HAL
open science

Influence de l'environnement sur le protéome de surface de Clostridium difficile : analyse globale et caractérisation de la cystéine protéase Cwp84

Diana Joanne Chapeton Montes

▶ **To cite this version:**

Diana Joanne Chapeton Montes. Influence de l'environnement sur le protéome de surface de Clostridium difficile : analyse globale et caractérisation de la cystéine protéase Cwp84. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114809 . tel-00790732

HAL Id: tel-00790732

https://theses.hal.science/tel-00790732v1

Submitted on 21 Feb 2013

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : MICROBIOLOGIE / THERAPEUTIQUES ANTIINFECTIEUSES

DISCIPLINE : Microbiologie et thérapeutiques antiinfectieuses

ANNÉE 2011 - 2012 SÉRIE DOCTORAT N° 1161

THÈSE DE DOCTORAT
soutenue le 06/03/2012

par

Diana Joanne CHAPETÓN MONTES

« Influence de l'environnement sur le protéome de surface de *Clostridium difficile* : analyse globale et caractérisation de la cystéine protéase Cwp84 »

Directeur de thèse : Docteur Claire JANOIR

Composition du jury :

Président du jury : Professeur Anne COLLIGNON
Rapporteurs : Docteur Agnès FOUET
Docteur Bruno DUPUY
Examinateurs : Professeur Jean-Louis PONS
Docteur Lucile PLOURDE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : MICROBIOLOGIE / THERAPEUTIQUES ANTIINFECTIEUSES

DISCIPLINE : Microbiologie et thérapeutiques antiinfectieuses

ANNÉE 2011 - 2012 SÉRIE DOCTORAT N° 1161

THÈSE DE DOCTORAT
soutenue le 06/03/2012

par

Diana Joanne CHAPETÓN MONTES

« Influence de l'environnement sur le protéome de surface de *Clostridium difficile* : analyse globale et caractérisation de la cystéine protéase Cwp84 »

Directeur de thèse : Docteur Claire JANOIR

Composition du jury :

Président du jury : Professeur Anne COLLIGNON
Rapporteurs : Docteur Agnès FOUET
Docteur Bruno DUPUY
Examinateurs : Professeur Jean-Louis PONS
Docteur Lucile PLOURDE

Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier Madame le Professeur Anne Collignon, directeur du laboratoire « Ecosystème microbien digestif et santé », de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et d'avoir accepté de présider le jury.

Je souhaite remercier le Docteur Agnès Fouet et le Docteur Bruno Dupuy d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse, ainsi que le Professeur Jean-Louis Pons et le Docteur Lucile Plourde d'avoir participé au jury en tant qu'examinateurs.

Je tiens sincèrement à exprimer ma reconnaissance envers le Docteur Claire Janoir pour l'encadrement de ma thèse et pour sa confiance tout au long des travaux réalisés ces dernières années. Je la remercie tout particulièrement pour sa gentillesse, sa disponibilité, son écoute, sa rigueur scientifique ou encore son aide très précieuse pour la rédaction de cette thèse.

Je voudrais exprimer ma gratitude à tous les membres du laboratoire pour leur aide et leur bonne humeur, entre autres. Nombreux sont ceux que j'aimerais remercier : Thomas pour sa disponibilité, ses aides en biologie moléculaire et son expertise bureautique toujours très utile ; Sylvie B. pour ses encouragements et sa disponibilité ; Sylvie L. pour ses nombreux messages d'encouragements, nos longues conversations du soir et sa générosité ; Thierry, Jean-Christophe, Séverine, Imad, Alban, Sandra et Marie-Christine pour les moments passés ensemble au laboratoire.

Je remercie également Myriam et Nicole pour leurs préparations et leur aide.

Je n'oublie pas l'ensemble des doctorants avec lesquels j'ai pu partager cette expérience : Fariza pour son soutien, nos conversations de la vie, nos rires ; Véronique, pour ses encouragements, sa bonne humeur, et également pour ses petits gâteaux qui m'ont permis de tenir ces récentes soirées passées au laboratoire ; Noraida, pour nos conversations en espagnol et son optimisme ; Amira, pour nos échanges sur les « manips », je l'encourage d'ailleurs pour ces prochains mois dédiés à la rédaction de sa thèse. Je leur souhaite à toutes bon courage pour la suite de leurs travaux de thèse.

Je tiens à saluer les étudiants que j'ai croisés ces dernières années : Nadia, Olivier, Claire, Céline, Pierre-Alain, Faten, Jamil…

Ma reconnaissance s'adresse également à Céline Boursier pour son aide en protéomique et à Claudine Deloménie pour sa précieuse aide avec les analyses de transcriptomique.

Enfin, je remercie tout particulièrement ma famille et Nicolas qui m'ont toujours soutenue.

Un grand merci à tous…

TABLE DES MATIERES

ABRÉVIATIONS **6**

INTRODUCTION **7**

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES **10**

1. Infections à *Clostridium difficile* **11**

1.1. Signes cliniques 11

1.1.1. Diarrhées simples 11

1.1.2. Colite pseudomembraneuse et complications 11

1.1.3. Signes biologiques et/ou cliniques de gravité 12

1.2. Rechutes et réinfections 12

1.3. Épidémiologie 13

1.3.1. Données générales 13

1.3.2. Modification récente de l'épidémiologie 13

1.4. Le coût des ICD 15

1.5. Portage et mode de transmission 16

1.6. Facteurs de risque 16

1.6.1. Antibiothérapie 16

1.6.2. Âge 17

1.6.3. Facteurs génétiques 18

1.6.4. Autres facteurs 18

1.7. Diagnostic 19

1.7.1. Mise en évidence des toxines dans les selles 19

1.7.2. Diagnostic bactériologique 20

1.7.3. Autres techniques diagnostiques 20

1.8. Traitement 21

1.8.1. Arrêt de l'antibiotique 21

1.8.2. Antibiothérapie spécifique 21

1.8.3. Traitement des complications 22

1.8.4. Traitement des rechutes 22

1.8.5. Traitements expérimentaux en cours 23

1.9. Prévention 24
1.9.1. Mesures générales 24
1.9.2. Vaccin anti-*C. difficile* 24

2. Pathogénèse 26
2.1. Facteurs de colonisation 26
2.1.1. Les protéines de la paroi « Cwps (Cell Wall Proteins) » 27
2.1.2. Autres protéines de surface 31
2.2. Facteurs majeurs de virulence : les toxines 34
2.2.1. Les toxines A et B 34
2.2.2. Effets physiopathologiques 35
2.2.3. Mécanisme d'action 36
2.2.4. La toxine CDT 37
2.3. Souches épidémiques 38
2.3.1. PCR ribotype 027 38
2.3.2. PCR ribotype 078/126 38

3. Les protéases 39
3.1. Classification 39
3.1.1. Exopeptidases 39
3.1.2. Endopeptidases 40
3.2. Cystéine protéases 41
3.2.1. Mécanisme catalytique 42
3.3. Rôles des protéases 43
3.3.1. Action sur les protéines de l'hôte 44
3.3.2. Action sur le système immunitaire 45
3.3.3. Productions des nutriments 47
3.4. Maturation et activation des protéines bactériennes 48
3.4.1. Régulation de l'activité des protéases et du processus protéolytique 48
3.4.2. Processus de maturation des protéases 49
3.4.3. Rôle de la maturation de protéines bactériennes dans la virulence 50
3.5. Facteurs protéolytiques chez *C. difficile* 51
3.5.1. La cystéine protéase : Cwp84 52
3.5.2. La cystéine protéase : Cwp13 53

4. Régulation de la production des facteurs de virulence 55
4.1. Systèmes de détection et de transduction du signal 55
4.1.1. Les systèmes à deux composants 56
4.1.2. Le quorum-sensing 56
4.2. Régulation liée aux facteurs environnementaux 57
4.2.1. La température 57
4.2.2. Le fer 58
4.2.3. Répression catabolique 59
4.2.4. Le pH 62
4.3. Régulation des facteurs de virulence chez *C. difficile* 62
4.3.1. Les systèmes de détection et de transduction du signal chez *C. difficile* 63
4.3.2. Facteurs environnementaux modulant l'expression des facteurs de virulence de *C. difficile* 65

TRAVAUX PERSONNELS 68

LA CYSTEINE PROTEASE, CWP84 70

1. Introduction 71

2. Article 1 72

3. Article 2 82

4. Autres résultats 97
4.1. Processus protéolytique et/ou dégradation pendant la purification ? 97
4.1.1. Impact d'un lysat de *E. coli* sur la $Cwp84_{C116A}$ 97
4.1.2. Purification de $Cwp84_{30-803}$ avec l'urée 97
4.2. Purification des protéases mutées : $Cwp84_{H262A}$ et du double mutant $Cwp84_{C116A/H262A}$ 98
4.3. Purification de la souche mutante $Cwp84_{C116A}$ avec PMSF 98
4.4. Réassociation 99
4.5. Activité protéolytique des cultures bactériennes 99
4.6. Activité de la protéase sur les protéines recombinantes de la couche S 100

5. Discussion 101

6. Conclusion et perspectives 107

REGULATION DE LA PRODUCTION DES FACTEURS DE VIRULENCE DE *C. DIFFICILE* PAR L'ENVIRONNEMENT 109

1. Introduction 110

2. Matériel et méthodes 111

2.1. Souches bactériennes et conditions de culture 111

2.2. Extraction des protéines de surface 111

2.3. Analyse des protéines de surface par immunoblot 111

2.4. Analyse des protéines de surface par électrophorèse 2-D 112

2.4.1. Préparation des échantillons 112

2.4.2. Isoélectrofocalisation (IEF) : 1ère dimension 113

2.4.3. Etape d'équilibration 113

2.4.4. 2ème dimension : SDS-PAGE 114

2.4.5. Coloration des protéines 114

2.5. Identification des protéines par spectrométrie de masse 114

2.5.1. Digestion des protéines et extraction des peptides 114

2.5.2. Analyse des échantillons par spectrométrie de masse 115

2.5.3. Identification des protéines par recherche dans les bases de données 116

2.6. Quantification des gènes codant des facteurs de virulence par RT-PCR 116

2.6.1. Extraction des ARN totaux 116

2.6.2. Synthèse des ADNc 116

2.6.3. Quantification de l'expression des gènes en RT-PCR 117

3. Résultats et discussion 118

3.1. Cartographie de l'extrait des protéines de surface en TGY 118

3.1.1. Identification des protéines par spectrométrie de masse MALDI-TOF 118

3.2. Comparaison des profils des protéines de surface après culture en TGY et en TY 121

3.2.1. Analyse des protéines de surface par électrophorèse 2D 121

3.2.2. Analyse des protéines de surface par immunoblot 122

3.2.3. Analyse transcriptionnelle 122

4. Conclusion et perspectives 122

IDENTIFICATION DE FACTEURS DE VIRULENCE POTENTIELS 125

1. Introduction et objectifs de l'étude 126

2. Matériel et méthodes..... 126

2.1. Souches bactériennes et conditions de culture 126

2.2. Test d'adhésion de *C. difficile* au plasminogène immobilisé 126

2.3. Mutagenèse par le système du ClosTron 127

2.3.1. Principe de la technique 127

2.3.2. Choix des sites de mutation sur les gènes d'intérêt..... 128

2.3.3. Construction du plasmide pMTL007 128

2.3.4. Transformation et conjugaison avec *C. difficile*..... 129

2.3.5. Analyse des clones 130

3. Résultats et discussion 130

3.1. Repérage de facteurs de virulence potentiels 130

3.1.1. L'énolase 130

3.1.2. La GAPDH..... 131

3.1.3. Le facteur d'élongation EF-Tu..... 132

3.2. Liaison au plasminogène de la bactérie entière 132

3.3. Inactivation du gène *eno*..... 133

4. Conclusions et perspectives..... 134

CONCLUSION GÉNÉRALE 136

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 139

ABRÉVIATIONS

ACN	Acétronitrile
Agr	Accesory gene regulator
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Albumine sérique bovine
CCR	Carbon catabolite repression (Répression catabolique du carbone)
CcpA	Catabolite control protein A
CNR	Centre National de Référence
CPM	Colites pseudomembraneuse
DTT	Dithiothréitol
EIA	Enzyme immunoassays
ESCMID	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
ETEC	*Escherichia coli* entérotoxigènes
FQs	Fluoroquinolones
Fur	Ferric uptake regulator (Régulateur absorption ferrique)
ICD	Infections à *C. difficile*
IEF	Isoelectrofocalisation
IL-8	Interleukine 8
IPP	Inhibiteurs de la pompe à protons
MICI	Maladies inflammatoires chroniques intestinales
PrfA	Activateur transcriptionnel PrfA (Positif Regulator Factor A)
PTS	Système de phosphotransférases
RAM	Retrotransposition Activated selectable Marker
RAISIN	Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales
SNP	Single-nucleotide polymorphism (Polymorphisme sur un nucléotide)
SPI1l 1	*Salmonella enterica* pathogenicity island 1 (îlot de pathogénicité SPI1)
TNF-α	Tumor necrosis facteur alpha (Facteur de nécrose tumorale)

INTRODUCTION

Clostridium difficile est la principale bactérie responsable des diarrhées nosocomiales faisant suite à une antibiothérapie, elle est également responsable de 95% des cas des colites pseudomembraneuses. Actuellement, les infections à *C. difficile* représentent un problème de santé publique de plus en plus préoccupant tant en Amérique du Nord qu'en Europe. En effet, depuis le début des années 2000, l'émergence successive de clones particuliers se traduit par l'augmentation de la fréquence et de la sévérité des infections. La prévention ainsi que le diagnostic rapide des infections à *C. difficile* (ICD) semblent être des mesures clés pour le contrôle de ces infections.

Le pouvoir pathogène de *C. difficile* repose avant tout sur la production des toxines A et B ; cependant, la première étape de la pathogénèse est la colonisation du tractus digestif, dont l'adhésion aux cellules intestinales qui met en jeu différentes protéines de surface. De nombreuses études ont porté ces dernières années sur l'identification des facteurs de colonisation et leur rôle, dans le but d'élucider les mécanismes de l'interaction hôte-*C. difficile*. Ainsi, plusieurs protéines de la surface bactérienne telles que les protéines flagellaires (FliC et FliD), des adhésines (Fbp86, Cwp66 et HMW-SLP) et des protéases (Cwp84 et Cwp13) ont été caractérisées. Néanmoins, malgré son importance médicale, le mécanisme des infections à *C difficile* n'est pas encore totalement élucidé.

Nous présenterons dans la première partie de la thèse des données bibliographiques concernant les infections à *C. difficile* et leur pathogénèse, ainsi qu'une revue des facteurs de virulence et de leur régulation par les facteurs environnementaux. En effet, la compréhension du rôle de ces facteurs de colonisation pourrait aboutir à leur exploitation en tant que cibles vaccinales pour la prévention des infections à *C. difficile*. Parmi ces facteurs de colonisation, la protéase Cwp84 fait l'objet de nombreux travaux au laboratoire depuis plusieurs années.

Mes travaux de thèse ont porté dans un premier temps sur cette cystéine protéase, qui représente une cible vaccinale d'intérêt, afin de poursuivre sa caractérisation. Cette protéase est impliquée dans la maturation des protéines de la couche S, et pourrait également participer au clivage et/ou à la dégradation de certaines protéines de la matrice extracellulaire. Nous avons ainsi étudié le processus de maturation de la protéase et sa localisation sous différentes formes au sein de la bactérie, afin de mieux comprendre son rôle dans l'étape de colonisation de l'hôte par *C. difficile*.

