraire très variable, n'interviennent pas dans la détermination du sérotype [85].

Nous nous sommes donc intéressés au polymorphisme des gènes cotranscrits avec *slpA* (*orf6*) et *cwp66*, (*orf8* et *orf9*), ainsi qu'à deux gènes *orf7* et *orf12* codant pour des homologues de SecA et d'une amidase. Les résultats de PCR-RFLP montrent que les gènes *orf6* et *orf7* sont très variables, alors que les gènes *orf9* et *orf12* semblent plutôt conservés ; le gène *orf8* n'a pas pu être amplifié chez toutes les souches, ce qui témoigne vraisemblablement d'une grande variabilité.

L'analyse du polymorphisme de ces gènes indique qu'il semble exister une corrélation entre les profils observés et le sérotype des souches. De manière générale, cette corrélation est retrouvée chez la majorité des souches, sauf celles appartenant aux sérotypes A et B qui, pour tous les gènes étudiés, montrent systématiquement des profils différents (Tableaux X). Plus précisément, pour les gènes très variables, la corrélation entre le profil et le sérotype des souches n'est observée que chez les sérotypes C, D et F pour le gène *orf6*, et pour les sérotypes D, K et X pour le gène *orf7*. Chez les gènes peu variables, cette corrélation est plus importante, puisqu'elle est retrouvée pour huit des 11 sérotypes étudiés : C, D, F, G, H, I, K et X pour le gène *orf9*, et pour six d'entre eux : C, D, F, G, I et K pour le gène *orf12*. En revanche, il ne semble pas exister de corrélation entre les différents profils observés et la virulence des souches. En effet, pour chaque gène étudié, certains profils sont retrouvés à la fois chez des souches toxigènes isolées de patients atteints de diarrhée ou de colite ou isolées de porteurs sains, et chez des souches non toxigènes. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Lémée et coll. qui ont étudié par MLST les gènes *slpA*, *cwp66*, *cwp84*, *fbp68*, *fliC*, *fliD* et *groEL* [62].

Tableau Xa. Corrélation du profil du gène *orf6* avec le séro groupe de la souche

Profil	Sérogroupe	Toxinogénèse	Origine clinique	Souche
1	C	A+B+	CPM	Ref C
	C	A+B+	CPM	630
	C	A+B+	AAD	C253
2	A	A+B+	CPM	Ref A
	B	A-B-	NN porteur	Ref B
4	D	A-B-	Ad porteur	Ref D
	D	A-B-	Enf porteur	93136
5	F	A-B+	?	Ref F
	F	A-B+	?	5168
	F	A-B+	?	GAI 9560
	F	A-B+	?	GAI 95600
6	G	A+B+	NN porteur	Ref G
	S3	A+B+	CPM	79685
6	I	A-B-	NN porteur	Ref I
	A	?	?	SE 810
7	?	?	?	GAI 97480
	H	A+B+	CPM	Ref H
8	H	A+B+	Ad porteur	93369
	K	A-B-	NN porteur	Ref K
10	B	A-B-	?	CO 109
	X	A-B-	NN porteur	Ref X
11	A	A-B-	Enf porteur	Kohn
	G	A+B+	CPM	95938
13	K	A+B+	CPM	94416
	I	A-B-	Enf porteur	56026
15	H	A-B-	?	53444
	X	A-B+	?	36678

Tableau Xb. Corrélation du profil du gène *orf9* avec le séro groupe de la souche

Profil	Sérogroupe	Toxinogénèse	Origine clinique	Souche
1	A	A-B-	Enf porteur	Kohn
	C	A+B+	CPM	Ref C
	C	A+B+	CPM	630
	C	A+B+	AAD	C253
	G	A+B+	CPM	95938
	G	A+B+	NN porteur	Ref G
	K	A+B+	CPM	94416
	K	A-B-	NN porteur	Ref K
	X	A-B+	?	36678
	X	A-B-	NN porteur	Ref X
?	S3	A+B+	CPM	79685
	?	?	?	GAI 97480
2	A	?	?	SE 810
	A	A+B+	CPM	Ref A
3	B	A-B-	NN porteur	Ref B
	D	A-B-	Enf porteur	93136
4	D	A-B-	Ad porteur	Ref D
	F	A-B+	?	Ref F
	F	A-B+	?	5168
	F	A-B+	?	GAI 9560
5	F	A-B+	?	GAI 95600
	H	A+B+	CPM	Ref H
6	H	A+B+	Ad porteur	93369
	H	A-B-	?	53444
6	B	A-B-	?	CO 109
	I	A-B-	NN porteur	Ref I
6	I	A-B-	Enf porteur	56026

Tableau Xc. Corrélation du profil du gène *orf7* avec le sérotype de la souche

Profil	Sérogroupe	Toxinogénèse	Origine clinique	Souche
1	C	A+B+	CPM	Ref C
	C	A+B+	CPM	630
2	A	A+B+	CPM	Ref A
	B	A-B-	NN porteur	Ref B
	D	A-B-	Ad porteur	Ref D
	D	A-B-	Enf porteur	93136
3	H	A-B-	?	53444
	F	A-B+	?	Ref F
4	G	A+B+	NN porteur	Reg G
	?	?	?	97480
5	H	A+B+	CPM	Ref H
	H	A+B+	Ad porteur	93369
6	I	A-B-	NN porteur	Ref I
	K	A+B+	CPM	94416
7	K	A-B-	NN porteur	Ref K
	S3	A+B+	CPM	79685
8	X	A-B+	?	36678
	X	A-B-	NN porteur	Ref X
9	F	A-B+	?	5168
	F	A-B+	?	GAI 95600
10	F	A-B+	?	GAI 95601
	A	A-B-	Enf porteur	Kohn
11	A	?	?	SE810
	C	A+B+	AAD	C253
12	G	A+B+	CPM	95938
	I	A-B-	Enf porteur	56026
14	A	?	?	SE 810

Tableau Xd. Corrélation du profil du gène *orf12* avec le sérotype de la souche

Profil	Sérogroupe	Toxinogénèse	Origine clinique	Souche
1	A	A-B-	Enf porteur	Kohn
	C	A+B+	CPM	Ref C
	C	A+B+	CPM	630
	C	A+B+	AAD	C253
	D	A-B-	Enf porteur	93136
	D	A-B-	Ad porteur	Ref D
	G	A+B+	CPM	95938
	G	A+B+	NN porteur	Reg G
	H	A-B-	?	53444
	I	A-B-	NN porteur	Ref I
	I	A-B-	Enf porteur	56026
2	K	A+B+	CPM	94416
	K	A-B-	NN porteur	Ref K
3	S3	A+B+	CPM	79685
	?	?	?	GAI 97480
2	A	A+B+	CPM	Ref A
	B	A-B-	NN porteur	Ref B
	H	A+B+	CPM	Ref H
	H	A+B+	Ad porteur	93369
3	B	A-B-	?	CO 109
	F	A-B+	?	Ref F
	F	A-B+	?	5168
	F	A-B+	?	GAI 9560
4	F	A-B+	?	GAI 95600
	X	A-B-	NN porteur	Ref X
5	A	?	?	SE 810
	X	A-B+	?	36678

Enfin, nous avons débuté l'analyse de la régulation des gènes codés par ce cluster, en nous focalisant sur des gènes bien caractérisés : *slpA*, *cwp66* et *cwp84*. Nous avons choisi d'étudier cette régulation dans des conditions environnementales mimant les conditions rencontrées par la bactérie lors de son arrivée dans le tube digestif de son hôte : hyperosmolarité (NaCl 50 et 200 mM), concentration subinhibitrice d'antibiotique (ampicilline à la moitié de la CMI), déplétion en fer (déféroxamine 50 μ M) et choc acide ; ces conditions favorisent l'adhésion de *C. difficile* à des cellules en culture [98]. Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression des protéines. Puis nous avons mis au point l'étude transcriptionnelle des ARN. Celle-ci a été effectuée par Northern-Blot puis par PCR en temps réel, méthode ayant nécessité une mise au point importante, en particulier concernant le choix du gène de normalisation. Nous avons étudié l'expression de trois gènes, *16Srrna*, *gyrA* et *gluD*, fréquemment choisis par différents auteurs [16,33], dans les conditions environnementales préalablement choisies. Le gène présentant la plus grande stabilité, *16Srrna*, a donc été utilisé dans la suite de l'étude comme gène de normalisation [33].