Nous avons également débuté une étude sur la modulation de l'expression de certains facteurs de colonisation par les facteurs environnementaux. En effet, dans tous les processus physiopathologiques les bactéries sont soumises à des modifications des conditions environnementales, parfois rapides et délétères, et doivent donc s'adapter en mettant en jeu différents mécanismes adaptatifs. Ainsi, pendant le processus de colonisation de l'hôte, *C. difficile* va être confronté à différents types de stress : diminution de la disponibilité des nutriments, modification du pH tout au long du tractus intestinal, forte osmolarité, entre autres. La deuxième partie de ma thèse est donc consacrée à l'étude de l'influence de la modification des conditions environnementales sur l'expression des protéines de surface de la bactérie, et plus particulièrement sur les facteurs de colonisation.

Ces travaux contribuent à améliorer nos connaissances globales sur *Clostridium difficile* ainsi que sur le mécanisme du processus de colonisation au cours de l'infection.

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Infections à *Clostridium difficile*

Clostridium difficile est un bacille à Gram positif entéropathogène, anaérobie strict et sporulé. Il a été découvert en 1935 par Hall et O'Toole dans l'intestin de nouveau-nés âgés de 2 à 10 jours, et a été appelé « *Bacillus difficilis* » en raison de la difficulté à être isolé (122).

Aucun rôle pathogène ne lui fut attribué jusqu'en 1978, année durant laquelle plusieurs équipes américaines démontrèrent simultanément qu'il était la cause des colites pseudomembraneuses (CPM), une pathologie sévère survenant principalement à la suite d'une antibiothérapie (22, 179).

Actuellement, *C. difficile* est considéré comme un problème de santé publique majeur se traduisant par des répercussions économiques importantes dans le monde.

1.1. Signes cliniques

Les infections à *C. difficile* (ICD) peuvent causer une gamme étendue de symptômes recouvrant différents stades de gravité, allant du portage asymptomatique à une diarrhée simple sans colite, et à une colite pseudomembraneuse fulminante (248).

1.1.1. Diarrhées simples

Dans les formes simples, la diarrhée est modérée et les signes généraux sont souvent absents. L'examen endoscopique révèle une muqueuse normale ou érosive. Dans près de 25% des cas, l'arrêt de l'antibiotique en cause entraîne une amélioration clinique en l'espace de 2 à 3 jours. Les diarrhées simples sont le plus souvent rencontrées chez l'enfant en bas âge et chez l'adulte sans comorbidité associée, tandis que les patients âgés présentent davantage de cas sévères (14).

1.1.2. Colite pseudomembraneuse et complications

Les signes cliniques de CPM sont plus sévères. Celle-ci débute par une diarrhée liquide abondante, souvent accompagnée de fièvre (75%) et de douleurs abdominales (70%).

L'examen endoscopique révèle au niveau de la muqueuse des lésions aphtoïdes jaunâtres caractéristiques (pseudo-membranes) éparses ou confluentes selon le stade de la maladie. Les complications les plus redoutées de la CPM, parfois fatales, sont la perforation colique et le mégacôlon toxique qui sont des urgences chirurgicales (14).

1.1.3. Signes biologiques et/ou cliniques de gravité

Certains facteurs cliniques sont prédictifs des formes graves d'infection à *C. difficile* : une altération de l'état général associée à une déshydratation grave, des douleurs abdominales à type de crampes, de la fièvre, une perte de poids et une hypotension sont fréquemment observées dans les formes graves. Certains signes biologiques sont également évocateurs des formes graves : un syndrome inflammatoire important se traduisant par une élévation de la protéine C réactive et une hyperleucocytose, une créatininémie supérieure à 200 µmol/L sans insuffisance rénale connue, une hypoalbuminémie, voire une thrombocytose. Une hyperleucocytose supérieure à 50 000 leucocytes/mm^3 est associée à une mortalité plus élevée (5, 24, 230).

1.2. Rechutes et réinfections

Les rechutes sont la principale problématique associée aux infections liées à *C. difficile*. Les rechutes diarrhéiques sont fréquentes et concernent environ 15 à 35% des patients dans les deux mois qui suivent un épisode initial. Ces épisodes répétés peuvent avoir lieu sur plusieurs mois ou années (248). Un patient qui présente une première rechute a davantage de risque de faire des rechutes ultérieures multiples. Le plus grande nombre de rechutes rapporté chez un même patient correspond à 26 épisodes diarrhéiques (21). La physiopathologie de ces rechutes peut être expliquée par la persistance endogène de la souche initiale sous forme sporulée (récidive), malgré un traitement efficace, ou la réinfection par l'acquisition d'une nouvelle souche d'origine exogène, acquise le plus souvent au cours d'une hospitalisation (15).

1.3. Épidémiologie

1.3.1. Données générales

C. difficile est responsable de 15 à 25% des diarrhées associées à la prise d'antibiotiques, et de plus de 95% des cas de CPM (65). En France, les infections à *C. difficile* ont été classées en tête des infections nosocomiales déclarées en 2006 (299). En effet, *C. difficile* est l'infection digestive la plus répandue dans les hôpitaux et les établissements de soins de longue durée, et peut être à l'origine d'une augmentation de la durée d'hospitalisation de 7 jours (211).

Les ICD diagnostiquées à l'hôpital sont acquises lors de l'hospitalisation dans plus de 70% de cas (14, 65). L'incidence des ICD en milieu hospitalier est très variable en fonction des études et des pays, mais globalement, depuis les années 2000, le nombre de cas d'infections à *C. difficile* a considérablement augmenté en Amérique du Nord puis en Europe. En Amérique du Nord, l'incidence des ICD en milieu hospitalier, toutes souches confondues, a été évaluée à au moins 500 000 cas par an aux Etats-Unis et à 4,6 cas pour 10 000 admissions au Canada (120, 228, 264). En Europe, une étude récente a estimé leur incidence à 4,1 cas pour 10 000 patients-jour (26).

Il est important de noter que si la bactérie est principalement présente dans le secteur hospitalier, l'émergence d'infections communautaires liées à *C. difficile* a été décrite, mais leurs caractéristiques sont moins bien connues. Aux Etats-Unis, leur prévalence à été estimée à 20% des cas d'ICD, taux similaire à celui trouvé au Canada et en Europe (12, 162, 174, 178) ; en France, leur incidence a été estimée à 2 700 cas pour 100 000 antibiothérapies (27, 65). Parmi les ICD communautaires, le pourcentage des infections non associées à une prise récente d'antibiotique est élevé, de l'ordre de 40 à 60% (174). Dans une étude menée au Royaume-Uni, parmi 833 patients présentant une ICD (sans hospitalisation au cours de l'année précédant l'étude), seuls 34% (284) des patients avec ICD avaient été traités avec des antibiotiques dans les 90 jours précédant l'étude (81).

1.3.2. Modification récente de l'épidémiologie

À la suite de l'émergence de souches particulières au début des années 2000, se propageant sur un mode épidémique, l'épidémiologie des infections liées à *C. difficile* s'est modifiée.

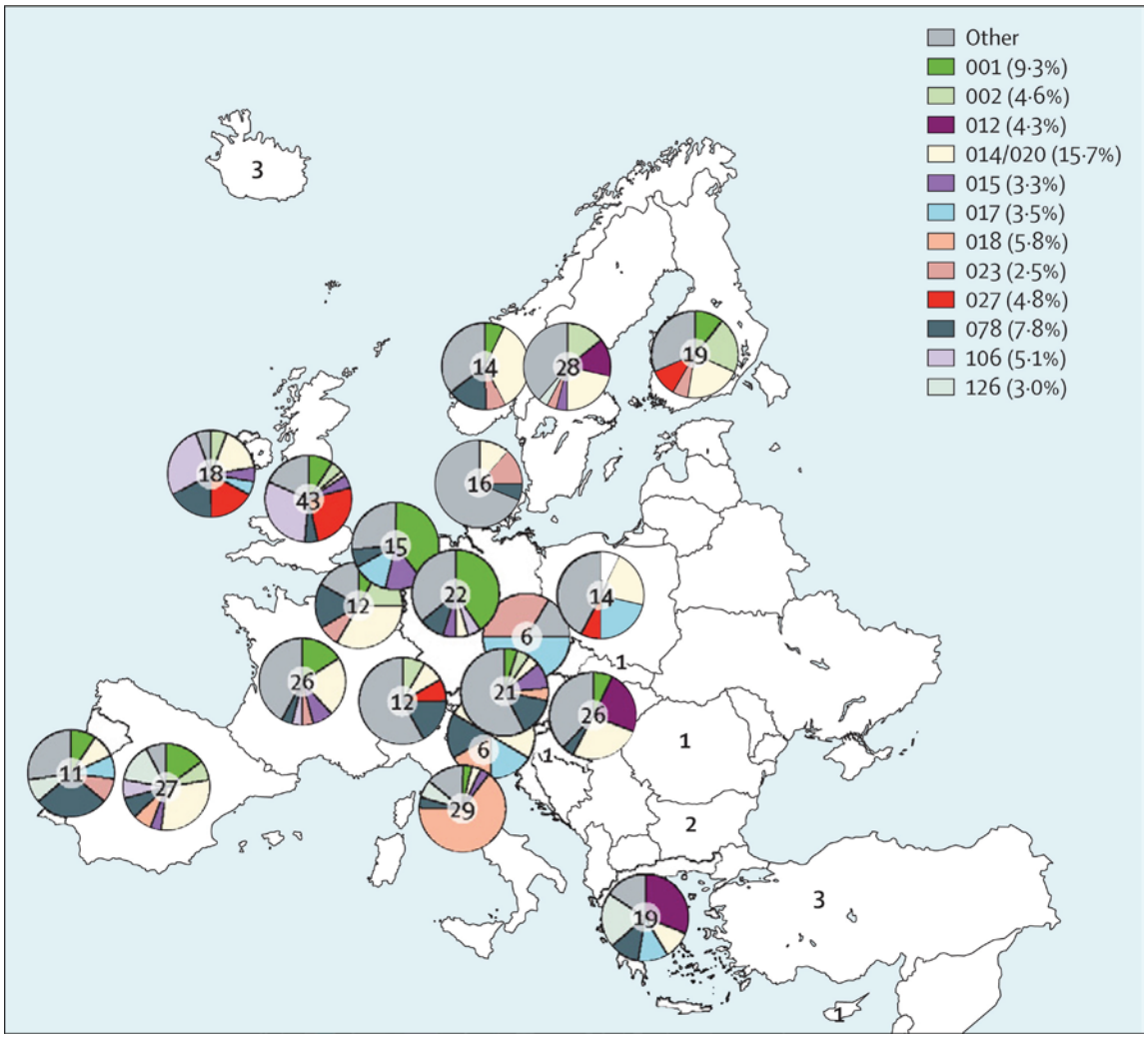


Figure 1. Distribution géographique des différents PCR ribotypes des souches de *C. difficile* en Europe. Les graphiques montrent la proportion des ribotypes des souches isolées dans chaque pays, le chiffre central représentant le nombre de souches typées dans chaque pays. D'après Bauer (26).

1.3.2.1. Souches de PCR ribotype 027

Depuis le début des années 2000, en Amérique du Nord puis en Europe, l'augmentation des cas d'ICD associées à un fort taux de morbidité et de mortalité a été attribuée à une souche particulière, épidémique et annoncée hypervirulente [PCR ribotype 027, PFGE type NAP1 (North American pulsed fiel gel electrophoresis type 1), toxinotype III], appelée *C. difficile* 027 (205, 239).

Au Canada, cette souche a été impliquée dans l'augmentation de l'incidence des infections liées à *C. difficile* entre 1991 et 2003, avec 35,6 cas pour 100 000 personnes en 1991 *versus* 156,3 cas pour 100 000 personnes en 2003 (239). En 2005, cette souche était isolée dans respectivement 82,2 % et 51 % des cas d'ICD au Québec (188) et aux Etats-Unis (205). Aux Etats Unis, cette souche a été impliquée dans des épidémies dès 1999 (217). Depuis 2006, la prévalence de cette souche hypervirulente 027 a diminué. Dans une récente enquête paneuropéenne menée dans 34 pays, il a été montré que cette souche ne représentait plus que 5% des souches isolées chez des patients atteints d'ICD (Figure 1), mais les résultats varient selon les pays (26).

Le taux de mortalité a été multiplié par un facteur 2,7 entre 1999 et 2002 aux Etats-Unis (326). Au Québec, dans une étude réalisée au cours de la période 2003-2004, une forte mortalité a été retrouvée (13 à 16,7%), principalement chez des patients de plus de 65 ans (240).

En France, une souche 027 a été isolée pour la première fois en 1988 sans toutefois être impliquée dans une épidémie. Une épidémie d'ICD à été signalée de 2006 à 2007 dans le Nord-Pas de Calais, l'infection étant en majorité (65%) due à cette souche particulière. Depuis, un réseau de vigilance est maintenu et d'autres régions françaises ont présenté des épidémies liées à cette souche, principalement dans le Nord de la France. Les résultats de l'étude RAISIN (Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales) 2009, portant sur l'incidence et la caractérisation des souches responsables des ICD, ont montré que parmi 314 souches typées par le Centre National de référence (CNR), le clone épidémique 027 était impliqué dans 22,6% de cas (133). Ces résultats sont similaires à ceux de l'étude RAISIN 2010, où le clone 027 a été identifié dans 21,5% des cas signalés (Figure 2) (134).

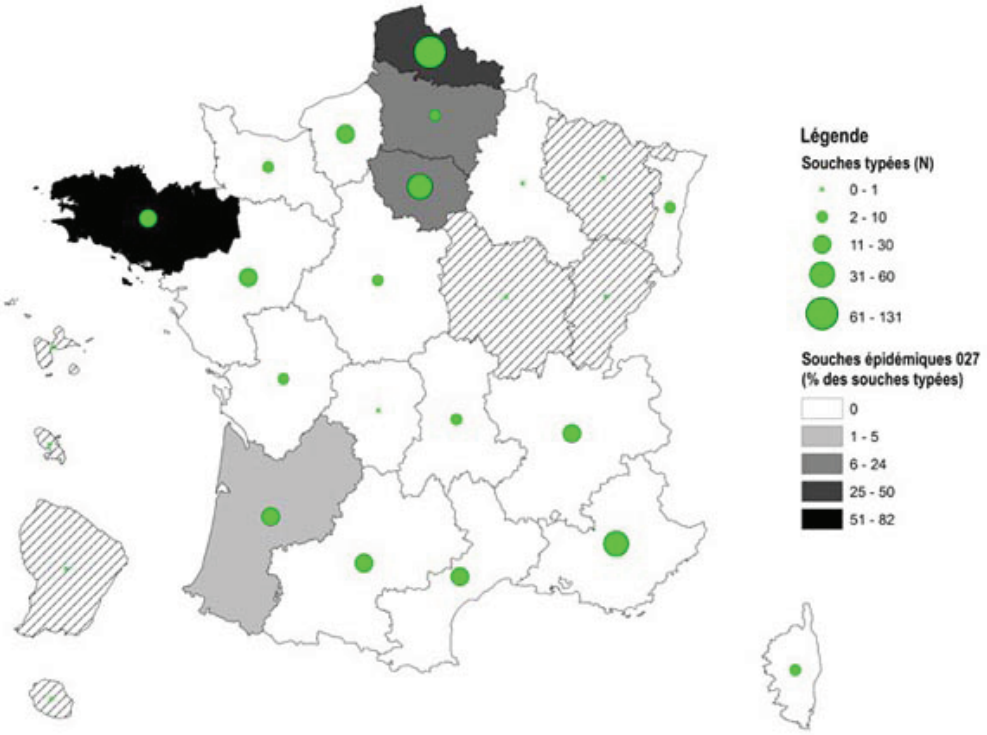


Figure 2. Souches de *C. difficile* caractérisées par le Centre National de Référence et proportion de souches 027 en France. Des souches appartenant au clone 027 ont été identifiées dans cinq régions de France métropolitaine (Nord-Pas-de-Calais, Bretagne, Ile-de-France, Picardie et Aquitaine) : globalement 21,5 % de souches typées appartiennent à ce clone. D'après InVS 2010 (134).

1.3.2.2. PCR ribotype 078/126

Plus récemment, un nouveau clone a été détecté, il s'agit de souches de toxinotype V, appartenant au PCR ribotype 078/126. Elles sont associées à un taux de morbidité et de mortalité comparable à celui des souches 027. Ce clone 078/126 est le plus souvent associé à des formes communautaires (17,5% *vs*. 6,7% pour le clone 027) et il est responsable de formes sévères dans une population en moyenne plus jeune (67,4 ans *vs*. 73,5 ans dans la population affectée par le clone 027) (53, 116). Cependant, la souche 078/126 semble être responsable de diarrhées moins sévères que la souche 027 (116).

Par ailleurs, les souches 078/126 sont les souches prédominantes chez les porcs et les veaux, les souches pathogènes pour le porc étant génétiquement proches des souches isolées chez les patients atteints d'ICD (116).

Le clone 078/126 a été signalé dans plusieurs pays d'Europe et se place désormais à la troisième place des souches isolées dans les hôpitaux (Figure 1) (26). Actuellement, *C. difficile* 078/126 est le deuxième clone le plus fréquemment isolé aux Pays-Bas (13%) (116). En France, il représentait 15,1% des souches toxinogènes reçues entre juillet 2009 et juin 2010 (134), en légère augmentation par rapport au premier trimestre 2009 (11,2% de cas signalés) (133). Aux Etats Unis, les souches 078/126 forment le troisième clone le plus fréquemment isolé dans les cas communautaires (184).

1.4. Le coût des ICD

Le surcoût financier lié aux ICD est important pour les établissements de santé. En effet, une épidémie à *C. difficile* peut entraîner la fermeture temporaire des services impliqués, la mise en place de mesures spécifiques d'hygiène et/ou d'isolement, ainsi qu'une augmentation de la durée d'hospitalisation (285).

Selon les estimations, le coût des traitements associés aux ICD en Amérique du Nord s'élèverait à 3,2 milliards de dollars pour les systèmes de santé (225). En Europe, le coût de la prise en charge de ces infections est estimé par le « European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) » à près de 4,4 milliard de dollars (près de 3 milliards d'euros) par an (173).

Etant donné que les ICD surviennent essentiellement chez les personnes âgées, le coût pourrait augmenter sur les prochaines décennies parallèlement à l'augmentation de la proportion des personnes âgées dans la population.

1.5. Portage et mode de transmission

Le portage par les patients atteints d'ICD constitue l'essentiel du réservoir de *C. difficile*. Les porteurs asymptomatiques ainsi que l'environnement, où la bactérie sous forme sporulée peut persister plusieurs semaines, représentent également une source de contamination pour les ICD (14, 216).

Dans la population adulte, le portage asymptomatique est considéré inférieur à 3%, mais il peut atteindre 10 à 25% après un traitement antibiotique ou lors d'une hospitalisation. Le portage asymptomatique est observé chez 5 à 70% des nourrissons : il diminue rapidement au cours de la première année de vie pour se stabiliser, vers l'âge de 2 à 3 ans, à un taux comparable à celui de l'adulte (14, 137, 262).

La contamination par *C. difficile* a lieu par voie oro-fécale, les formes contaminantes étant vraisemblablement dans la majorité des cas les spores résistantes de la bactérie. Sa transmission de personne à personne s'effectue par manuportage, avec des individus malades, avec des porteurs asymptomatiques (216, 259) ou à partir d'un environnement contaminé (65). Certaines études ont décrit la présence de *C. difficile* chez des animaux domestiques comme les chats (194), ainsi que dans des viandes (260, 316). Dans une étude française récente, la présence de *C. difficile* a été mise en évidence dans 1,9 % des viandes analysées (39). Cependant, le lien entre la présence de *C. difficile* chez les animaux et/ou dans l'alimentation et l'infection chez l'homme n'a pas encore été établi.

1.6. Facteurs de risque

1.6.1. Antibiothérapie

Le risque majeur de survenue d'une ICD est corrélé à la prise d'antibiotiques. La perturbation du microbiote intestinal semble constituer un pré-requis à l'installation de *C. difficile*, et est,

dans la plupart des cas (98%), liée à l'administration d'antibiotiques. La présence dans le génome de *C. difficile* d'éléments mobiles portant des gènes de résistance aux antibiotiques (41, 273), pourrait expliquer la résistance de cette bactérie à un grand nombre d'antibiotiques.

Presque tous les antibiotiques ont été impliqués, en particulier les molécules présentant une bonne activité sur les bactéries anaérobies, à l'origine d'une altération importante du microbiote digestif dominant. Dans les années 1970, la clindamycine a été le premier antibiotique impliqué dans la survenue des ICD, son utilisation massive ayant entrainé une augmentation des cas de colites pseudomembraneuses (23, 34). D'autres antibiotiques à large spectre tels que certaines β-lactamines (amoxicilline associée à l'acide clavulanique et certaines céphalosporines de troisième génération) sont également considérés comme des molécules à haut risque. Ces molécules sont très souvent en cause, ce qui est expliqué en partie par leur usage intensif (189). Différentes études ont montré que la diminution de la prescription des antibiotiques à risque et de la durée des traitements était corrélée de manière significative à une diminution de l'incidence des ICD (163, 323). D'autres antibiotiques, tels le cotrimoxazole, la rifampicine, la tétracycline et les macrolides sont considérés à moindre risque.

Par ailleurs, les nouvelles fluoroquinolones (FQs) (moxifloxacine, gatifloxacine) ont également été mises en cause dans la survenue des ICD liées à la souche épidémique 027 (217, 227, 238), du fait de la résistance de cette souche à ces molécules. La résistance aux FQs est liée à une modification de la gyrase, soit au niveau de la sous-unité GyrA (Thr82Ile étant la substitution la plus fréquente), soit au niveau de la sous-unité GyrB (Asp426Asn, Ser416Ala, Arg447Lys) (286). Cependant, une étude récente suggère que l'administration de FQs ne serait pas associée à une incidence plus élevée des ICD (223), mais les méthodes statistiques utilisées dans cette étude ont depuis été remises en question (289).

1.6.2. Âge

L'âge est un facteur primordial. Les personnes de plus de 65 ans, notamment les personnes présentant des comorbidités associées et qui sont hospitalisées, présentent un risque particulièrement important d'être infectées par *C. difficile* (189).

1.6.3. Facteurs génétiques

L'équipe de Jiang a démontré que la présence d'un polymorphisme dans la région du promoteur de l'interleukine (IL)-8 était associée à une plus grande susceptibilité aux *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC), responsables de la diarrhée du voyageur (142). Cette même équipe a également mis en évidence l'implication du polymorphisme d'un nucléotide de la région -251 du promoteur de l'IL-8 comme facteur de risque dans les infections primaires et les rechutes liées à *C. difficile* (141). La contribution de ce facteur génétique dans la survenue des rechutes a été confirmée par une étude récente, montrant que l'incidence des rechutes est supérieure chez les patients présentant ce polymorphisme, qui produisent des taux d'IL-8 plus importants que les autres patients (39% de rechutes *vs* 19%) (107). Une production accrue d'IL-8 pourrait conduire à une inflammation plus importante des cellules épithéliales du côlon, entrainant ainsi une augmentation du risque de rechute liée à *C. difficile* (107).

1.6.4. Autres facteurs

Actuellement, le taux d'ICD dans des populations précédemment considérées à faible risque est en augmentation. Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) sont désormais considérées comme un facteur de risque important à la fois chez les adultes et les enfants (228).

Certaines chimiothérapies anticancéreuses ont aussi été impliquées (35), ainsi que tous les facteurs entraînant des modifications de l'écosystème digestif ou de la motilité intestinale (laxatifs, lavements barytés, anti-acides, ralentisseurs du transit, chirurgie gastro-intestinale) (63). Le risque de rechute d'une ICD chez un adulte traité par des inhibiteurs de la pompe à protons (IPP) est augmenté de 42%, et ce risque est encore plus élevé chez les personnes âgées de plus de 80 ans (186). Les IPP sont mis en avant du fait de leur mauvaise utilisation et particulièrement de leur prescription excessive (102).

Dans une étude rétrospective réalisée par Sanchez el *al*. chez des patients VIH-positifs, *C. difficile* a été la bactérie la plus fréquemment isolée dans les cas de diarrhées bactériennes entre 1992 et 2002, avec 4,1 cas pour 1000 personnes par an (265). Néanmoins, dans une

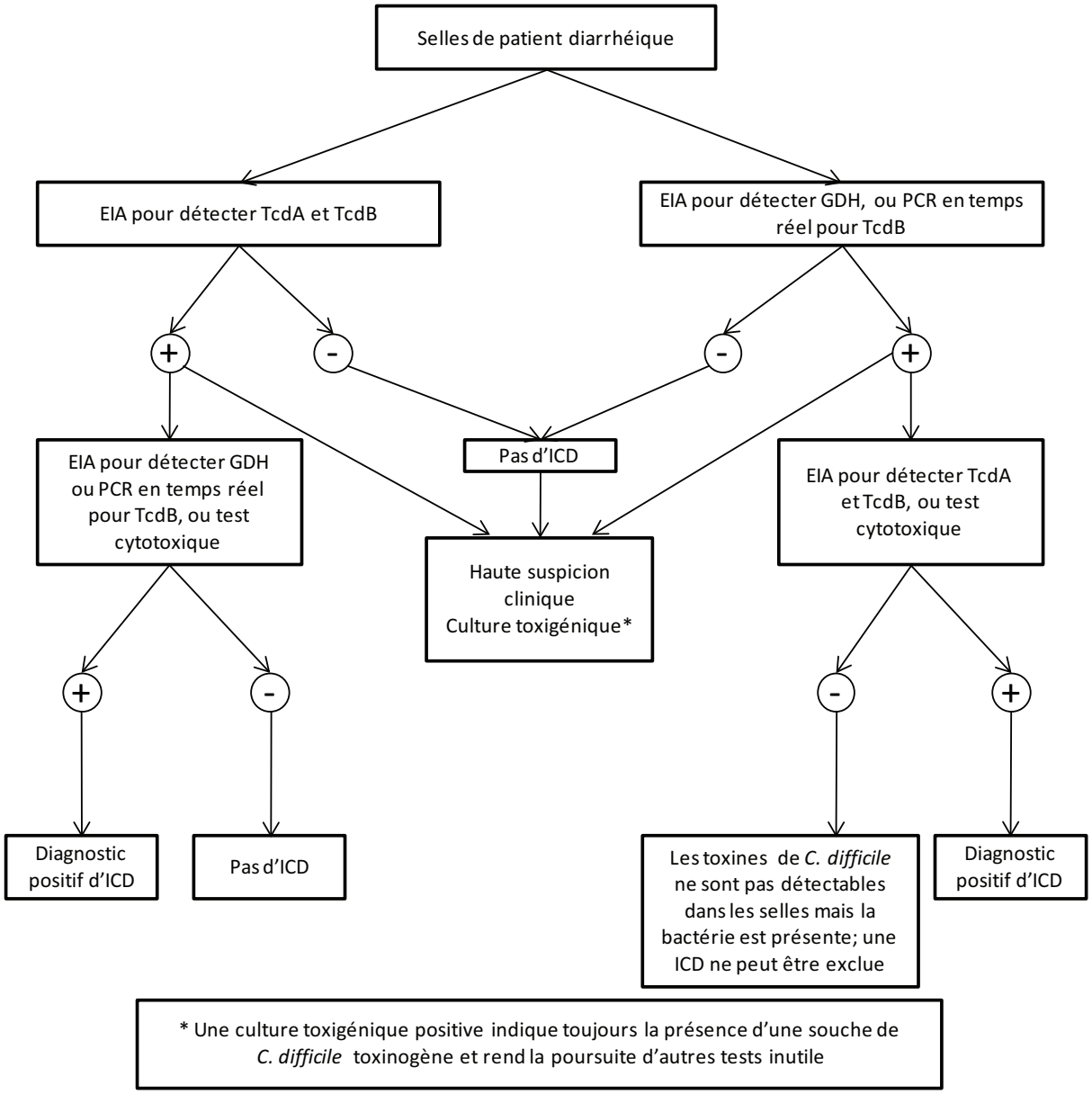


Figure 3. Schéma du diagnostic des infections à *C. difficile*, selon les recommandations de la société européenne de microbiologie clinique et des maladies infectieuses (ESCMID). D'après Crobach (68).

EIA : techniques immuno-enzymatiques ; GDH : glutamate déshydrogénase.

étude plus ancienne (37), le SIDA n'avait pas été identifié comme étant un facteur de risque supplémentaire de diarrhée à *C. difficile*.

Une immunodépression, le nombre d'antibiotiques utilisés et une hospitalisation antérieure ou prolongée sont aussi considérés comme facteurs de risque susceptibles de favoriser le développement d'une infection liée à *C. difficile*. Lorsqu'un patient atteint d'ICD présente plusieurs facteurs de risque, le risque de mortalité peut augmenter à plus de 30%.

1.7. Diagnostic

La recherche d'une infection à *C. difficile* est recommandée chez tout patient qui présente une diarrhée aiguë à la suite d'une antibiothérapie, notamment si le sujet est âgé ou hospitalisé (176). Les tests diagnostiques reposent soit sur la détection des toxines dans les selles, soit sur la mise en évidence d'une souche de *C. difficile* dans les selles. La société européenne de microbiologie clinique et des maladies infectieuses (ESCMID) propose un schéma de diagnostic, résumé sur la figure 3.

1.7.1. Mise en évidence des toxines dans les selles

La méthode de référence pour la mise en évidence des toxines dans les selles est le test de cytotoxicité, qui consiste à mettre en évidence l'effet cytopathique d'un filtrat de selles sur une culture cellulaire (176).

Ces dernières années, des techniques immuno-enzymatiques (EIA) ont été développées afin de permettre un diagnostic rapide dans tous les laboratoires. Une étude réalisée entre 2004 et 2008 par le « College of American Pathology » a montré que les techniques immuno-enzymatiques sont les plus utilisées pour le diagnostic des ICD aux Etats Unis (20). Ces techniques présentent une très bonne spécificité (de 97 à 98%) mais une sensibilité moyenne, de 75 à 80%, avec des faux négatifs (68).

Plus récemment, la PCR en temps réel a été développée pour détecter le gène *tcdB*, codant la toxine B (29, 288). De nouvelles PCR en temps réel, multiplex, capables de détecter les gènes codant les deux toxines A et B, la toxine binaire et même les délétions au niveau du gène *tcdC*

(retrouvées, entre autres, chez les souches épidémiques 027) ont été également développées (115) et commercialisées par Cepheid. Cette méthode est très sensible et rapide, mais elle reste limitée à cause de son prix élevé.

1.7.2. Diagnostic bactériologique

La culture de selles est recommandée. *C. difficile* peut être isolé sur un milieu sélectif contenant de la cyclosérine et de la céfoxitine, enrichi au sang ou à l'œuf et additionné de cystéine. Après 48 heures d'incubation en anaérobiose à 37°C, les colonies sont facilement identifiables : de l'ordre de 5 mm de diamètre, elles sont mates, blanches à grises, elles ont des contours irréguliers et sont non hémolytiques sur gélose au sang. Leur odeur de crottin de cheval est caractéristique. Les colonies présentent parfois une fluorescence vert-jaune sous lumière UV (254 nm). Cependant, cette méthode reste longue et nécessite de nombreuses manipulations. La culture est utilisée surtout en Europe et rarement aux Etats Unis (20).

C. difficile peut être détecté par la mise en évidence de la glutamate déshydrogénase (GDH), une enzyme métabolique présente chez les souches pathogènes et non pathogènes. Un test immuno-enzymatique existe et montre une bonne sensibilité, mais il se heurte à des réactions croisées avec d'autres espèces de *Clostridium*. Afin d'améliorer la spécificité de cette technique, elle peut être couplée à la recherche des toxines A et/ou B (20, 277).