L'analyse de la transcription des gènes ainsi que celle de l'expression des protéines a permis d'obtenir des résultats parfois contradictoires.

D'une manière générale, l'expression des protéines de la couche S semble augmentée en présence de déféroxamine, diminuée en présence de concentration subinhibitrice d'ampicilline et peu modifiée par les autres conditions. En revanche, l'expression du gène semble assez stable, excepté en présence de concentration subinhibitrice d'ampicilline où la transcription apparaît augmentée d'un facteur proche de 50. Ce résultat est par ailleurs confirmé par l'analyse en Northern-Blot. Cette discordance pourrait s'expliquer par l'action des molécules testées sur la paroi des bactéries. Il est connu que les concentrations subinhibitrices de β -lactamines modifient la morphologie et la paroi des bactéries, ce qui pourrait interférer avec les techniques d'extraction de protéines. Par ailleurs, il faut noter qu'une augmentation de transcription d'un ARNm ne se traduit pas toujours *in vitro* par une augmentation de la synthèse protéique [46].

L'analyse de la transcription des gènes codant l'adhésine Cwp66 et la protéase Cwp84 indique une influence importante de l'hyperosmolarité (NaCl 200 mM) et de la concentration subinhibitrice d'ampicilline, leur expression étant multipliée par un facteur allant de 7 à plus de 100. Il est intéressant de noter que l'augmentation de la transcription est plus importante chez la souche Réf.X, non toxigène, que chez la souche 79685, toxigène et isolée d'un patient atteint de CPM. La déplétion en fer semble avoir une influence moins importante sur la transcription de ces deux gènes.

Les différentes observations indiquent dans un premier temps que les deux souches semblent réagir différemment aux conditions environnementales étudiées : la souche 79685 paraît plus sensible aux conditions d'hyperosmolarité (NaCl 200 mM), alors que la souche Réf.X paraît plus sensible à la concentration subinhibitrice d'ampicilline.

D'autre part, les trois gènes du cluster étudiés dans le cadre de ce travail ne semblent pas appartenir à un régulon ; il faut cependant noter que la transcription de *cwp66* et *cwp84* paraît influencée de la même manière par l'hyperosmolarité et la concentration subinhibitrice d'antibiotique, même si les augmentations observées présentent des proportions variables.

Enfin, la faible régulation du gène *slpA* nous fait réfléchir au rôle des protéines de la couche S dans l'adhésion et la virulence de *C. difficile* : en effet, ces deux protéines, qui sont les protéines majoritaires de la surface de la bactérie, pourraient alors n'avoir qu'un rôle structural indispensable à la survie de la bactérie, quelles que soient les conditions.

En revanche, l'influence des conditions environnementales sur les gènes *cwp66* et *cwp84* renforce l'idée que l'adhésine et la protéase font partie des facteurs de colonisation et/ou de virulence de *C. difficile*. En effet, leur transcription semble être régulée positivement par l'apparition de conditions mimant l'arrivée de la bactérie dans le tube digestif, lui permettant ainsi d'augmenter ses propriétés d'adhésion et de colonisation [24]. En particulier, l'effet de la présence d'ampicilline à une concentration subinhibitrice est particulièrement intéressante : la concentration testée (1 µg/mL), lorsqu'elle est atteinte dans le tube digestif, entraînerait non seulement une altération de la flore de barrière, mais aussi une augmentation de l'expression des adhésines P47 et Cwp66 et de la protéase Cwp84, contribuant ainsi à faciliter l'étape de colonisation par la bactérie.

Les perspectives de cette étude découlent essentiellement de la dernière partie de ce travail. Dans un premier temps, ces analyses seront renouvelées de manière à confirmer ces résultats. Pour cela, l'étude de l'expression des protéines de surface devra vraisemblablement faire l'objet d'une mise au point, en raison de l'interférence probable des molécules testées avec les techniques d'extraction utilisées. Par ailleurs, l'étude de la transcription sera poursuivie par PCR en temps réel, en incluant l'analyse de nouvelles conditions environnementales comme le choc acide, ainsi que l'analyse de différentes phases de croissance bactérienne.

Dans un deuxième temps, l'étude de la transcription des gènes de virulence de *C. difficile*, parmi lesquels les gènes de colonisation précédemment étudiés, ainsi que les gènes des toxines A et B, sera réalisée en PCR en temps réel *in vivo* dans un modèle animal de souris axénique disponible au laboratoire. En effet, les observations effectuées *in vitro*, ne semblent

pas toujours refléter ce qui se passe effectivement *in vivo* [65]. Ce projet, qui a déjà fait l'objet d'une étude préliminaire [41], a pour but de mettre en évidence les gènes transcrits dans les premières étapes de la pathogenèse des infections à *C. difficile*. L'analyse des ARN des bactéries, adhérentes et intra-luminales, isolées *in vivo* nécessitera une mise au point poussée de manière à obtenir ces ARN en qualité et quantité suffisantes à l'étude transcriptionnelle.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Balotescu C., Israil A.M., Lazar V., Cernat R., Petrache L.M. and Dinu C.** 2002. Study of antibiotic influence on adherence capacity of gram positive and gram negative bacteria to cellular substrate. *Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol.* **47**:131-135.
2. **Barbut F., Decre D., Lalande V., Burghoffer B., Noussair L., Gigandon A., Espinasse F.O., Raskine L., Robert J., Mangeol A., Branger C. and Petit J.C.** 2005. Clinical features of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase)-producing strains. *J. Med. Microbiol.* **54**:181-185.
3. **Barbut F., Lalande V. and Petit J.C.** 2004. Epidémiologie et prévention des infections digestives à *Clostridium difficile*. *Rev. Franç. Lab.* **368**:27-34.
4. **Barbut F. and Petit J.C.** 1996. Epidémiologie des infections nosocomiales à *Clostridium difficile*. *Presse Med.* **25**:385-392.
5. **Barbut F., Richard A., Hamadi K., Chomette V., Burghoffer B. and Petit J.C.** 2000. Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2386-2388.
6. **Baskin H., Dogan Y., Bahar I.H. and Yulug N.** 2002. Effect of subinhibitory concentrations of three quinolones on adherence of uropathogenic strains of *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **19**:79-82.
7. **Beaugerie L., Flahault A., Barbut F., Atlan P., Lalande V., Cousin P., Cadilhac M. and Petit J.C.** 2003. Antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* in the community. *Aliment Pharmacol. Ther.* **17**:905-912.
8. **Bélanger S.D., Boissinot M., Clairoux N., Picard F.J. and Bergeron M.G.** 2003. Rapid detection of *Clostridium difficile* in feces by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **41**:730-734.
9. **Bernardo K., Pakulat N., Fleer S., Schnaith A., Utermöhlen O., Krut O., Müller S. and Krönke M.** 2004. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:546-555.
10. **Beveridge TJ and col.** 1997. Functions of S-layers. *Microbiol Rev.* **20**:99-149.
11. **Bignardi G.E.** 1998. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. *J. Hosp. Inf.* **40**:1-15.
12. **Bisognano C., Vaudaux P., Rohner P., Lew D.P. and Hooper D.C.** 2000. Induction of fibronectin-binding proteins and increased adhesion of quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* by subinhibitory levels of ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1428-1437.
13. **Blot E., Escande M.C., Besson D., Barbut F., Granpeix C., Asselain B., Falcou M.C. and Pouillart P.** 2003. Outbreak of *Clostridium difficile*-related diarrhoea in an adult oncology unit : risk factors and microbiology characteristics. *J. Hosp. Inf.* **53**:187-192.