1.7.3. Autres techniques diagnostiques

Il est connu que les selles des personnes atteintes d'ICD ont une odeur particulière de crottin de cheval. Chris Probert et Norman Ratcliffe ont exploité cette caractéristique afin de développer un appareil qui détecte les infections en analysant l'odeur des selles. Cet appareil nommé OdoReader, analyse le gaz émis par les selles et donne un résultat en une heure, ce qui permettrait de réaliser un diagnostic rapide et peu coûteux. Des essais cliniques sont prévus pour 2012/2013 avant une possible commercialisation d'OdoReader (http://www.bris.ac.uk/news/2010/6824.html).

1.8. Traitement

Le traitement d'une infection à *C. difficile* dépend étroitement de la présentation clinique et du terrain sur lequel elle survient. Le traitement des porteurs sains n'est pas conseillé car il n'est pas efficace pour l'éradication de *C. difficile* du tube digestif (145).

1.8.1. Arrêt de l'antibiotique

En premier lieu le traitement des ICD est fondé sur l'arrêt, lorsque c'est possible, de l'antibiotique responsable (9, 74), associé le plus souvent à un traitement spécifique anti-*C. difficile*. Le simple arrêt du traitement en cause dans une infection à *C. difficile* peut suffire à la guérison dans 25% des formes simples (14). Si un antibiotique doit être maintenu, il est préférable de remplacer l'antibiotique initial par une autre molécule de moindre risque.

1.8.2. Antibiothérapie spécifique

Une antibiothérapie spécifique est le plus souvent utilisée dans les cas d'ICD. Deux antibiotiques sont classiquement utilisés, le métronidazole ou la vancomycine *per* os en deuxième intention (9, 318). Une étude récente comparant l'efficacité de la vancomycine et du métronidazole a mis en évidence une efficacité comparable de 90% de la vancomycine et du métronidazole dans les formes modérées, tandis qu'une efficacité supérieure de la vancomycine par rapport au métronidazole a été retrouvée dans les formes sévères (97 % *vs*. 76 %) (328).

De nouvelles molécules expérimentales telles la rifaximine (146), la nitazoxanide (215), et la fidaxomicine ou OPT-80 (210) ont montré une réelle efficacité dans le traitement ou dans la diminution de l'incidence des récurrences d'ICD. Parmi ces antibiotiques, la fidaxomicine, capable d'agir contre *C. difficile* en épargnant le microbiote intestinal, semble la molécule la plus prometteuse. Récemment un essai clinique de phase III comparant l'administration de fidaxomicine ou de vancomycine chez 548 patients avec une ICD confirmée, a montré un taux de guérison comparable pour les deux antibiotiques (88,2 % pour la fidaxomicine *vs*. 85,8 % pour la vancomycine). Toutefois le taux de rechute chez les patients traités avec la

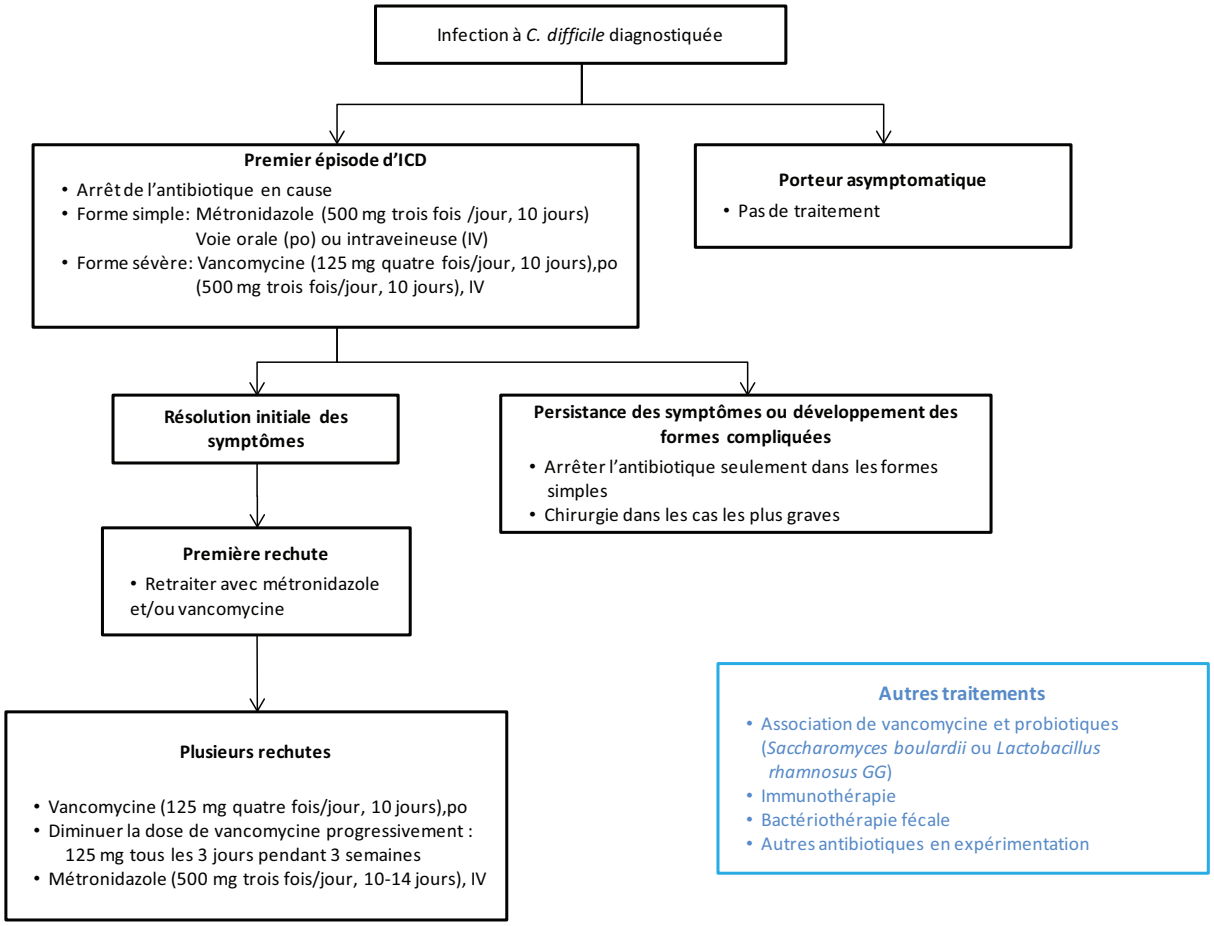


Figure 4. Schéma recommandé pour le traitement des infections à *C. difficile*, selon les recommandations de la société européenne de microbiologie clinique et des maladies infectieuses (ESCMID). D'après Bauer (25).

Dans le cadre bleu, sont résumés d'autres traitements expérimentaux qui ont montré un certain succès, mais pour lesquels les données actuelles ne sont pas suffisantes pour être recommandés dans le traitement.

po : *per os* ; IV : intraveineuse.

fidaxomicine était significativement plus faible que chez ceux traités avec la vancomycine (15,4% *vs*. 25,3 %) (190).

De nouvelles molécules pour le traitement des infections liées à *C. difficile*, telles que l'oritavancin, REP3123, et NVB302, sont actuellement en cours d'étude (144).

1.8.3. Traitement des complications

Dans le cas les plus graves, tels la péritonite, la perforation du côlon ou le megacôlon toxique, le recours à la chirurgie est nécessaire (25, 74).

Le traitement classique des ICD est résumé dans la figure 4 (25).

1.8.4. Traitement des rechutes

Des épisodes de rechutes peuvent se produire chez environ 35% de patients avec des antécédents d'ICD. Plus de 90% des premières rechutes peuvent être traitées avec une antibiothérapie spécifique. À l'heure actuelle, le traitement des rechutes est mal établi, bien que plusieurs traitements aient été proposés. Ils consistent généralement en l'administration de traitements plus ou moins associés à des composés non antibiotiques tels que les probiotiques ou les résines échangeuses d'ions.

Les probiotiques sont utilisés afin de restaurer l'équilibre du microbiote intestinal. L'administration de *Saccharomyces boulardii* et de certaines souches de *Lactobacillus* a montré des résultats encourageants (130, 292). D'après une méta-analyse, *Lactobacillus* GG et *S. boulardii* auraient un effet protecteur dans la prévention des récurrences (206). Les probiotiques sont généralement inoffensifs, toutefois des cas de fongémie à *S. boulardii*, le plus souvent chez des sujets immunodéprimés, et des bactériémies à *Lactobacillus rhamnosus* chez des consommateurs de *Lactobacillus* GG ont été documentées (284).

L'utilisation des résines échangeuses d'ions comme la cholestyramine et le colestipol (9) capables de fixer les toxines de *C. difficile* peut être conseillée en thérapie adjuvante ; elles ne

doivent pas se substituer à une antibiothérapie spécifique, en raison d'une faible efficacité par rapport aux traitements antibiotiques.

1.8.5. Traitements expérimentaux en cours

Ces dernières années, différents types de thérapies, parfois assez surprenantes, ont été expérimentées avec un certain succès vis-à-vis des infections liées à *C. difficile*.

1.8.5.1. Immunothérapie

(i) Immunoglobulines intraveineuses :

Les taux sériques d'immunoglobulines M (IgM) et d'immunoglobulines G (IgG) anti-toxine A sont plus élevés chez les patients ne développant pas de rechute (175). L'injection d'IgG a permis certains succès thérapeutiques chez des enfants présentant un taux bas d'IgG anti-toxine A (74). Cependant, dans d'autres études, des immunoglobulines intraveineuses ont été utilisées dans le traitement des ICD récurrentes avec des résultats assez mitigés (2, 147). Ainsi, la technique reste coûteuse et les résultats ne sont pas assez concluants.

(ii) Anticorps monoclonaux :

Un nouveau type de traitement combinant des antibiotiques à des anticorps monoclonaux humains dirigés contre les toxines A et B de *C. difficile* a été expérimenté récemment par une équipe américaine (191). Cette étude a montré un bénéfice net pour les patients en diminuant le taux de récurrence de 72 %. Cependant, une diminution de la sévérité de l'infection, de la durée de la diarrhée ou du séjour hospitalier n'ont pas été constatés.

1.8.5.2. Bactériothérapie fécale

La bactériothérapie fécale a été utilisée par la première fois en 1958 par Eiseman avec 100% de succès, chez des patients où d'autres traitements avaient été infructueux (94). Une étude plus récente a confirmé l'intérêt de la bactériothérapie fécale dans le traitement des ICD, avec une efficacité de 89% chez des patients souffrant d'épisodes récurrents d'ICD (10). Le principe de cette thérapie est de prélever la flore provenant des selles d'un donneur sain

(habituellement un parent ou un ami), pour la transplanter chez la personne malade par sonde nasogastrique, coloscopie ou par lavement (1, 280, 327). La bactériothérapie fécale permettrait la restauration du microbiote chez les patients atteints d'ICD, empêchant la croissance de *C. difficile*. Cette thérapie présente plusieurs avantages : un faible coût, pas d'effet secondaire important, pas de problème d'émergence de résistance et une réelle efficacité. Cependant, elle peut poser des problèmes d'acceptabilité parmi les patients, et le risque potentiel d'introduire un autre pathogène provenant du donneur ne peut pas être totalement exclu.

1.9. Prévention

1.9.1. Mesures générales

La prévention primaire des ICD repose en premier lieu sur une politique raisonnée de la prescription des antibiotiques et le respect strict de règles d'hygiène, en particulier le lavage soigneux des mains dans les services hospitaliers.

1.9.2. Vaccin anti-*C. difficile*

Actuellement, le développement d'un vaccin contre les ICD est fondé sur la production d'anticorps capables de neutraliser les effets des toxines A et B. En 2008, un candidat vaccin d'Acambis contenant les deux toxines (sous forme inactivée) a franchi avec succès les essais cliniques de Phase I, chez 200 sujets chez lesquels une réponse immunitaire contre les deux toxines a été générée (3). En 2010, les essais cliniques de Phase II ont été lancés en Grande-Bretagne chez 600 patients infectés. Ce vaccin, envisagé comme un complément aux mesures de prévention, serait une avancée sur le front de la lutte contre les infections liées à *C. difficile*.

En 2009, l'équipe de Gardiner a développé chez la souris un vaccin à ADN capable d'induire des anticorps neutralisants contre la toxine A et de protéger la souris de la mort après injection de la toxine par voie intra-péritonéale (106). La vaccination par des vaccins à ADN représente un espoir important du fait des avantages qu'elle présente : plus d'efficacité, moins de toxicité

et faible coût. Cependant, la recherche dans ce domaine n'en est qu'à ses débuts et son efficacité chez l'être humain reste à établir.

Par ailleurs, le fait que *C. difficile* s'implante au niveau intestinal ouvre la voie au développement d'un vaccin utilisant d'autres facteurs de virulence, telles des protéines de surface impliquées dans l'étape de colonisation. Dans notre laboratoire, plusieurs protéines de surface de *C. difficile* ont été testées dans différents modèles animaux, afin d'évaluer leur intérêt comme antigènes vaccinaux dans le développement d'un vaccin. Le modèle souris (conventionnelle ou à flore humaine), sensible à la colonisation mais peu sensible à l'infection, permet de suivre le taux d'implantation de *C. difficile* au niveau du tractus digestif. En revanche, les hamsters sont très sensibles à l'infection par *C. difficile* et meurent en 72-96 heures après infection ; ce modèle animal est donc utilisé pour évaluer la protection conférée lors d'essais d'immunisation. Une première étude a permis de montrer que l'immunisation de souris à flore humaine par des protéines du flagelle, par une protéase de surface (Cwp84) ou par des extraits pariétaux, entraîne une diminution du taux de colonisation de *C. difficile* par rapport à un groupe contrôle (236). L'immunisation de hamsters par voie rectale avec la protéase recombinante Cwp84 ralentit la colonisation et augmente la durée de survie des animaux, traduisant ainsi une protection partielle (234). Une tentative d'encapsulation de la protéase recombinante Cwp84 par des billes de pectine, permettant l'immunisation de la souris par la voie intra-gastrique, s'est également traduite par une protection partielle des animaux (266).

Les protéines de la couche S ont aussi fait l'objet d'essais vaccinaux chez l'animal. Dans une première étude, l'immunisation passive avec des anticorps anti-protéines de la couche S a montré un effet protecteur chez le hamster (226). Une autre équipe a réalisé des essais de vaccination chez le hamster et la souris en utilisant différentes voies d'immunisation (voies intra-péritonéale et intranasale), ainsi que différents adjuvants. Chez la souris, la production d'anticorps spécifiques contre les protéines de la couche S est plus importante que chez le hamster. Chez le hamster, la réponse immunitaire était variable et le taux de survie observé variait de 40 à 66% ; néanmoins chez les hamsters survivants, le taux d'anticorps anti-protéines de la couche S était bas, et la corrélation entre l'immunisation et la survie n'a pas pu être établie dans ce modèle animal (221).

2. Pathogénèse

La pathogénèse de l'infection à *C. difficile* va dépendre d'au moins trois éléments : (i) une diminution de la résistance à la colonisation par *C. difficile* induite le plus souvent par l'antibiothérapie, (ii) la présence d'une souche de *C. difficile* d'origine endogène ou exogène, et (iii) la sécrétion des toxines.

Les formes contaminantes majeures de *C. difficile* sont les spores, qui sont capables de germer dans le tube digestif de l'hôte, la germination étant favorisée par l'exposition aux sels biliaires (113). *C. difficile* est capable de persister et de se multiplier lorsque le microbiote intestinal est altéré. En effet, ce microbiote joue un rôle essentiel dans la santé de l'homme, de par son effet barrière sur certains pathogènes digestifs. Tout déséquilibre du microbiote digestif peut ainsi se traduire par une plus grande sensibilité aux infections, en particulier à la suite de l'exposition à des antibiotiques qui perturbent la composition du microbiote. Dans ces conditions, après germination, une souche présente de *C. difficile* va donc être capable de coloniser l'hôte (principalement au niveau colique), et si elle est toxinogène, la production des toxines A et B va se traduire par des signes cliniques (diarrhée, CPM). Plusieurs facteurs tels que la réponse immunitaire de l'hôte vont également déterminer l'issue de l'infection (175).