14. **Borriello S.P., Wren B.W., Hyde S., Seddon S.V., Sibbons P., Krishna M.M., Tabaqchali S., Manek S. and Price A.B.** 1992. Molecular, immunological, and biological characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* **60**:4192-4199.
15. **Brüggemann H., Bäumer S., Fricke W.F., Wiezer A., Liesegang H., Decker I., Herzberg C., Martinez-Arias R., Merki R., Henne A. and Gottschalk G.** 2003. The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease. *PNAS* **100**:1316-1321.
16. **Bustin S.A.** 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) : trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **29**:23-39.
17. **Calabi E., Calabi F., Phillips A.D. and Fairweather N.** 2002. Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. *Infect. Immun.* **70**:5770-5778.
18. **Calabi E., Ward S., Wren B., Paxton T., Panico M., Morris H., Dell A., Dougan G. and Fairweather N.** 2001. Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*. *Mol. Microbiol.* **40**:1187-1199.
19. **Carasco B., Cozar M.C., Lurz R., Alonso J.C. and Ayora S.** 2004. Genetic recombination in *Bacillus subtilis* 168 : contribution of holliday junction processing functions in chromosome segregation. *J. Bacteriol.* **186**:5557-5566.
20. **Cerquetti M., Molinari A., Sebastianelli A., Diociaiuti M., Petruzzelli R., Capo C. and Mastrantonio P.** 2000. Characterization of surface layer proteins from different *Clostridium difficile* clinical isolates. *Microb. Pathog.* **28**:363-372.
21. **Cerquetti M., Serafin A., Sebastianelli A. and Mastrantonio P.** 2002. Binding of *Clostridium difficile* to Caco-2 epithelial cell line and to extracellular matrix proteins. *Immun. Med. Microbiol.* **32**:211-218.
22. **Chang V.T. and Nelson K.** 2000. The role of physical promiscuity in nosocomial diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* **31**:717-722.
23. **Chaves-Orlate E., Löw P., Freer E., Norlin T., Weldmann M., Von Eichel-Streiber C. and Thelestam M.** 1999. A novel cytotoxin from *Clostridium difficile* serogroup F is a functional hybrid between two other large clostridial cytotoxins. *J. Biol. Chem.* **274**:11046-11052.
24. **Cheung A.L., Bayer A.S., Zhang G., Gresham H. and Xiong Y.Q.** 2004. Regulation of virulence determinants *in vitro* and *in vivo* in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **40**:1-9.
25. **Clarke S.R., Wiltshire M.D. and Foster S.J.** 2004. IsdA of *Staphylococcus aureus* is a broad-spectrum, iron-regulated adhesin. *Mol. Microbiol.* **15**:1509-1519.
26. **Decré D., Tankovic J., Barbut F. and Petit J.C.** 2004. Sensibilité de *Clostridium difficile* aux antibiotiques et traitement des infections. *Rev. Franç. Lab.* **368**:65-71.
27. **Delmée M., Homel M. and Wauters G.** 1985. Serogrouping of *Clostridium difficile* strains by slide agglutination. *J. Clin. Microbiol.* **21**:323-327.

28. **Delmée M., Van Broeck J., Simon A., Janssens M. and Avesani V.** 2005. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea : a plea for culture. *J. Med. Microbiol.* **54**:187-191.
29. **Delmée M.** *Clostridium difficile*. Dans : Précis de Bactériologie Clinique. Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C. Paris : Ed. ESKA et EAL. 2000. 1559-1568.
30. **Drudy D., O'Donoghue D.P., Baird A., Fenelon L. and O'Farrelly C.** 2001. Flow cytometric analysis of *Clostridium difficile* adherence to human intestinal epithelial cells. *J. Med. Microbiol.* **50**:526-534.
31. **Dupuy B. and Sonenshein A.L.** 1998. Regulated transcription of *Clostridium difficile* toxin genes. *Mol. Microbiol.* **27**:107-120.
32. **Durand J.M., Dagberg B., Uhlin B.E. and Bjork G.R.** 2000. Transfer RNA modification, temperature and DNA superhelicity have a common target in the regulatory network of the virulence of *Shigella flexneri* : the expression of *virF* gene. *Mol. Microbiol.* **35**:924-935.
33. **Eleaume H. and Jabbouri S.** 2004. Comparison of two standardisation methods in real-time quantitative RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* genes expression during *in vitro* growth. *J. Microbiol. Methods.* **59**:363-370.
34. **Faust C., Ye B. and Song K.P.** 1998. The enzymatic domain of *Clostridium difficile* toxin A is located within its N-terminal region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**:100-105.
35. **Fiorentini C., Fabbri A., Falzano L., Fattorossi A., Matarrese P., Rivabene R. and Donelli G.** 1999. *Clostridium difficile* toxin B induces apoptosis in intestinal cultured cells. *Infect. Immun.* **66**:2660-2665.
36. **Fonseca A.P., Extremina C., Fonseca A.F. and Sousa J.C.** 2004. Effect of subinhibitory of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* **53**:903-910.
37. **Frisch C., Gerhard R., Aktories K., Hofmann F. and Just I.** 2003. The complete receptor-binding domain of *Clostridium difficile* toxin A is required for endocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**:706-711.
38. **Gemmell C.G.** 1995. Antibiotics and the expression of staphylococcal virulence. *J. Antimicrob. Chemother.* **36**:283-291.
39. **Gemmell C.G., Peterson P.K., Schmeling D., Kim Y., Mathews J., Wannamaker L. and Quie P.G.** 1981. Potentiation of opsonization and phagocytosis of *Streptococcus pyogenes* following growth in the presence of clindamycin. *J. Clin. Investig.* **67**:1249-1256.
40. **Gemmell C.G., Peterson P.K., Schmeling D., Mathews J. and Quie P.G.** 1983. Antibiotic-induced modification of *Bacteroides fragilis* and its susceptibility to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **2**:327-334.
41. **Grenerly J.** 2003. DEA : Analyse de protéines de surface impliquées dans l'adhérence de *Clostridium difficile* aux tissus hôtes et de l'expression de leurs gènes.

42. **Hammond G.A. and Johson J.L.** 1995. The toxigenic element of *Clostridium difficile* strain VPI 10463. *Microb. Pathog.* **19**:203-213.
43. **Hammond G.A., Lyerly D.M. and Johnson J.L.** 1997. Transcriptional analysis of the toxigenic element of *Clostridium difficile*. *Microb. Pathog.* **22**:143-154.
44. **Hennequin C., Collignon A. and Karjalainen T.** 2001. Analysis of expression of GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* in response to stress. *Microb. Pathog.* **31**:255-260.
45. **Hennequin C., Janoir C., Barc M.C., Collignon A. and Karjalainen T.** 2003. Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. *Microbiology* **149**:2779-2787.
46. **Hennequin C., Porcheray F., Waligora-Dupriet A.J., Collignon A., Barc M.C., Bourlioux P. and Karjalainen T.** 2001. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology* **147**:87-96.
47. **Herbert S., Barry P. and Novick R.P.** 2001. Subinhibitory clindamycin differentially inhibits transcription of exoproteins gene in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **69**:2996-3003.
48. **Hofmann F., Busch C., Prepens U., Just I. and Aktories K.** 1997. Localization of the glucosyltransferase activity of *Clostridium difficile* toxin B to the N-terminal part of the holotoxin. *Biol Chem.* **272**:11074-11078.
49. **Hundsberger T., Braun V., Weidmann M., Leukel P., Sauerborn M. and von Eichel-Streiber C.** 1997. Transcription analysis of the genes *tcdA-E* of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*. *Eur. J. Biochem.* **244**:735-742.
50. **Janoir C. and Collignon A.** 2004. Facteurs de virulence de *Clostridium difficile*. *Rev. Franç. Lab.* **368**:43-50.
51. **Janoir C., Grénerly J., Savariau-Lacomme M.P. and Collignon A.** 2004. Caractérisation d'une protéase extracellulaire de *Clostridium difficile*. *Pathol. Biol.* **52**:444-449.
52. **Johnson S., Homann S.R., Bettin K.R., Quick J.N., Clabots C.R., Peterson L.R. and Gerding D.N.** 1992. Treatment of asymptomatic *Clostridium difficile* carriers (faecal excretors) with vancomycin or metronidazole. *Ann. Intern. Med.* **117**:297-302.
53. **Just I. and Gerhard R.** 2004. Large clostridial cytotoxins. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **152**:23-47.
54. **Karjalainen T., Saumier N., Barc M.C., Delmée M. and Collignon A.** 2002. *Clostridium difficile* genotyping based on *slpA* variable region in S-layer gene sequence : an alternative to serotyping. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2452-2458.
55. **Karjalainen T., Waligora-Dupriet A.J., Cerquetti M., Spigaglia P., Maggioni A., Mauri P. and Mastrantonio P.** 2001. Molecular and genomic analysis of genes encoding surface-anchored proteins from *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* **69**:3442-3446.
56. **Karlsson S., Dupuy B., Mukherjee K., Norin E., Burman L.G. and Åkerlund T.** 2003. Expression of *Clostridium difficile* toxins A and B and their sigma factor TcdD is controlled by temperature. *Infect. Immun.* **71**:1784-1793.