L'interaction de la bactérie avec l'hôte fait intervenir plusieurs facteurs de virulence, dont certains n'ont été identifiés que récemment. Chez de nombreuses bactéries pathogènes, il a été démontré que l'adhésion est un pré-requis essentiel dans l'interaction de la bactérie avec son hôte et ainsi dans le processus de colonisation. Outre les facteurs d'adhésion, d'autres facteurs sont impliqués dans la colonisation, les plus étudiés étant les enzymes hydrolytiques et la protéase Cwp84 dont nous parlerons dans le chapitre protéases, et qui fait, pour partie, l'objet des travaux de recherche présentés dans cette thèse.

2.1. Facteurs de colonisation

L'adhésion de *C. difficile* à la muqueuse intestinale nécessite la présence de certaines protéines de surface considérées comme des facteurs de virulence accessoires. Lors de la

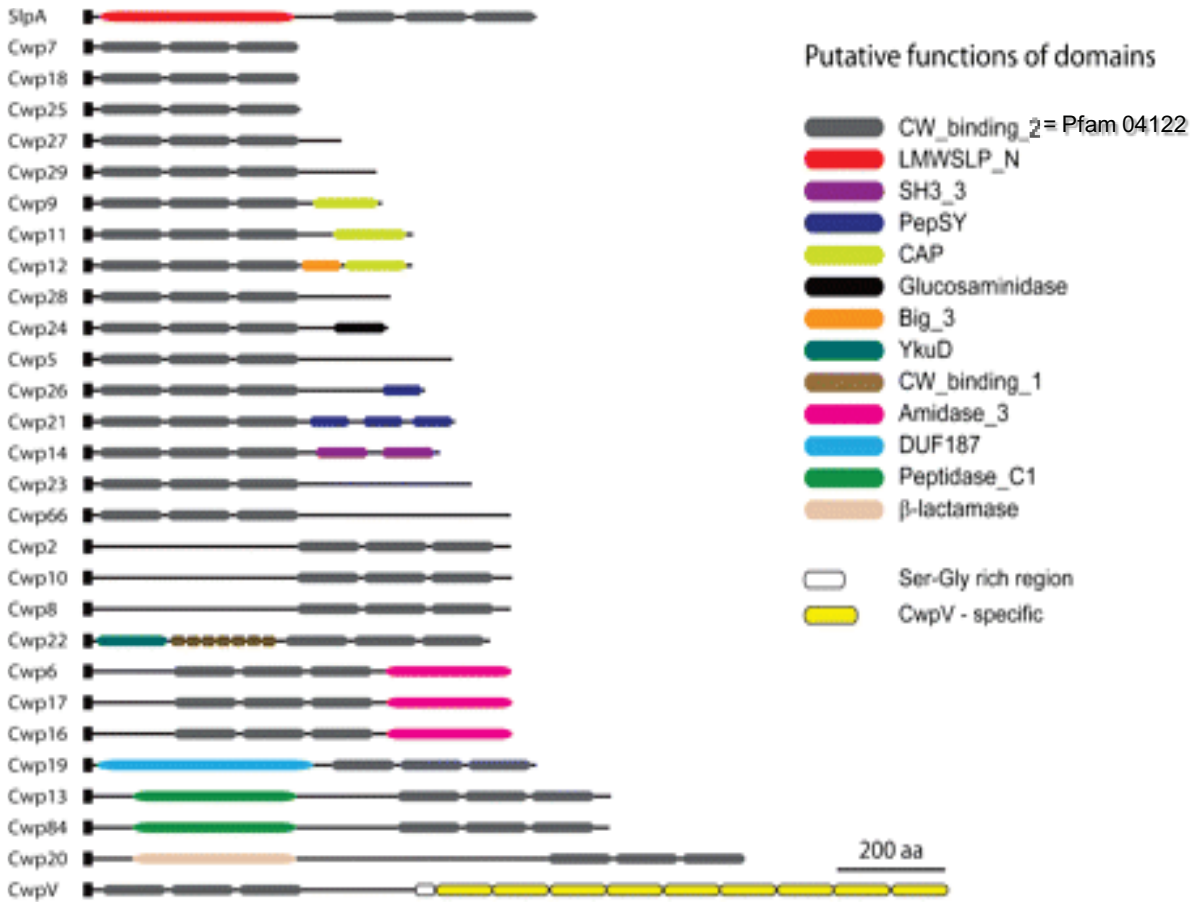


Figure 5. Structure des protéines Cwps. Toutes les protéines Cwps possèdent une structure en trois domaines, avec un peptide signal (■), et deux domaines (N-terminal et C-terminal) possédant soit la fonction biologique soit le domaine d'ancrage avec trois motifs Pfam 04122. Pour les protéines dont la fonction n'est pas connue, le rôle potentiel du domaine fonctionnel a été déterminé en utilisant le site « Pfam » (http://pfam.sanger.ac.uk/). D'après Fagan (99).

colonisation du tube digestif, *C. difficile* pourrait interagir avec différents constituants tels les mucines, les cellules épithéliales intestinales et la matrice extracellulaire.

C. difficile est capable d'adhérer aux cellules épithéliales de l'intestin grêle et du côlon chez l'homme (88), à la muqueuse tout au long du tractus gastro-intestinal chez le hamster (38, 88), ainsi qu'*in vitro* à différentes cellules en culture, comme les lignées humaines Caco-2 (cellules coliques carcinomateuses), HT29-MTX (cellules tumorales coliques sécrétrices de mucus), HeLa (cellules humaines épithéliales utérines) et Vero (cellules épithéliales de rein de singe) (56, 88, 313). Également, une adhésion *ex vivo* sur mucus isolé de souris a été mise en évidence (156). *In vitro*, l'adhésion de *C. difficile* aux cellules Caco-2 comprend deux mécanismes distincts : une liaison directe à un récepteur cellulaire encore inconnu situé à la surface basolatérale des cellules et une interaction spécifique avec certaines protéines de la matrice extracellulaire, telles la fibronectine, le fibrinogène, la vitronectine et les collagènes de type I, III, IV et V (56).

Bien que les mécanismes moléculaires précis de la colonisation restent globalement mal connus, certains facteurs impliqués dans cette étape de la pathogenèse ont été caractérisés.

2.1.1. Les protéines de la paroi « Cwps (Cell Wall Proteins) »

Chez la souche 630 de *C. difficile*, une famille de 29 gènes contenant trois motifs Pfam 04122 a été identifiée. Ce motif, annoté comme un motif potentiel d'ancrage à la paroi bactérienne (« Cell Wall Binding 2 »), est localisé soit sur la partie N-terminale, soit dans la partie C-terminale des protéines correspondantes. En plus de ce domaine commun, les protéines Cwps possèdent un domaine spécifique variable dont la fonction biologique est connue ou supposée (Figure 5) (99, 273), et une séquence de peptide signal traduisant leur translocation au travers de la membrane cytoplasmique.

Parmi ces protéines, 12 Cwps sont codées par des gènes localisés au sein d'un cluster de 37 kb, appelé locus *cwp*, en particulier les gènes codant l'adhésine Cwp66, la protéase Cwp84 et le précurseur SlpA des protéines de la couche S (HMW-SLP et LMW-SLP). Ce locus porte 17 cadres ouverts de lecture (ORF) orientés dans le même sens (Figure 6) (45, 78, 157). Des études protéomiques et transcriptomiques ont mis en évidence l'expression de plusieurs de ces protéines Cwps dans des conditions de laboratoire (96, 325). En outre, la production

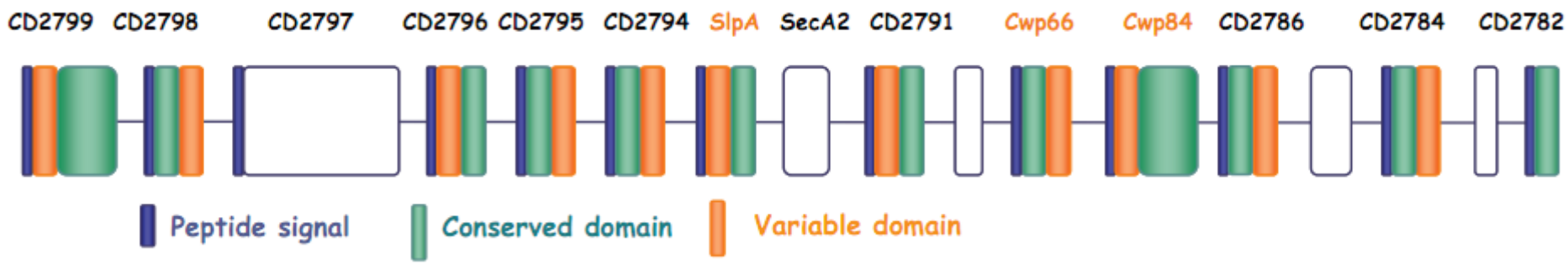


Figure 6. Locus *cwp* de *C. difficile* (souche 630). Organisation du fragment chromosomique de 37 kb portant 12 gènes codant des protéines Cwps. Les différents gènes sont représentés avec la structure des protéines codées. Les protéines Cwps possèdent une structure en trois domaines : le peptide signal (en bleu), le domaine d'ancrage potentiel contenant les domaines Pfam 04122 (en vert) présent en N-ter ou C-ter, et le domaine variable fonctionnel (en orange). D'après Deneve (78).

CD2799 : Cwp8 ; CD2798 : Cwp9 ; CD2796 : Cwp10 ; CD2795 : Cwp11 ; CD2794 : Cwp12 ; CD2791 : Cwp2 ; CD2786 : Cwp5 ; CD2784 : Cwp6 ; CD2782 : Cwp7.

d'anticorps contre certaines des protéines Cwps (protéines de la couche S, Cwp2, Cwp5, Cwp18, Cwp19, Cwp66 et Cwp84) au cours de l'infection à *C. difficile* confirme l'expression de ces protéines *in vivo* (235, 237, 324).

Un chapitre entier sera consacré plus loin à la protéase Cwp84.

2.1.1.1. Les protéines de la couche S

De nombreuses bactéries à Gram positif et à Gram négatif possèdent à leur surface une couche cristalline en deux dimensions appelée couche S, composée de protéines ou de glycoprotéines, et recouvrant entièrement la cellule. Les couches S sont importantes pour de nombreuses fonctions biologiques en particulier, l'adhésion cellulaire, la protection contre la phagocytose, l'exclusion de substances nocives, et possèdent des propriétés antigéniques. Elles jouent également un rôle dans l'échappement au système immunitaire par la destruction du complément (32, 267, 282).

La couche S est retrouvée à la surface de toutes les souches de *C. difficile*, toxinogènes ou non (45). Elle est composée de deux couches protéiques superposées, chacune étant constituée d'une protéine. La couche la plus externe, fine, est constituée par la protéine de bas poids moléculaire LMW-SLP (Low Molecular Weight-S layer protein), précédemment nommée P36 du fait de son poids moléculaire moyen de 36 kDa ; et la couche interne, épaisse, est constituée par la protéine de haut poids moléculaire HMW (High Molecular Weight), précédemment appelée P47 (55). Ces deux protéines, majoritaires à la surface de *C. difficile*, sont issues du clivage d'un précurseur commun codé par le gène *slpA*, après clivage post-traductionnel en deux sites : le premier clivage en N-terminal pour libérer le peptide signal, et le deuxième clivage à l'intérieur du précurseur pour libérer les deux protéines matures (46, 98). La protéase responsable du clivage du précurseur SlpA est la cystéine protéase Cwp84 (70, 165). Après clivage, les protéines HMW-SLP et LMW-SLP vont se réassocier par des interactions non-covalentes impliquant des domaines hautement conservés, présents sur la partie C-terminale de LMW-SLP (acides aminés 260 à 321) et sur la partie N-terminale de HMW-SLP (acides aminés 1 à 40) (Figure 7) (98).

La protéine HMW-SLP correspond à la partie C-terminal du précurseur (157), elle contient trois motifs Pfam 04122 et est relativement conservée entre les différentes souches de

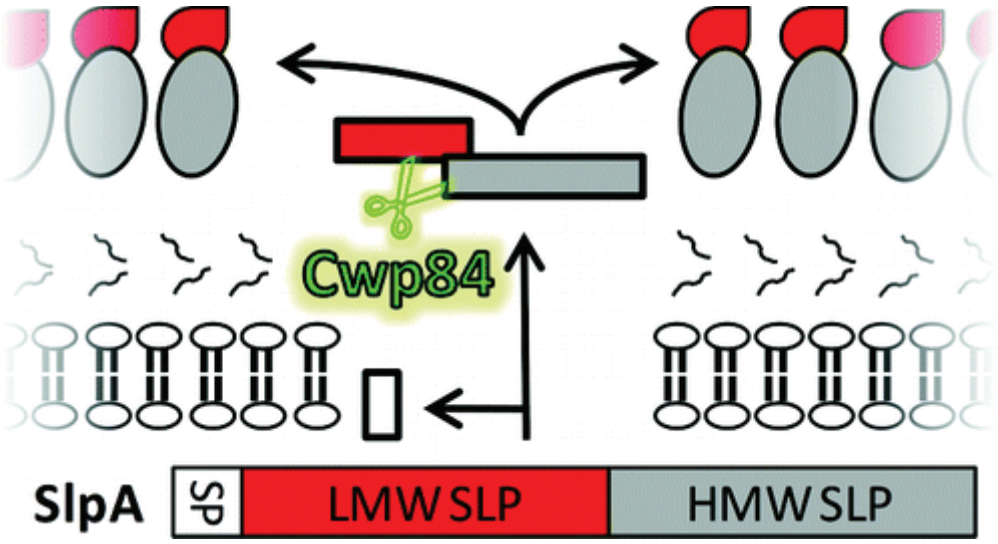


Figure 7. Schéma de la maturation des protéines de la couche S. La couche S résulte d'un processus en trois étapes : dans la première étape le peptide signal du précurseur SlpA est clivé, puis la protéase Cwp84 coupe à l'intérieur du précurseur pour générer les protéines de bas (LMW-SLP) et haut poids moléculaire (HMW-SLP), finalement les protéines se réassocient afin de former la couche S. D'après Dang *et al.* (70).

LMW-SLP: Low Molecular Weight, S-layer protein ; HMW-SLP: High Molecular Weight, S-layer protein.

C. difficile (157). Un rôle de la protéine HMW-SLP (native et recombinante) a été mis en évidence dans l'adhérence aux cellules Hep-2 (cellules tumorales de carcinome laryngé humain) en culture, à l'épithélium de la muqueuse intestinale humaine et murine, et à certaines molécules de la matrice extracellulaire comme le collagène I, la thrombospondine et la vitronectine (44).

La protéine LMW-SLP correspond à la partie N-terminale du précurseur (157). Cette protéine est peu conservée et immunodominante, ce qui pourrait favoriser un mécanisme d'échappement au système de défense de l'hôte (46). Des anticorps dirigés contre cette protéine sont retrouvés dans le sérum des patients atteints d'une infection liée à *C. difficile* (231). La protéine LMW-SLP semble également jouer un rôle dans l'adhésion aux cellules Hep-2, mais à un moindre degré que la protéine HMW-SLP (44).

Une étude récente a montré que les protéines de la couche S pouvaient avoir un rôle dans l'altération de l'équilibre du système immunitaire et la libération de cytokines pro-inflammatoires produites par les monocytes et les cellules dendritiques, ainsi que dans la reconnaissance de *C. difficile* par le système immunitaire (33), et de ce fait, participer indirectement à l'altération de l'épithélium digestif.

2.1.1.2. L'adhésine Cwp66

L'adhésine Cwp66 est une protéine de surface associée à la paroi de la bactérie. Elle est présente chez toutes les souches de *C. difficile* qu'elles soient toxinogènes ou non. Le gène *cwp66*, présent en une seule copie dans le génome de *C. difficile* (313), est transcrit majoritairement en début de la phase exponentielle de croissance de la bactérie (270).