57. **Kim S.H., Ahn S.H., Lee J.H., Lee E.M., Kim N.H., Park K.J. and Kong I.S.** 2003. Genetic analysis of phosphomannomutase/phosphoglucomutase from *Vibrio furnissii* and characterization of its role in virulence. *Arch. Microbiol.* **180**:240-250.
58. **Krivan H.C., Clark G.F., Smith D.F. and Wilkins T.D.** 1986. Cell surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin : evidence for a glycoconjugate containing the sequence Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc. *Infect. Immun.* **53**:573-581.
59. **Lalande V., Barbut F. and Petit J.C.** 2004. Diagnostic bactériologique des infections liées à *Clostridium difficile*. *Rev. Franç. Lab.* **368**:57-63.
60. **Leclerc G.J., Tartera C. and Metcalf E.S.** 1998. Environmental regulation of *Salmonella typhi* invasion-defective mutants. *Infect. Immun.* **66**:682-691.
61. **Lemée L. and Pons J.L.** 2004. Les méthodes de typages appliquées à *Clostridium difficile* : principes et intérêts. *Rev. Franç. Lab.* **368** :35-41.
62. **Lemée L., Bourgeois I., Ruffin E., Collignon A., Lemeland J.F. and Pons J.L.** Multilocus analysis of virulence genes of *Clostridium difficile*. *Soumis à Microbiology.*
63. **Litwin C.M. and Calderwood S.B.** 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**:137-149.
64. **Lyerly D.M., Barroso L.A., Wilkins T.D., Depitre C. and Corthier G.** 1992. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* **60**:4633-4639.
65. **Mahan M.J., Heithoff D.M., Sinsheimer R.L. and Low D.A.** 2000. Assessment of bacterial pathogenesis by analysis of gene expression in the host.
66. **Mahida Y.R., Makh S., Hyde S., Gray T. and Borriello S.P.** 1996. Effect of *Clostridium difficile* toxin A on human intestinal epithelial cells : induction of interleukin 8 production and apoptosis after cell detachment. *Gut* **38**:337-47.
67. **Mani N. and Dupuy B.** 2001. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**:5844-5849.
68. **McIver K.S., Heath A.S. and Scott J.R.** 1995. Regulation of virulence by environmental signals in group A Streptococci : influence of osmolarity, temperature, gas exchange, and iron limitation on *emm* transcription. *Infect. Immun.* **63**:4540-4542.
69. **Miller M.A., Hyland M., Ofner-Agostini M., Gourdeau M. and Ishak M.** 2002. Morbidity, mortality, and healthcare burden of nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhea in Canadian hospitals. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **23**:137-140.
70. **Moncrief J.S., Barroso L.A. and Wilkins T.D.** 1997. Positive regulation of *Clostridium difficile* toxins. *Infect. Immun.* **65**:1105-1108.
71. **Morrissey J.A., Cockayne A., Hammacott J., Bishop K., Denman-Johnson A., Hill P.J. and Williams P.** 2002. Conservation, surface-exposure, and *in vivo* expression of the Frp family of iron-regulated cell wall proteins in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **70**:2399-2407.

72. **Nakamura T., Hasegawa T., Torii K., Hasegawa Y., Shimokata K. and Ohta M.** 2004. Two-dimensional gel electrophoresis analysis of the abundance of virulent exoproteins of group A streptococcus caused by environmental changes. *Arch. Microbiol.* **181**:74-81.
73. **Nusrat A., Von Eichel-Streiber C., Turner J.R., Verkade P., Madara J.L. and Parkos C.A.** 2001. *Clostridium difficile* toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins. *Infect. Immun.* **69**:1329-1336.
74. **Pfeifer G., Schirmer J., Leemhuis J., Busch C., Meyer D.K., Aktories K. and Barth H.** 2003. Cellular uptake of *Clostridium difficile* toxin B - Translocation of the N-terminal catalytic domain into the cytosol of eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* **278**:44535-44541.
75. **Podbielski A., Woischnik M., Kreikemeyer B., Bettenbrock K. and Buttaro B.A.** 1999. Cysteine protease SpeB expression in group A streptococci is influenced by the nutritional environment but SpeB does not contribute to obtaining essential nutrients. *Med. Microbiol. Immunol.* **188**:99-109.
76. **Poilane I., Karjalainen T., Barc M.C., Bourlioux P. and Collignon A.** 1998. Protease activity of *Clostridium difficile* strains. *Can. J. Microbiol.* **44**:151-161.
77. **Pothoulakis C.** 2000. Effects of *Clostridium difficile* toxins on epithelial cell barrier. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **915**:347-356.
78. **Poutanen S.M. and Simor A.E.** 2004. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *Can. Med. Assoc. J.* **171**:51-58.
79. **Regni C., Tipton P.A. and Beame L.J.** 2002. Crystal structure of PMM/PGM : an enzyme in the biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Structure* **10**:269-279.
80. **Rupnik M., Avesani V., Janc M., Von Eichel-Streiber C. and Delmée M.** 1998. A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2240-2247.
81. **Rupnik M., Brazier J.S., Duerden B.I., Grabnar M. and Stubbs S.L.J.** 2001. Comparison of toxinotyping and PCR-ribotyping of *Clostridium difficile* strains and description of novel toxinotypes. *Microbiology* **141**:439-447.
82. **Rupnik M., Kato N., Grabnar M. and Kato H.** 2003. New types of toxin A-negative, toxin B-positive strains among *Clostridium difficile* isolates from Asia. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1118-1125.
83. **Sambrook J. and Russell DW.** Separation of RNA according to size : electrophoresis of glyoxylated RNA through agarose gels. In : *Molecular Cloning*. New-York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. **Vol. 1**, 7.27-7.30.
84. **Savariau-Lacomme M.P.** 2002. DEA : Analyse d'un cluster de gènes codant des protéines de surface chez *Clostridium difficile*.
85. **Savariau-Lacomme M.P., Lebarbier C., Karjalainen T., Collignon A. and Janoir C.** 2003. Transcription and analysis of polymorphism in a cluster of genes encoding surface-associated proteins of *Clostridium difficile*. *J. Bacteriol.* **185**:4461-4470.