C'est une protéine de 66 kDa présentant la structure en trois domaines classique des Cwps : le peptide signal, un domaine N-terminal d'ancrage potentiel à la paroi bactérienne hébergeant trois motifs Pfam 04122, et un domaine C-terminal, très variable, exposé à la surface de la bactérie, qui possède des homologies avec différentes protéines bactériennes de surface (237, 270, 313).

Des anticorps dirigés contre cette protéine ainsi que les deux fragments recombinants de la protéine Cwp66-N-ter et Cwp66-C-ter inhibent partiellement l'adhérence de la bactérie aux

cellules en culture, suggérant ainsi un rôle de Cwp66 comme adhésine de *C. difficile* (313). La protéine Cwp66 est surexprimée après un choc thermique (313).

2.1.1.3. CwpV

CwpV est la plus grande protéine de la famille des protéines Cwps, annotée comme une adhésine potentielle sur la base d'une homologie avec une hémagglutinine de *Salmonella* sérotype Typhimurium (273). Une étude récente a mis en évidence le rôle de cette protéine dans l'agrégation des bactéries entre elles, ce qui pourrait jouer un rôle important dans la formation des biofilms et donc dans la colonisation de l'hôte (258).

CwpV est une protéine de surface de 167 kDa, codée par le gène CD0514 et présentant la structure en trois domaines des Cwps : la partie N-terminale, conservée entre les différentes souches de *C. difficile*, possède trois motifs Pfam 04122 potentiellement impliqués dans l'ancrage à la paroi cellulaire. Le domaine C-terminal est très variable entre les souches de *C. difficile*, le nombre de régions répétées varie d'une souche à l'autre, ce qui permettrait à la bactérie d'échapper à la réponse immune de l'hôte. Chez la souche 630, la partie C-terminale fonctionnelle contient neuf régions répétées de 120 acides aminés, et possède une région riche en sérine/glycine (95, 258).

C'est une protéine soumise à un processus de maturation post-traductionnelle semblable à celui des protéines de la couche S : un premier clivage en N-terminal permettrait de libérer le peptide signal et ainsi de transporter la protéine à travers la membrane cellulaire vers la surface ; le deuxième clivage, à l'intérieur de la protéine, libère deux fragments, un de 40 kDa correspondant au domaine d'ancrage et un de 120 kDa contenant les régions répétées ; le mécanisme de ce clivage est encore inconnu. Enfin, la dernière étape correspond à la formation d'un complexe associant les deux fragments (258).

La protéine CwpV est soumise à une expression phase variable, contrôlée par un interrupteur c*wpV* ON/OFF. Cet interrupteur se trouve entre le promoteur de c*wpV* et le cadre de lecture ouvert, il est formé par une séquence de 195 pb, flanquée par des séquences répétées inversées de 21 pb. Dans l'orientation OFF, cette séquence adopte une structure en épingle à cheveux fonctionnant ainsi comme un terminateur et empêchant la transcription. En position ON, la séquence de l'interrupteur est inversée et donc modifiée, la structure du terminateur est

absente et la transcription de *cwpV* peut avoir lieu. Le promoteur *cwpV* est capable de fonctionner en l'absence de l'interrupteur *cwpV*, ainsi cette structure agirait essentiellement comme un régulateur négatif de l'expression de CwpV, quand il est présent dans l'orientation OFF. Ce modèle d'expression variable pourrait être important *in vivo* en facilitant l'adaptation de la bactérie à des environnements changeants (95).

2.1.1.4. Cwp19

Cwp19 est une protéine de surface de 78 kDa codée par le gène CD2767, qui a été récemment cristallisée. Le rôle de cette protéine n'est pas encore clairement identifié, mais son domaine fonctionnel N-terminal contient une fonction catalytique prédite de glycosidase (166). Cwp19 entraîne la production d'anticorps chez des patients atteints d'ICD (324).

2.1.1.5. Cwp2

La protéine Cwp2, de 66 kDa, est codée par le gène CD2791, transcrit pendant la phase exponentielle de croissance de la bactérie. Elle est conservée dans la plupart des souches de *C. difficile* (45). Aucune fonction précise ne lui a encore été attribuée (46).

2.1.2. Autres protéines de surface

En plus des protéines appartenant à la famille Cwp, *C. difficile* possède d'autres protéines de surface, pouvant jouer un rôle dans le processus de colonisation.

2.1.2.1. La protéine liant la fibronectine : FbpA

La protéine FbpA (Fibronectin binding protein A) de 68 kDa, codée par un gène unique *fbp68* très conservé, présente des homologies significatives avec d'autres protéines bactériennes de liaison à la fibronectine. Elle ne possède pas de peptide signal, comme la plupart de ces protéines, mais une structure coiled-coil impliquée dans la multimérisation des protéines pour former des homo ou hétéro-oligomères a été caractérisée (127). Son domaine C-terminal a été impliqué dans la liaison à la fibronectine (185).

La protéine FbpA est associée à la surface de *C. difficile*. La protéine recombinante FbpA est capable de se lier *in vitro* à la fibronectine, protéine présente à la surface de nombreuses cellules eucaryotes mais également sous forme soluble dans les fluides, ainsi qu'à d'autres protéines de la matrice extracellulaire comme le fibrinogène et la vitronectine. Des anticorps dirigés contre la protéine FbpA inhibent partiellement l'adhésion de *C. difficile* à la fibronectine et aux cellules Vero, ce qui suggère que cette protéine joue probablement un rôle dans l'adhésion aux tissus hôtes et leur colonisation par *C. difficile* (127). La présence de manganèse est requise pour la liaison à la fibronectine. Celui-ci améliore en effet la stabilité structurelle de FbpA (185). Par ailleurs, des anticorps anti-FbpA sont détectés dans le sérum des patients atteints d'ICD, indiquant que cette protéine est capable d'induire une réponse immunitaire de l'hôte lors de l'infection (235).

Récemment, dans notre laboratoire, le rôle de FbpA dans la colonisation intestinale a été étudié en utilisant une souche mutante n'exprimant pas FbpA. *In vitro*, l'absence de FbpA à la surface de *C. difficile* altère l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales Caco-2 et aux cellules sécrétrices de mucus HT29-MTX ; *in vivo,* FbpA joue un rôle dans l'adhésion et la colonisation intestinale chez la souris (17).

2.1.2.2. La protéine de choc thermique : GroEL

GroEL est une protéine chaperonne appartenant à la famille des protéines de stress Hsp60 (Heat Shock Protein). Cette protéine de 58 kDa est codée par le gène *groEL*, très conservé entre différents isolats de *C. difficile*. La protéine GroEL est retrouvée essentiellement au niveau cytoplasmique mais également associée à la paroi bactérienne : elle serait libérée dans le milieu extracellulaire après un choc thermique puis vraisemblablement réassociée à la surface bactérienne par un mécanisme inconnu à ce jour (128).

Les propriétés d'adhésion cellulaire de *C. difficile* sont augmentées parallèlement à l'expression de GroEL à la surface de la bactérie, après un choc thermique à 48 °C, et l'expression de cette protéine semble également induite par des contacts cellulaires, suggérant ainsi une implication de cette protéine dans l'adhésion. De plus, des anticorps dirigés contre GroEL inhibent partiellement l'adhésion de *C. difficile* aux cellules Vero (126).

2.1.2.3. Les protéines du flagelle : FliC et FliD

Le flagelle est un appendice filamenteux inséré dans la membrane cytoplasmique de la bactérie et responsable de sa mobilité. Les flagelles de *C. difficile* sont composés entre autres de la flagelline (la sous-unité structurale majeure) et de la coiffe du flagelle, codées respectivement par les gènes *fliC* et *fliD* (295-297).

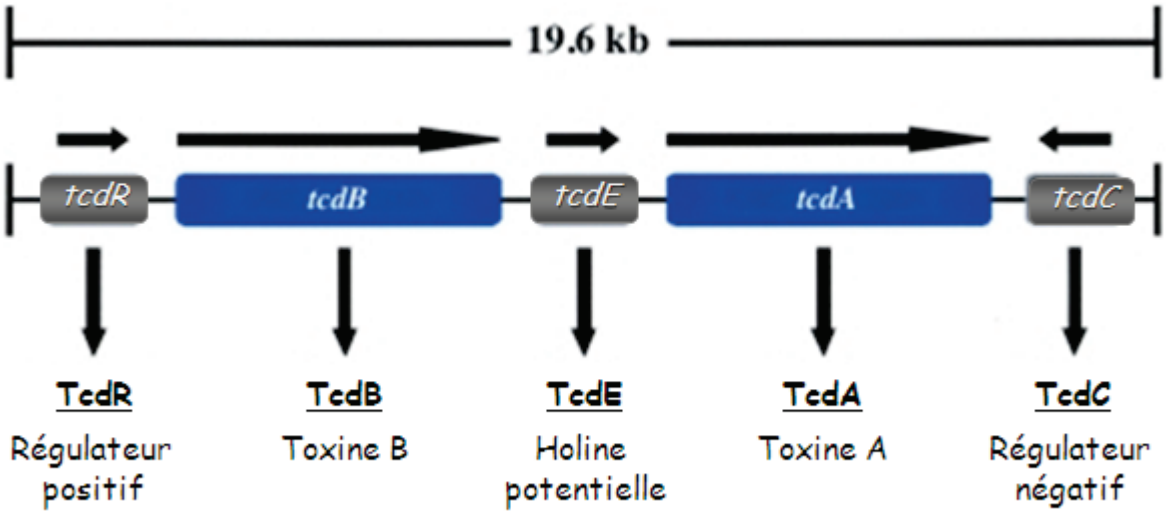
In vitro, les protéines FliC et FliD se lient de manière spécifique au mucus caecal murin, mais seule la protéine de coiffe FliD adhère fortement aux cellules Vero. *In vivo*, l'adhésion au mucus caecal de souris axénique de souches flagellées est 10 fois supérieure à celle de souches non flagellées (294). Cependant, une étude récente utilisant des souches mutantes n'exprimant pas FliC ou FliD n'a pas confirmé le rôle de ces protéines flagellaires dans l'adhésion *in vitro* aux cellules Caco-2.

Les flagelles pourraient jouer un rôle dans la chimiotaxie et la mobilité de la bactérie qui facilite la traversée du mucus, comme c'est le cas pour de nombreuses bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* (8) et *Helicobacter pylori* (91), ce qui favoriserait la colonisation intestinale. La mutation de FliC et FliD se traduit par la perte complète de la mobilité de *C. difficile* (85). Cependant, dans un modèle hamsters, les mutants non flagellés sont plus virulents que la souche sauvage, les flagelles ne semblent donc pas nécessaires à la virulence de *C. difficile*.

2.1.2.4. L'autolysine Acd

Une peptidoglycane hydrolase (PGH) nommée Acd et codée par le gène *acd* a été caractérisée chez *C. difficile*. Le gène *acd* est très conservé entre les souches de *C. difficile* et transcrit essentiellement durant la fin de la phase exponentielle. La protéine Acd de 66 kDa présente une structure en deux domaines : un domaine N-terminal avec des séquences répétées contenant quatre motifs GW probablement impliqués dans l'ancrage à la surface cellulaire et un domaine C-terminal catalytique possédant une activité N-acétyl glucosaminidase (80). La protéine Acd joue un rôle important dans des fonctions physiologiques cellulaires telles que le renouvellement du peptidoglycane et elle pourrait avoir un rôle indirect dans la pathogénèse de *C. difficile* comme cela a été décrit pour d'autres bactéries (80). En particulier, l'autolysine Ami de *Listeria monocytogenes* semble être impliquée dans l'adhésion de la bactérie aux

A



B

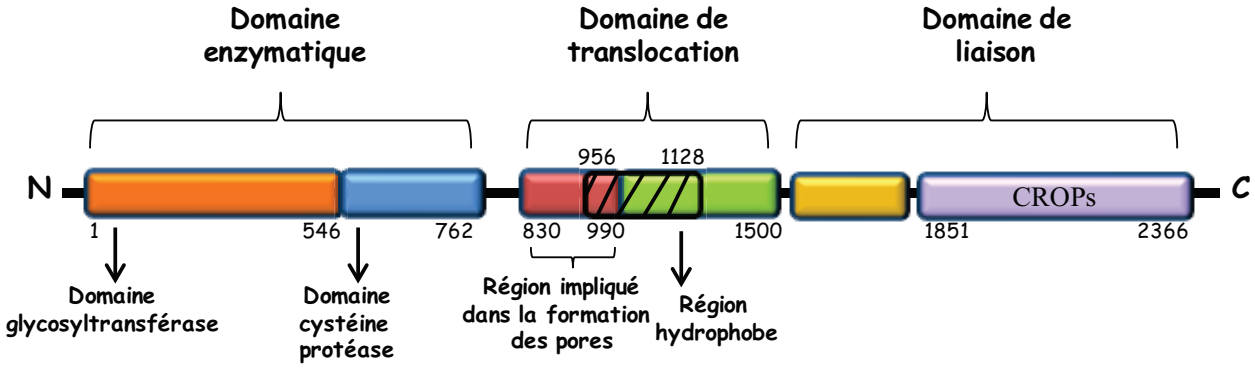


Figure 8. Organisation du locus de pathogénicité PaLoc et structure des toxines. (A) Organisation génétique du PaLoc : les gènes *tcdA* et *tcdB* forment avec les gènes de régulation positif, *tcdR*, et négatif, *tcdC* et le gène *tcdE* un locus de pathogénicité de 19,6 kb. Les flèches indiquent le sens de la transcription. **(B)** Représentation schématique des 3 domaines de la toxine B : le domaine enzymatique du côté N-terminal possède l'activité glycosyltransférase et un domaine à activité cystéine protéase, le domaine de translocation contient une région hydrophobe (portion hachurée) responsable en partie de la formation des pores dans l'endosome et le domaine C-terminal de liaison au récepteur. D'après Voth *et al.* (311) et Genisyuerek *et al*. (109).

CROPS : Combined Repeated Oligopeptides.

cellules hôtes ; cette adhésion aurait lieu via les motifs GW du domaine d'ancrage de l'autolysine (212).

2.2. Facteurs majeurs de virulence : les toxines

Après le processus de colonisation par *C. difficile*, la sécrétion des toxines A et B, reconnues comme les facteurs de virulence majeurs de cette bactérie, va entraîner la formation des lésions intestinales et l'apparition des signes cliniques de l'infection. Certaines souches de *C. difficile* sont capables de sécréter également une troisième toxine appelée toxine binaire CDT dont nous parlerons à la fin de ce chapitre.

2.2.1. Les toxines A et B

Les toxines TcdA (308 kDa) et TcdB (270 kDa) sont des polypeptides qui appartiennent au groupe des toxines clostridiales de haut poids moléculaire. Elles sont codées respectivement par les gènes *tcdA* et *tcdB*. Ces deux gènes sont portés par un même locus de pathogénicité appelé PaLoc, de 19,6 kb, avec trois autres gènes, *tcdC*, *tcdE* et *tcdR* (appelé précédemment *tcdD* ou *txeR*), qui participent à la régulation de la production ainsi qu'à la sécrétion des toxines (123). Les gènes *tcdA*, *tcdB*, *tcdE* et *tcdR* sont orientés dans le même sens, tandis que le gène *tcdC* codant un régulateur négatif est orienté en sens opposé (89, 202) (Figure 8A).

Le gène *tcdR* est un régulateur positif de l'expression des toxines A et B, qui fonctionne comme un facteur sigma alternatif pour les ARN polymérases, leur permettant de se fixer aux promoteurs spécifiques des gènes *tcdA* et *tcdB* (199, 200, 213). La protéine TcdC joue un rôle de régulateur négatif des toxines ; en effet, elle est capable de déstabiliser la formation du complexe ARN polymérase/facteur sigma TcdR, empêchant ainsi la reconnaissance des promoteurs et donc la transcription des gènes des toxines A et B (89, 202). Le gène *tcdE* code une protéine cytoplasmique, TcdE, qui possède une fonction de holine pouvant être à l'origine de la lyse bactérienne et de la libération des toxines dans le milieu extracellulaire (293).

Ce locus de pathogénicité PaLoc est retrouvé uniquement chez les souches toxinogènes, celui-ci étant remplacé chez les souches non toxinogènes par une séquence de 127 bases ne codant aucune protéine (64, 123). La grande majorité des souches toxinogènes expriment à la

fois les toxines A et B, mais certaines souches expriment une toxine A tronquée et sont dites souches A-B+ ; ces souches représentent 3% des isolats cliniques en France (13), ce pourcentage pouvant varier selon les pays. Ces souches A-B+ ont été impliquées dans des épidémies (169, 306) et aussi dans des cas de CPM (183, 301).

Les deux toxines possèdent 50% d'acides aminés en commun et une structure similaire constituée de trois domaines : le domaine N-terminal, responsable de l'activité glycosyltransférase, possède également un domaine cystéine protéase ; le domaine C-terminal, constitué d'éléments répétitifs appelés CROPS (Combined Repeated Oligopeptides), joue un rôle essentiel dans la liaison des toxines à leurs récepteurs ainsi que dans l'étape d'endocytose des toxines dans la cellules hôte (104, 309, 310) ; le domaine intermédiaire(149) trans-membranaire, qui possède une région hydrophobe et une région impliquée dans la formation de pores, jouerait un rôle dans la translocation des toxines dans le cytosol (149, 242) (Figure 8B).

2.2.2. Effets physiopathologiques

La toxine A est une entérotoxine létale provoquant une altération importante de la muqueuse colique, une réponse inflammatoire avec infiltration massive de polynucléaires neutrophiles et de cellules mononuclées, une nécrose des cellules épithéliales et des pertes liquidiennes, et possède également une activité cytotoxique. La toxine B est 1000 fois plus cytotoxique que la toxine A et possède également une activité entérotoxique (36, 271, 311). Des résultats parfois contradictoires sont issus de l'analyse de mutants inactivés pour la toxine A et/ou la toxine B : dans une première étude, il a été mis en évidence que la toxine A ne serait pas essentielle à la virulence de *C. difficile* (192), mais plus récemment, une équipe anglaise a montré que les souches exprimant seulement la toxine A pouvaient être virulentes et létales pour le hamster, ce qui démontre l'importance des deux toxines dans la virulence de *C. difficile* (172). Ces résultats discordants pourraient être expliqués par la différence de souches utilisées pour la création des mutants.

Des essais *in vitro* sur des cellules Caco-2 mises en contact avec la toxine A ont mis en évidence des changements dans l'intégrité du cytosquelette avec une modification dans la morphologie de la cellule (329). Les toxines induisent également l'apoptose cellulaire par des

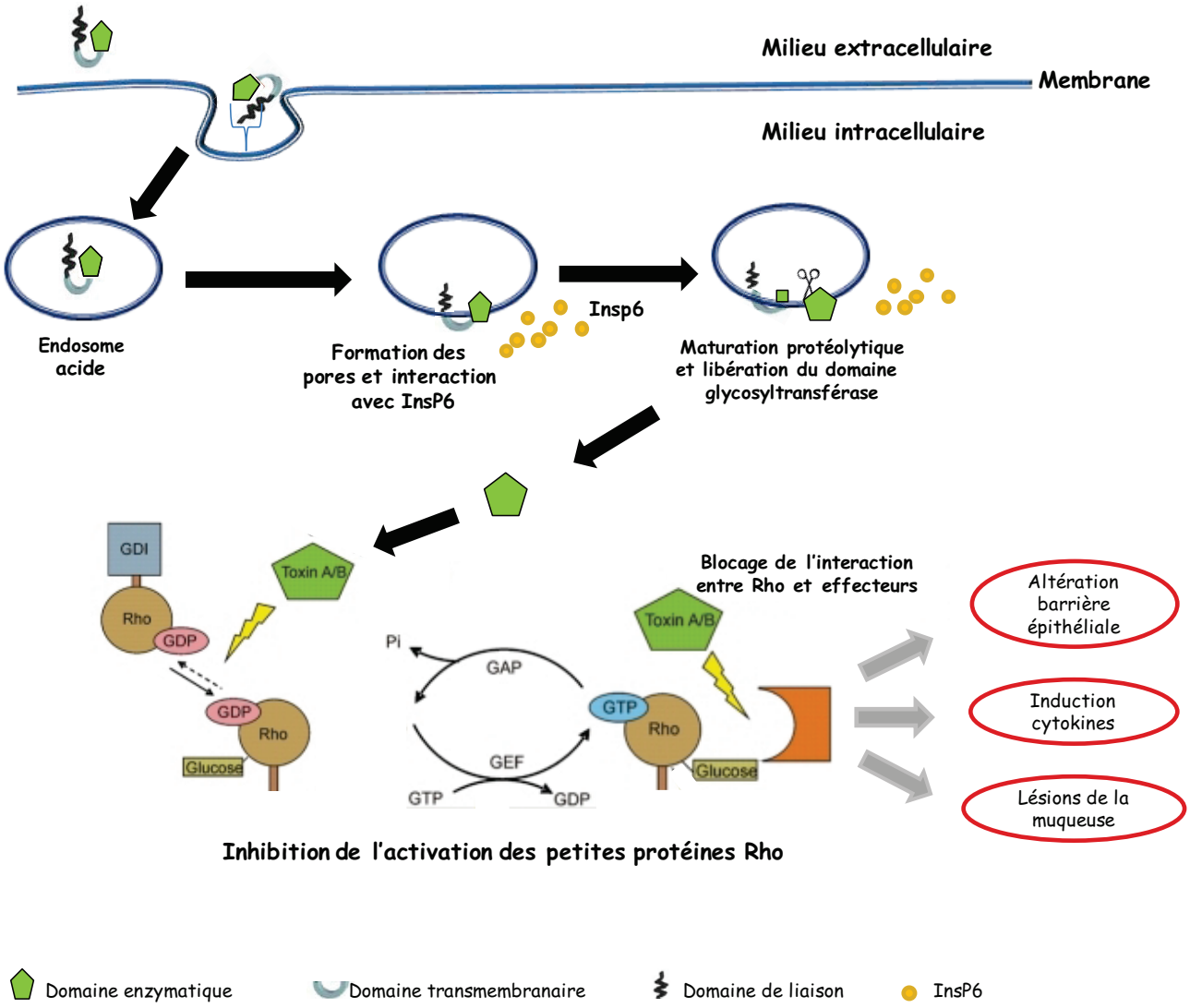


Figure 9. Mécanisme d'action des toxines A et B. Les toxines A et B se lient à leurs récepteurs à la surface cellulaire par leur domaine C-terminal, et sont ensuite internalisées par endocytose. Le pH acide de l'endosome induit un changement structural du domaine transmembranaire, capable de former de pores dans la membrane de l'endosome. Ainsi, le domaine enzymatique interagit avec InsP6, un facteur cytosolique, capable d'activer le domaine cystéine protéase, induisant ainsi un processus autoproteolytique qui entraîne la libération du domaine glycosyltransférase dans le cytosol. Le domaine catalytique va inactiver les Rho GTPases par l'incorporation irréversible d'un glucose. Les protéines Rho GTPases contrôlant de nombreuses voies de signalisation cellulaire, leur inactivation se traduit par l'altération de la barrière intestinale, induisant ainsi une diarrhée. Les toxines vont également induire la production de cytokines pro-inflammatoires au sein de la *lamina propria* entraînant ainsi une réponse inflammatoire intense. Figure modifiée d'après Carter *et al.* (52) et Reineke J. *et al*. (256).

phénomènes dépendants ou non de l'inactivation des protéines Rho, entrainant ainsi une augmentation de la perméabilité épithéliale se traduisant par de la diarrhée (101, 111, 196). Outre leur activité toxique directe sur les entérocytes, les toxines sont également responsables d'un effet indirect sur les cellules de la *lamina propria*, principalement la toxine A, via la production de cytokines pro-inflammatoires induisant une réaction inflammatoire intense ou encore la production de formes réactives de l'oxygène (124).

2.2.3. Mécanisme d'action

La liaison des toxines à leurs récepteurs est une étape importante, plusieurs récepteurs putatifs ont été décrits pour TcdA, y compris des glucides, des protéines et des glycoprotéines. La toxine TcdB se lie sur plusieurs types de cellules, ce qui indique que son récepteur, encore inconnu, est vraisemblablement ubiquitaire. Les récepteurs précis de TcdA et TcdB chez l'être humain n'ont pas été identifiés, toutefois les toxines pourraient se lier à une structure cellulaire comportant le disaccharide Galß1-4GlcNAc, présent sur de nombreuses cellules humaines, et/ou à la protéine de choc thermique gp96 (171, 218, 246).

Après fixation sur leurs récepteurs cellulaires par leur partie C-terminale, les toxines sont internalisées par un mécanisme d'endocytose dépendant de la clathrine (233) dans des endosomes acides où elles subissent un processus autoprotéolytique, puis le domaine N-terminal responsable de l'activité glycosyltransférase est libéré dans le cytosol de la cellule (242). L'acidification de l'endosome induirait des changements structuraux des toxines, principalement au niveau du domaine trans-membranaire de translocation, qui serait alors capable de former des pores dans la membrane de l'endosome (19, 109, 114). La formation de ces pores permet l'interaction des toxines avec un cofacteur cellulaire cytosolique, l'inositol hexakisphosphate (InsP6). L'InsP6 induirait un deuxième changement structural au niveau du domaine enzymatique, activant le domaine cystéine protéase (triade catalytique Cys-698, His-653 et Asp-587 pour la toxine B et Cys-700, His-655 et Asp-589 pour la toxine A (92). Les toxines vont être soumises à des clivages autocatalytiques, ce qui va ainsi entraîner la libération du domaine glycosyltransférase dans le cytosol (256).

TcdA et TcdB sont des glycosyltransférases ciblant la famille Rho des petites GTPases, essentielles pour différentes voies de signalisation vitales pour la cellule telles la croissance

cellulaire, l'intégrité du cytosquelette d'actine, le trafic cellulaire et le maintien des jonctions intracellulaires (308). Les toxines catalysent l'incorporation d'un glucose à partir d'un UDP-glucose sur la thréonine 37 de la protéine Rho et sur la thréonine 35 des protéines Rac et Cdc42, rendant ces protéines de signalisation non fonctionnelles (82, 150). La glycosylation irréversible de ces protéines régulatrices provoque la perturbation de différentes voies de signalisation, entrainant ainsi une altération de la polymérisation des filaments d'actine et des microtubules à l'origine d'une désorganisation du cytosquelette et des jonctions intracellulaires des cellules intestinales. Ces phénomènes résultent en une altération de la barrière épithéliale, une réponse inflammatoire sévère ou des lésions de la muqueuse (Figure 9) (52, 220, 224, 247).

2.2.4. La toxine CDT

Certaines souches de *C. difficile*, telles que les souches de ribotype 027 et 078, produisent une troisième toxine binaire possédant une activité ADP-ribosyltransferase spécifique de l'actine, appelée CDT. Cette toxine fut décrite pour la première fois en 1988 chez une souche de *C. difficile* isolée d'une patiente atteinte d'une forme sévère de CPM (244).

La toxine CDT est codée par deux gènes : *cdtA* qui code le domaine enzymatique (45kDa) et *cdtB* codant le domaine de liaison (100kDa) (241). Ces deux gènes forment avec un troisième gène, *cdtR*, codant une protéine régulatrice de la famille LytR nécessaire à l'expression optimale de CDT, le locus CdtLoc (50). Une étude récente a mis en évidence une mutation dans le gène *cdtR* chez une souche du clone 078, résultant en la production d'une protéine tronquée. Toutefois, des transcrits de *cdtA* étaient détectés, suggérant ainsi que cette protéine régulatrice n'est pas indispensable à l'expression de la toxine binaire (208). Le domaine de liaison reconnaît un récepteur à la surface de la cellule, le récepteur aux lipoprotéines (LSR), entraînant l'internalisation du domaine enzymatique dans le cytosol (232). Ce domaine catalyse l'ADP-ribosylation de l'actine et induit la désorganisation du cytosquelette (241). Des souches n'exprimant que la toxine binaire (A-B-CDT+) se sont avérées non virulentes chez le hamster, toutefois la toxine CDT purifiée entraine des effets entérotoxiques avec accumulation de fluide chez le lapin (112). Le rôle de cette toxine dans la virulence de *C. difficile* n'est pas complètement élucidé, elle pourrait potentialiser les effets cytotoxiques des toxines A et B et serait associée à des formes sévères d'ICD (11).

2.3. Souches épidémiques

2.3.1. PCR ribotype 027

Les souches épidémiques 027 hébergent un gène répresseur *tcdC* présentant différentes délétions : une délétion de 18 ou 39 pb et une délétion ponctuelle en position 117 à l'origine d'un décalage de lecture introduisant un codon STOP TAG, menant à une protéine TcdC tronquée et inactive (69, 193, 287). Une hyperproduction des toxines A et B *in vitro* avait été démontré (315). Cependant, une étude plus récente remet en cause ces résultats, en suggérant que les mutations au niveau du gène *tcdC* ne peuvent pas expliquer totalement le haut niveau de production des toxines (214). Les souches 027 produisent également la toxine binaire (315). Concernant la sporulation de ces souches, une capacité de sporulation plus importante avait été évoquée (4), mais une étude récente analysant des souches 027 et des souches non 027 a mis en évidence que la sporulation n'est finalement pas plus importante chez les souches 027 (42).

2.3.2. PCR ribotype 078/126

Les souches épidémiques 078/126 présentent plusieurs caractéristiques en commun avec le clone 027 : différentes délétions au niveau du gène *tcdC*, une délétion de 39 pb et une délétion ponctuelle en position 184, résultent en un codon stop TAA, ce qui conduit également à une protéine tronquée. Ces souches produisent également la toxine binaire (53).

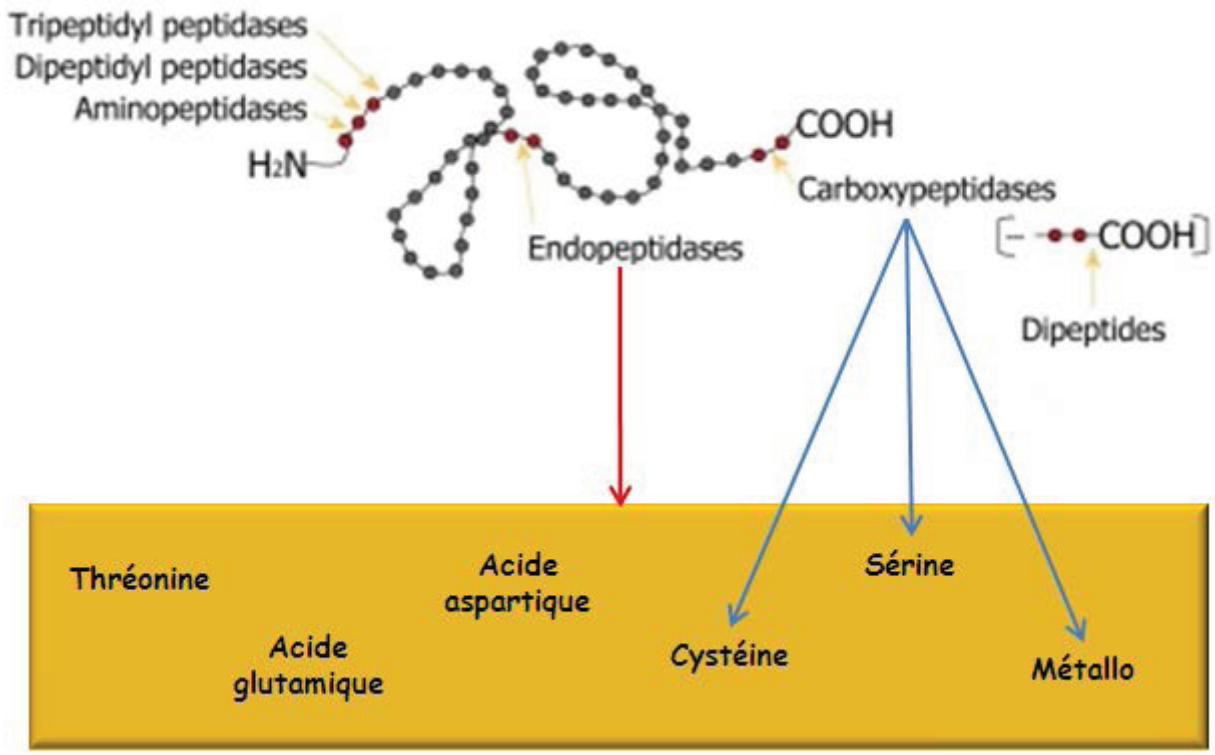


Figure 10. Classification de protéases. Les protéases sont classées en deux grands groupes : les exopeptidases et les endopeptidases. Dans le premier groupe elles peuvent être classées comme amino- ou carboxypeptidases, les flèches bleues indiquant la classification des carboxypeptidases. La flèche rouge renvoie vers les différentes classes d'endopeptidases. Les cercles gris représentent les acides aminés et les cercles rouges indiquent les sites de clivage possibles. D'après Dos Santos (87).