86. **Savidge T.C., Pan W.H., Newman P., O'Brien M., Anton P.M. and Pothoulakis C.** 2003. *Clostridium difficile* toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. *Gastroenterology* **125**:413-420.
87. **Seddon S.V. and Borriello S.P.** 1992. Proteolytic activity of *Clostridium difficile*. *J. Med. Microbiol.* **36**:301-311.
88. **Seddon S.V., Hemingway I. and Borriello S.P.** 1990. Hydrolytic enzyme production by *Clostridium difficile* and its relationship to toxin production and virulence in the hamster model. *J. Med. Microbiol.* **31**:169-174.
89. **Surawicz C.M.** 2003. Probiotics, antibiotics-associated diarrhea and *Clostridium difficile*-associated diarrhea in humans. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **17**:775-783.
90. **Sweeney N.J., Klemm P., McCormick B.A., Moller-Nielsen E., Utley M., Schembri M.A., Laux D.C. and Cohen P.S.** 1996. The *Escherichia coli* K-12 *gntP* gene allows *E. coli* F-18 to occupy a distinct nutritional niche in the streptomycin-treated mouse large intestine. *Inf. Immun.* **64**:3497-3503.
91. **Tamura G.S., Kuypers J.M., Smith S., Raff H. and Rubens C.E.** 1994. Adherence of group B Streptococci to cultured epithelial cells : roles of environmental factors and bacterial surface components. *Infect. Immun.* **62**:2450-2458.
92. **Tan K.S., Wee B.Y. and Song K.P.** 2001. Evidence for holin function of *tdcE* gene in the pathogenicity of *Costridium difficile*. *J. Med. Microbiol.* **50**:613-619.
93. **Tasteyre A., Barc M.C., Collignon A., Boureau H. and Karjalainen T.** 2001. Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infect. Immun.* **69**:7937-7940.
94. **Tasteyre A., Karjalainen T., Avesani V., Delmée M., Collignon A., Bourlioux P. and Barc M.C.** 2001. Molecular characterization of *fliD* gene encoding flagellar cap and its expression among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1178-1183.
95. **Toyokawa M., Ueda A., Tsukamoto H., Nishi I., Horikawa M., Sunada A. and Asari S.** 2003. Pseudomembranous colitis caused by toxin A-negative/toxin B-positive variant strain of *Clostridium difficile*. *J. Infect. Chemother.* **9**:351-354.
96. **VanHeyningen T., Fogg G., Yates D., Hanski E. and Caparon M.** 1993. Adherence and fibronectin binding are environmentally regulated in the group A streptococci. *Mol. Microbiol.* **9**:1213-1222.
97. **Voth D.E. and Ballard J.D.** 2005. *Clostridium difficile* toxins : mechanism of action and role in disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**:247-263.
98. **Waligora A.J., Barc M.C., Bourlioux P., Collignon A. and Karjalainen T.** 1999. *Clostridium difficile* cell attachment is modified by environmental factors. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4234-4238.
99. **Waligora A.J., Hennequin C., Mullany P., Bourlioux P., Collignon A. and Karjalainen T.** 2001. Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infect. Immun.* **69**:2144-2153.

100. **Wexler H., Mulligan M.E. and Finegold S.M.** 1984. Polyacrylamide gel electrophoresis patterns by *Clostridium difficile*. Rev. Infect. Dis. **6 Suppl 1**:S229-234.
101. **Wilcox M.H.** 2003. Gastrointestinal disorders and the critically ill. *Clostridium difficile* infection and pseudomembranous colitis. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. **17**:475-493.

ANNEXES

Annexe 1

Milieux de culture :

- Gélose Columbia + sang de cheval :
 - Mélange spécial de peptones 23 g
 - Amidon 1 g
 - NaCl 5 g
 - Agar 10 g
 - Sang de cheval 5 %
- TGY liquide :
 - Trypticase 30 g
 - Extrait de levure 20 g
 - Chlorhydrate de cystéine 1 g
 - Glucose 5g
 - Eau millipore qsp 1 L
 - pH 7,4 (avant autoclavage)

Tampons pour Western-Blot

- Tampon de transfert :
 - Tris base 25 mM
 - Glycine 192 mM
 - Méthanol 20 %
 - pH 8,3
- Tampon TNT :
 - NaCl 150 mM
 - Tris-HCl pH 8,0 10 mM
 - Tween 20 0,05 %
 - Eau millipore qsp 1 L

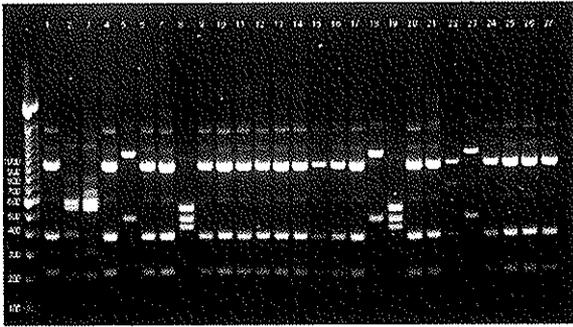
Tampons pour Northern-Blot

- Tampon de lavage I :
 - Urée 2 M
 - SDS 0,1 %
 - Phosphate de sodium 0,5 M pH 7,0 50 mM
 - NaCl 150 mM
 - MgCl₂ 1,0 M 1 mM
 - Blocking reagent 0,2 %
 - Eau DEPC qsp 1 L
- Tampon de lavage II - solution 20X :
 - Tris base 1 M
 - NaCl 2 M
 - Eau DEPC qsp 1 L
 - pH 10,0
- Tampon de lavage II - solution de travail :
 - solution 20X diluée au 1/20 en eau DEPC
 - MgCl₂ 2 mM

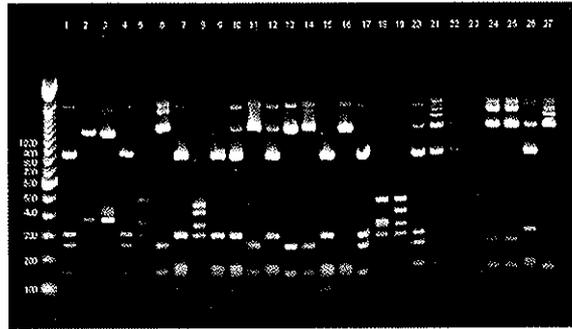
Annexe 2

Empreintes RFLP des différents gènes étudiés

Souches de *C. difficile* : 1-630 ; 2-Réf.A ; 3-Réf.B ; 4-Réf.C ; 5-Réf.D ; 6-Réf.F ; 7-Réf.G ; 8-Réf.H ; 9-Réf.I
10-Réf.K ; 11-Réf.X ; 12-79685 ; 13-GAI95600 ; 14-GAI95601 ; 15-GAI97480
16-Kohn ; 17-C253 ; 18-93136 ; 19-93369 ; 20-95938 ; 21-94416 ; 22-56026
23-53444 ; 24-5168 ; 25-CO109 ; 26-SE810 ; 27-36678



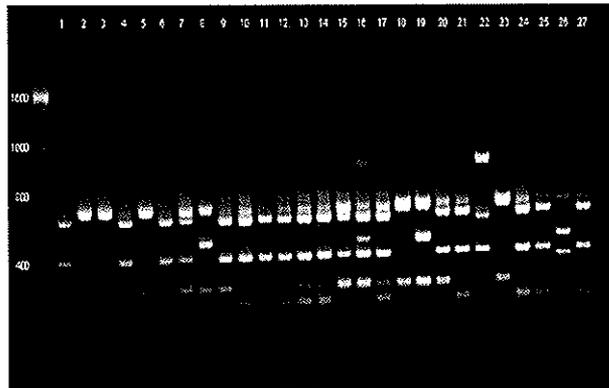
orf6 – enzyme DraI



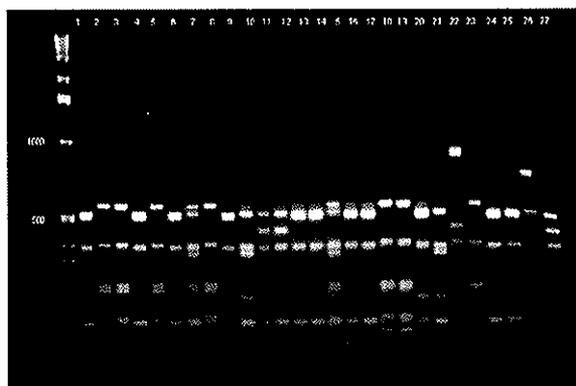
orf6 – enzyme RsaI



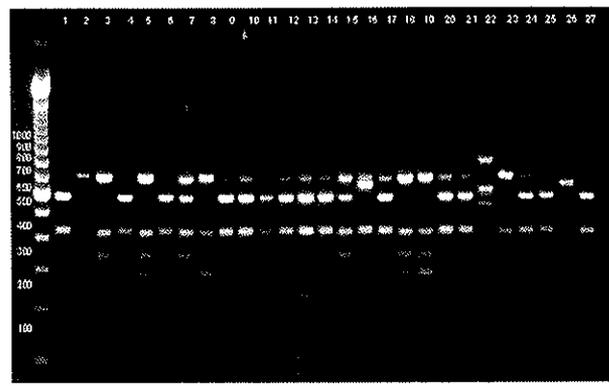
orf6 – enzyme AluI



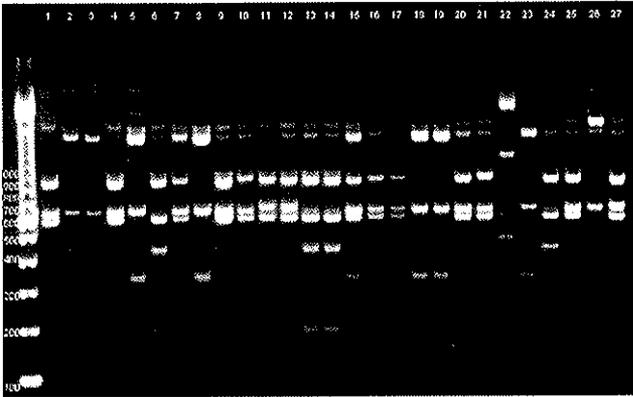
orf7 – enzyme DraI



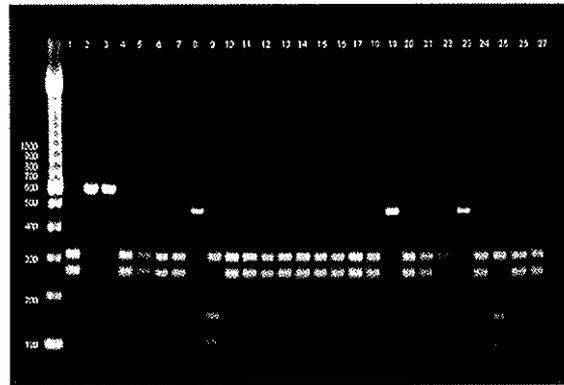
orf7 – enzyme AfaI



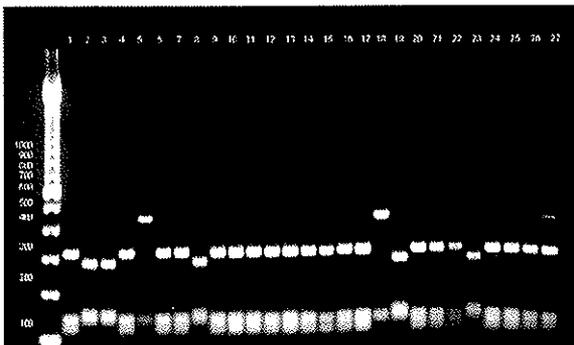
orf7 – enzyme HinfI



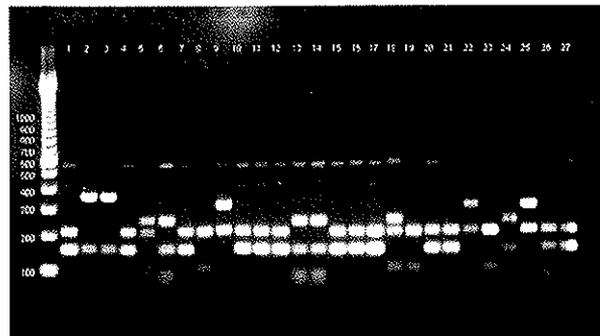
orf7 – enzyme *HindIII*



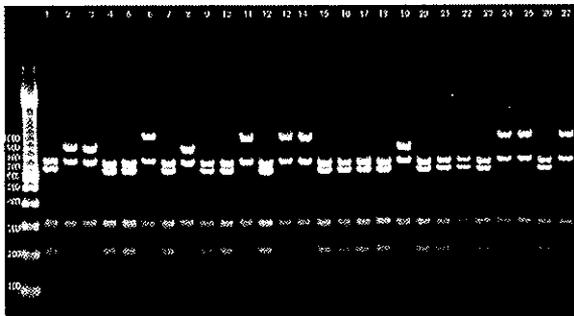
orf9 – enzyme *AfaI*



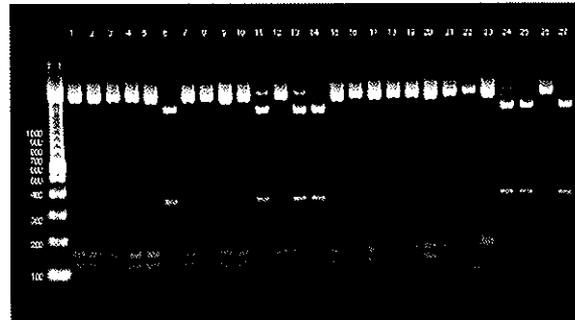
orf9 – enzyme *DraI*



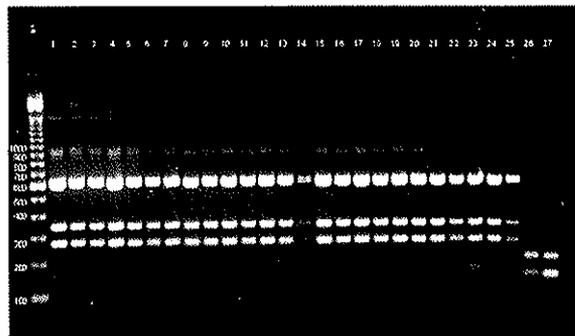
orf9 – enzyme *AluI*



orf12 – enzyme *AfaI*



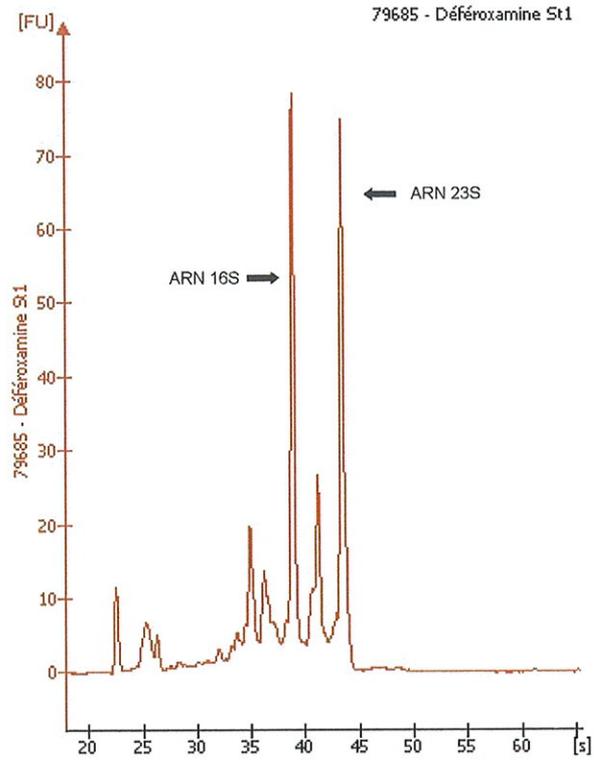
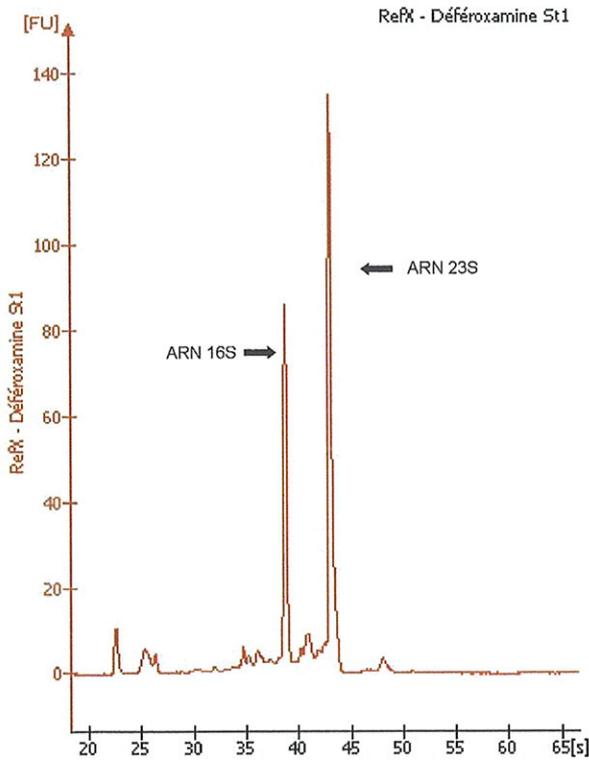
orf12 – enzyme *DraI*



orf12 – enzyme *SspI*

Annexe 3

Analyse d'ARN par le système Agilent



ARN de très bonne qualité

$$R_{23S/16S} = 1,8$$

- $R > 1,6$

- absence de pic parasite

⇒ ARN utilisé pour la PCR en temps réel

ARN dégradé

$$R_{23S/16S} = 1,2$$

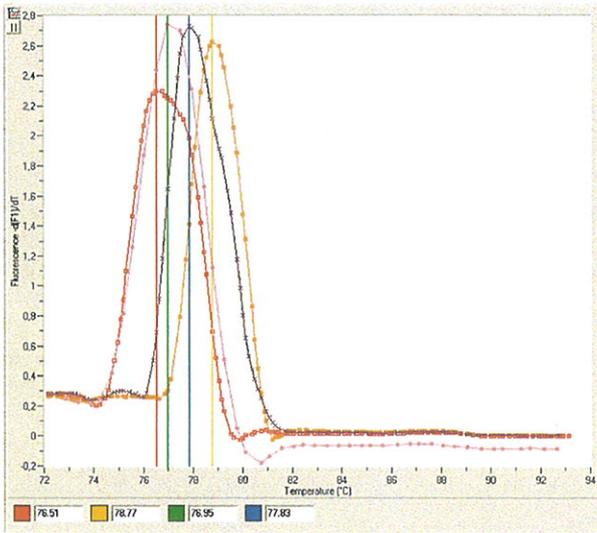
- $R < 1,5$ (pic d'ARN 23S faible)

- Présence de pics parasites

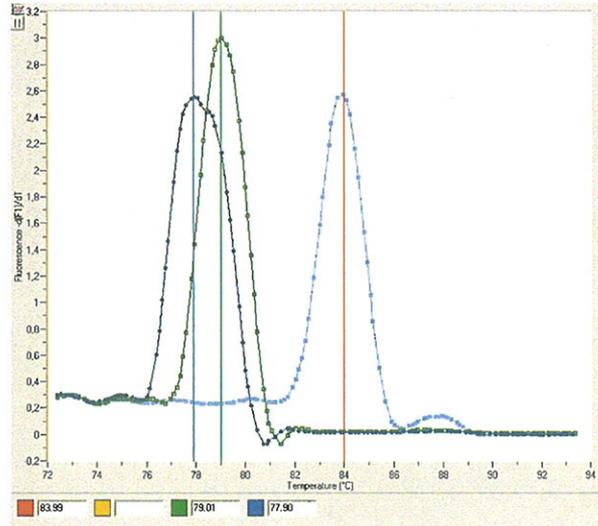
⇒ ARN non utilisé pour la PCR en temps réel

Annexe 4

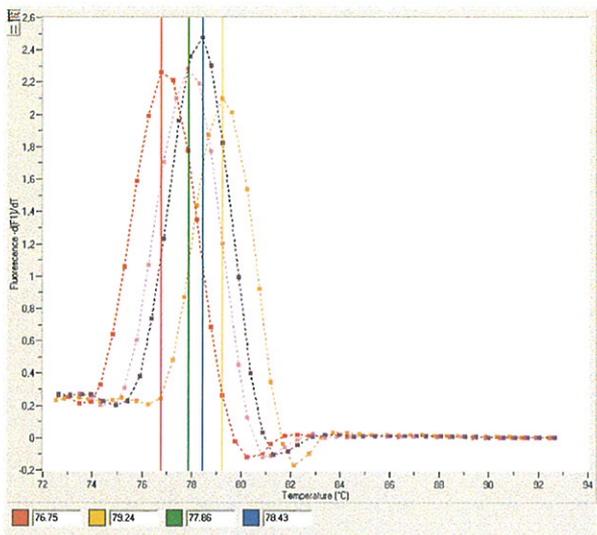
PCR en temps réel : courbes de fusion



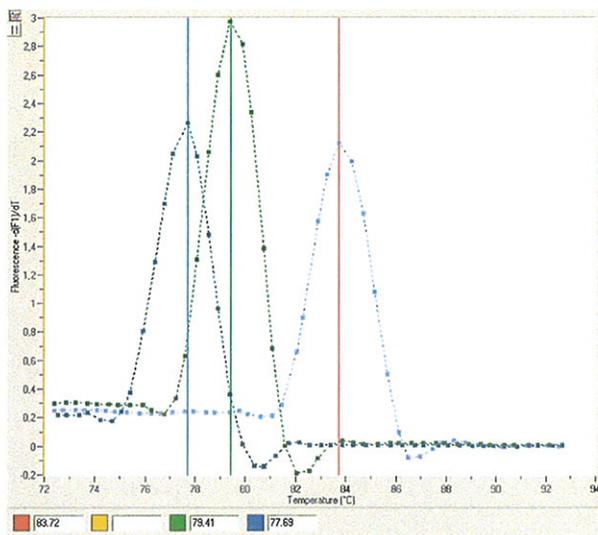
Courbe de fusion : gènes d'intérêt
souche 79685



Courbe de fusion : gènes d'intérêt
souche 79685



Courbe de fusion : gènes d'intérêt
souche Réf. X



Courbe de fusion : gènes de normalisation
souche Réf. X

Gènes d'intérêt :

- *cwp84*
- *cwp66*
- *slpA* (P36)
- *slpA* (P47)

Gènes de normalisation :

- *16srrna*
- *gyrA*
- *gluD*

ABBREVIATIONS

- AP-PCR : arbitrary primed PCR
- RAPD : random amplified polymorphic DNA
- AFLP : amplified fragment length polymorphism
- MLST : multilocus sequence typing
- PCR-RFLP : polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	9
A. Infections à <i>Clostridium difficile</i>	10
1. Epidémiologie	10
2. Présentations cliniques	10
3. Diagnostic	11
4. Traitement	13
5. Physiopathologie	14
B. Régulation de l'expression des facteurs de colonisation et des facteurs de virulence	25
1. Exemples de régulation chez différentes bactéries	27
2. Régulation des facteurs de colonisation et de virulence de <i>C. difficile</i>	29
TRAVAUX PERSONNELS	31
OBJECTIFS	32
MATÉRIELS ET MÉTHODES	33
A. Analyse du génome environnant le cluster de protéines de surface	33
B. Souches bactériennes et conditions de culture	33
C. Analyse du polymorphisme par PCR-RFLP	33
1. Extraction d'ADN	33
2. PCR-RFLP	35
D. Etude de la régulation du cluster d'intérêt	35
1. Choix des conditions de culture	35
2. Analyse de l'expression des protéines P36, P47, Cwp66 et Cwp84	38
3. Analyse de l'expression des gènes <i>slpA</i> , <i>cwp66</i> et <i>cwp84</i>	40
RÉSULTATS	48
A. Analyse du génome environnant le cluster de protéines de surface	48
B. Analyse du polymorphisme des gènes <i>orf6</i>, <i>orf7</i>, <i>orf8</i>, <i>orf9</i> et <i>orf12</i>	51
1. Amplification des gènes	51
2. Polymorphisme du gène <i>orf6</i>	51

3. Polymorphisme du gène <i>orf7</i>	54
4. Polymorphisme du gène <i>orf9</i>	54
5. Polymorphisme du gène <i>orf12</i>	54
C. Etude de la régulation du cluster d'intérêt	54
1. Analyse de l'expression des protéines P36, P47, Cwp66 et Cwp84	54
2. Analyse de l'expression des gènes <i>slpA</i> , <i>cwp66</i> et <i>cwp84</i>	58
DISCUSSION et PERSPECTIVES	68
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	75
ANNEXES	84
ABREVIATIONS	90
TABLE DES MATIERES	91
TABLE DES ILLUSTRATIONS	93
LISTE DES ANNEXES	96
Serment de Galien	97

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1	Pathogenèse des infections liées à <i>Clostridium difficile</i>	15
Figure 2	Organisation schématique du cluster de gènes de 37 kb codant les protéines de <i>Clostridium difficile</i>	19
Figure 3	Structure des toxines A et B de <i>Clostridium difficile</i>	21
Figure 4	Mode d'action des toxines A et B	23
Figure 5	Organisation génétique du locus de pathogénicité de <i>C. difficile</i>	24
Figure 6	Physiopathologie des infections digestives liées à <i>C. difficile</i>	26
Figure 7	Montage du transfert par capillarité	42
Figure 8	Organisation schématique de l'environnement du cluster de protéines de surface	49
Figure 9	Migration des extraits de protéines de couche S des souches 79685 (A), Réf.X (B) et GAI95601 (C)	57
Figure 10	Migration des extraits de protéines totales des souches 79685 (A), Réf.X (B) et GAI95601 (C)	57
Figure 11	Immunoblot des protéines de surface des souches 79685 (A) et Réf.X (B) révélés par l'anticorps anti-Cwp66 C-ter	59
Figure 12	Immunoblot des protéines de surface des souches 79685 (A), Réf.X (B) et GAI95601 (C) révélés par l'anticorps anti-Cwp84	59
Figure 13	Northern-Blot sur les ARN totaux extraits de la souche Réf.X, après culture dans différentes conditions environnementales, sonde <i>slpA</i>	61

Figure 14	Migration électrophorétique des produits de PCR en temps réel (souche Réf.X)	63
Figure 15	PCR en temps réel : courbe d'efficacité, gène <i>cwp66</i> , souche 79685	63
Figure 16a	Courbe de PCR en temps réel pour le gène <i>16Srrna</i> en fonction des différentes conditions environnementales étudiées	65
Figure 16b	Courbe de PCR en temps réel pour le gène <i>gyrA</i> en fonction des différentes conditions environnementales étudiées	65
Figure 17	PCR en temps réel : souche Réf.X, gène <i>cwp84</i>	67

TABLEAUX

Tableau I	Caractéristiques des souches de <i>C. difficile</i> étudiées	34
Tableau II	Amorces utilisées pour amplifier les gènes choisis pour l'étude de polymorphisme	36
Tableau III	Enzymes de restriction utilisées pour l'étude du polymorphisme des gènes d'intérêt	36
Tableau IV	Conditions de culture étudiées pour la régulation du cluster	37
Tableau V	Amorces utilisées pour la PCR en temps réel	45
Tableau VI	Homologies retrouvées avec des protéines connues pour les cadres de lecture ouverts identifiés en amont et en aval du cluster de protéines de surface	50
Tableau VII	Amplification des gènes d'intérêt pour l'étude du polymorphisme	52
Tableau VIIIa	Empreintes et profil global du gène <i>orf6</i> chez les 27 souches étudiées	53
Tableau VIIIb	Empreintes et profil global du gène <i>orf7</i> chez les 27 souches étudiées	53

Tableau VIIIc	Empreintes et profil global du gène <i>orf9</i> chez les 27 souches étudiées	55
Tableau VIIIId	Empreintes et profil global du gène <i>orf12</i> chez les 27 souches étudiées	55
Tableau IX	PCR en temps réel : rapports d'expression relative après normalisation	67
Tableau Xa	Corrélation du profil du gène <i>orf6</i> avec le séro groupe de la souche	70
Tableau Xb	Corrélation du profil du gène <i>orf9</i> avec le séro groupe de la souche	70
Tableau Xc	Corrélation du profil du gène <i>orf7</i> avec le séro groupe de la souche	71
Tableau Xd	Corrélation du profil du gène <i>orf12</i> avec le séro groupe de la souche	71

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1	Milieus de culture, Tampons pour Western-Blot, Tampons pour Northern-Blot	85
Annexe 2	Empreintes RFLP des différents gènes étudiés	86
Annexe 3	Analyse d'ARN par le système Agilent	88
Annexe 4	PCR en temps réel : courbes de fusion	89

Serment de Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

BON A IMPRIMER N° 332

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

CLOSTRIDIUM DIFFICILE :

ANALYSE D'UN CLUSTER DE GÈNES CODANT POUR DES PROTÉINES DE SURFACE

RÉSUMÉ

Le cluster de gènes étudié au cours de ce travail code des protéines de surface de *Clostridium difficile*, dont certaines semblent impliquées dans la colonisation du tube digestif par la bactérie, en particulier les protéines de couche S, l'adhésine Cwp66 et la protéase Cwp84. Les protéines codées partagent pour la plupart un domaine homologue d'ancrage à la paroi. L'analyse du polymorphisme des gènes *orf6* et *orf9*, cotranscrits respectivement avec le gène *slpA*, codant pour les protéines de la couche S, et le gène *cwp66*, d'une part, et des gènes *orf7* et *orf12*, codant pour des homologues de SecA et d'une amidase, d'autre part, n'a pas permis de mettre en évidence une corrélation entre les profils observés et l'origine géographique ou la virulence des souches. En revanche, il semble exister une corrélation entre le polymorphisme de ces quatre gènes et le sérotype des souches. L'étude de l'expression des gènes *slpA*, *cwp66*, *cwp84*, couplée à l'étude des protéines correspondantes, a été effectuée en présence de conditions environnementales mimant le milieu digestif (hyperosmolarité, concentration subinhibitrice d'ampicilline, présence d'un chélateur de fer, la déféroxamine). Les résultats concernant l'expression des ARN montre que les gènes *cwp66* et *cwp84* semblent régulés de la même manière, leur expression augmentant nettement dans les conditions testées, ce qui corrobore leur rôle potentiel dans la virulence de *C. difficile*. En revanche, l'expression du gène *slpA* est peu modifiée par les signaux environnementaux, sauf par la présence d'ampicilline. Ce résultat suggère que les protéines de la couche S pourraient n'avoir qu'un rôle structural indispensable à la survie de la bactérie quelles que soient les conditions environnementales.

DISCIPLINE – SPÉCIALITÉ DOCTORALE

Microbiologie - Bactériologie

MOTS-CLÉS : *Clostridium difficile* – protéines de surface – régulation – signaux environnementaux

LABORATOIRE DE RATTACHEMENT

EA 35-34 « Ecosystème Microbien Digestif et Santé »
Département de Microbiologie
UFR de Pharmacie, Université Paris XI
5, rue Jean-Baptiste Clément
92296 Châtenay-Malabry