3. Les protéases

Les protéases sont des enzymes hydrolytiques ubiquitaires, physiologiquement nécessaires aux organismes vivants. Elles sont présentes chez les plantes, les animaux et les microorganismes, y compris chez de nombreuses bactéries à Gram positif. Les protéases sont aussi connues sous les noms de peptidases, protéinases ou enzymes protéolytiques (253). Elles sont définies par leurs capacités à hydrolyser les liaisons peptidiques ce qui aboutit au clivage des protéines (249).

3.1. Classification

La classification des protéases n'est pas simple en raison de leur grande diversité de structure et de mécanisme d'action. Actuellement, les protéases sont classées sur la base de trois critères : le site de la réaction catalysée, la nature du site catalytique et leur structure (249). On distingue deux grands groupes en fonction de leur site d'action : (i) les exopeptidases qui hydrolysent les liaisons peptidiques par l'extrémité N-terminale (NH_2) ou C-terminale (COOH) de la protéine, ou (ii) les endopeptidases qui hydrolysent les liaisons peptidiques internes (Figure 10) (249, 314).

3.1.1. Exopeptidases

Selon leur site d'action à l'extrémité N-terminale ou C-terminale des protéines, les exopeptidases sont classées comme amino- ou carboxypeptidases, respectivement.

3.1.1.1. Aminopeptidases

Les aminopeptidases agissent sur l'extrémité N-terminale et sont capables de libérer soit un unique résidu d'acide aminé, soit un dipeptide ou un tripeptide : elles sont alors classées respectivement comme aminopeptidases, dipeptyl peptidases ou tripeptidyl peptidases (87). Ces enzymes se trouvent dans une grande variété d'espèces microbiennes, y compris les bactéries et les champignons (249).

3.1.1.2. Carboxypeptidases

Les carboxypeptidases vont libérer un seul acide aminé ou un dipeptide en agissant sur le côté C-terminal. Elles peuvent être divisées en trois groupes, selon la nature de l'acide aminé au niveau du site actif de l'enzyme : sérine carboxypeptidase, métallocarboxypeptidase et cystéine carboxypeptidase (87, 249).

3.1.2. Endopeptidases

Les endopeptidases sont définies par leur action au niveau des liaisons peptidiques situées dans les régions intérieures de la chaîne polypeptidique, loin des extrémités N- et C-terminales. Elles sont classées en 6 grands clans selon la nature de leurs acides aminés fonctionnels au niveau du site catalytique, eux-mêmes subdivisés en familles. On distingue : les sérine protéases, les cystéine protéases, les métalloprotéases, les protéases à acide aspartique, les protéases à acide glutamique et les protéases à thréonine (87). Afin de faciliter la consultation rapide d'un clan particulier des protéases, Rawling et Barret ont attribué une lettre indiquant l'acide aminé catalytique, par exemple S pour serine, C pour cystéine et ainsi de suite, suivi par un numéro attribué arbitrairement (251). Nous allons décrire brièvement les différents clans, mais nous nous attarderons plus longuement sur les cystéines protéases dans le chapitre 3.2.

3.1.2.1. Sérine protéases

Cette famille de protéases possède un site catalytique composé de 3 acides aminés caractéristiques : histidine, acide aspartique et sérine. Les sérine protéases sont très répandues chez les bactéries, les virus et les eucaryotes, ce qui suggère qu'elles sont indispensables à ces organismes. Les sérine protéases sont actives à un pH neutre ou alcalin, entre pH 7,0 et pH 11 (249, 252).

3.1.2.2. Métalloprotéases

La composition du site actif peut varier selon les métalloprotéases. Elles sont caractérisées par leur besoin de lier un ion métallique au niveau de leur site actif, le plus souvent le Zn^{2+} mais

aussi le Ca^{2+}. Elles sont largement représentées chez les bactéries et les champignons, en particulier dans le genre *Clostridia*, par exemple la collagénase de *Clostridium hystolyticum* (249), mais aussi les neurotoxines de *Clostridium botulinum* et *Clostridium tetani* (261).

3.1.2.3. Les protéases à acide aspartique

Les protéases à acide aspartique présentent un site actif composé de deux acides aspartiques. Elles regroupent des enzymes de mammifères, ainsi que des enzymes d'origines bactérienne et fongique. Les protéases à acide aspartique ont une activité maximale à pH acide, entre 3,0 et 4,0. Leur mécanisme d'action repose sur une réaction acido-basique (249).

3.1.2.4. Les protéases à acide glutamique

Les protéases à acide glutamique possèdent une dyade catalytique constituée d'un glutamate et d'un résidu de glutamine. Elles n'ont été décrites dans un premier temps que chez les champignons (281) mais leur présence chez les bactéries a été mise en évidence récemment (140).

3.1.2.5. Les protéases à thréonine

Il s'agit d'enzymes protéolytiques dans lesquelles un résidu thréonine localisé en N-terminal agit comme nucléophile. Les protéases à thréonine sont étudiées depuis peu et certaines ont été décrites chez les archées, les champignons, les parasites et les bactéries.

3.2. Cystéine protéases

Les cystéine protéases ont été découvertes pour la première fois dans les plantes des tropiques, puis leur présence a été mise en évidence dans le monde animal. Nous pouvons citer quelques exemples de cystéines protéases : la papaïne, les cathepsines, les caspases et les calpaïnes. Ces enzymes sont importantes en microbiologie, du fait de leur présence chez la plupart des microorganismes pathogènes (263).

Clan	Site catalytique	Caractéristiques	Mécanisme d'activation
CA	Cys, His, Asn (ou Asp)	➢ Outre la triade catalytique, un résidu Gln est également important pour la catalyse ➢ Regroupe les protéases possédant une structure similaire à celle de la papaïne ➢ Le clan CA comprend 27 familles	➢ La plupart des protéases sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs, avec un pro-peptide du côté N-terminal. Ces pro-peptides sont souvent clivés par un processus autoproteolytique, générant ainsi la protéase active
CD	His, Cys	➢ Regroupe des protéases de séquence similaire à celle des caspases ➢ Pas d'inhibition par l'inhibiteur E-64 ➢ Le clan CD comprend 6 familles ➢ L'His se trouve dans un motif His-Gly, et la Cys dans un motif Ala-Cys ; les 2 motifs sont précédés par un bloc de résidus hydrophobes	➢ Les protéases du clan CD sont activées de différentes façons : la clostripaine de *Clostridium histolyticum* synthétisée sous forme de précurseur inactif est activée par clivage du pro-peptide du côté N-terminal, tandis que dans la famille C14 l'activation a lieu par une dimérisation
CE	His, Asp (ou Asn), Gln, Cys	➢ Plusieurs protéases de ce clan montrent une spécificité de clivage après une di-glycine ➢ Le clan CE comprend 6 familles	➢ L'adenaine (protéase type du clan CE) de l'adénovirus de type 2, synthétisée sous forme de précurseur inactif, nécessite la présence d'un cofacteur de 11 AA (GVQSLKRRRCF) et de l'ADN viral pour être active
CF	Glu, Cys, His	➢ La structure tridimensionnelle de la pyroglutamil peptidase de *Thermococcus litoralis* diffère de celle des autres cystéines protéases ➢ Le clan CF contient 1 seule famille	➢ Non déterminé
CL	His, Cys	➢ Contient les sortases A et B de *Staphyloccocus aureus*, qui hydrolysent et transfèrent des peptides au niveau de la paroi bactérienne ➢ Le clan CL comprend 2 familles	➢ La sortase A est activée par les ions Ca^{2+}
CM	His, Glu, Cys	➢ Le clan CM comprend 1 seule famille, contenant des endopeptidases virales	➢ La protéase active est un homodimère, la première sous-unité contient l'His et la Glu, et la deuxième la Cys
CN	Cys, His	➢ Le clan CN comprend 1 famille, contenant des endopeptidases virales	➢ Non déterminé

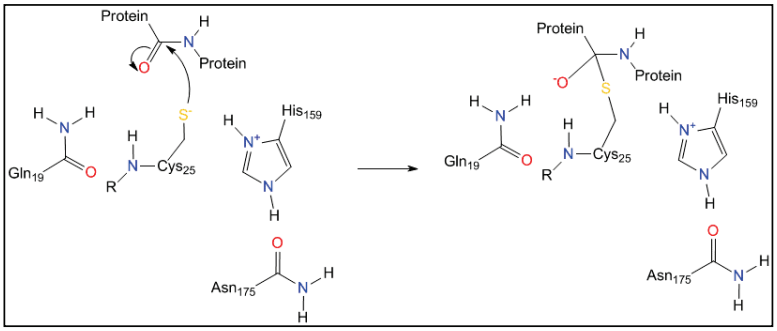
Tableau 1. Classification des cystéines protéases. Elles sont classées dans 9 principaux clans : CA, CD, CE, CF, CL, CM, CN, CO et un dernier clan nommé « non attribué ». Ce dernier clan comprend 13 familles, mais nous ne disposons pas d'informations supplémentaires sur le site catalytique. Le clan CO comportant une seule exopeptidase n'est pas inclus dans le tableau. D'après la base de données MEROPS (http://merops.sanger.ac.uk/) et Rudenskaya *et al.* (263).

Les cystéine protéases sont des peptidases dont le mécanisme catalytique implique la présence d'un résidu cystéine dans le site catalytique. La classification des cystéine protéases est fondée sur leur mécanisme catalytique et leur structure, et comprend 9 principaux clans, subdivisés en familles sur la base de l'architecture de leur dyade ou triade catalytique : CA, CD, CE, CF, CL, CM, CN, CO ainsi qu'un dernier clan nommé « non attribué » selon la base de donné MEROPS, disponible à l'URL http://merops.sanger.ac.uk/. La première lettre indique l'acide aminé catalytique du site actif, en l'occurrence C pour cystéine ; la deuxième lettre donnée arbitrairement permet de classer les cystéine protéases en fonction de leur site catalytique et de leur structure (Tableau 1). De plus, ces clans sont divisés en familles correspondant à un ensemble d'enzymes protéolytiques de séquences peptidiques homologues (18). Dans la suite de ce mémoire, nous nous intéresserons plus particulièrement au clan CA, dans lequel la première protéase identifiée a été la papaïne. Les protéases appartenant à ce clan possèdent la triade catalytique cystéine, histidine et asparagine (Cys, His, Asn), ainsi qu'un résidu glutamine (Gln) qui joue également un rôle dans la catalyse (263).

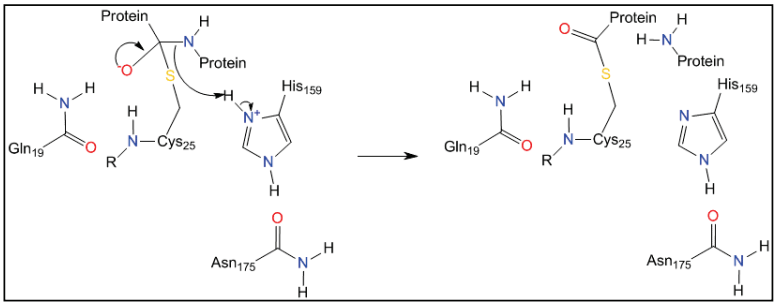
L'activité des cystéine protéases est stimulée par les agents réducteurs tels le dithiothreitol (DTT), la cystéine ou le β-mercapto-éthanol, qui maintiennent le groupe thiol sous une forme réduite. Leur activité est inhibée par différents inhibiteurs, dont certains sont spécifiques comme le E-64 (t*rans*-Epoxysuccinyl-L-leucylamido (4-guanidino) butane), l'acide iodoacétique ou le N-éthylmaléïmide. D'autres inhibiteurs, comme la leupeptine et le TLCK (1-Chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone HCl) inhibent également les sérine protéases (263).

3.2.1. Mécanisme catalytique

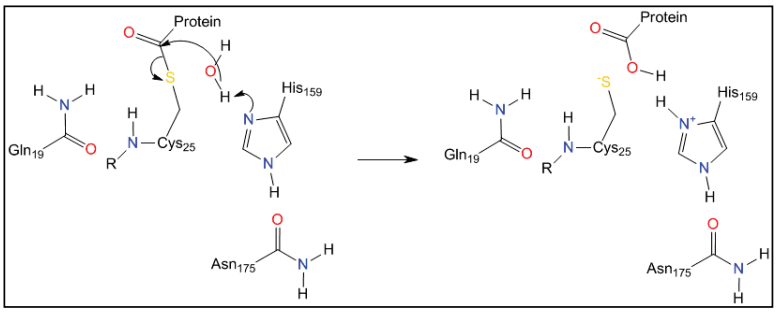
Le mécanisme catalytique des cystéine protéases met en jeu un groupe nucléophile, le soufre anionique (S-) du groupe thiol (SH) déprotoné de la cystéine, et un donneur des protons, une histidine. Certaines cystéine protéases ont besoin d'un troisième, voire d'un quatrième résidu catalytique, qui stabilise le noyau imidazole de l'histidine dans l'orientation spatiale correcte (263). La réaction catalytique des cystéines protéases se déroule généralement en plusieurs étapes dans lesquelles une liaison intermédiaire covalente est formée entre l'enzyme et le substrat, avec la perte finale d'un acide aminé ou d'un fragment peptidique du substrat.



Attaque nucléophile par la cystéine déprotonée, sur le groupement carbonyle du substrat



Transfert de protons par l'histidine vers le substrat, et libération de la partie C-terminale (R'-NH2)



L'histidine active une molécule d'eau qui attaque le complexe, entraînant la libération du côté N-ter du substrat et la régénération de la papaïne

Figure 11. Mécanisme catalytique des cystéines protéases, exemple de la papaïne. La Cys-25 déprotonée sur le thiol va attaquer la liaison peptidique à cliver, formant un complexe protéase/substrat. Cet état de transition est stabilisé par la Gln-19. L'His-159 protonée transfère son proton vers le substrat, et il y a la libération d'une amine (R'-NH_2) du côté C-terminal du substrat. L'histidine active une molécule d'eau qui attaque le complexe intermédiaire protéase/substrat. Dans la dernière étape, le complexe se décompose et il y a la libération de l'ancienne partie N-terminale du substrat clivé ; la papaïne est alors régénérée dans sa forme déprotonée. D'après Rao *et al.* (249), Chabriere (57) et Frey *et al.* (103).

Afin d'illustrer le mécanisme catalytique des cystéine protéases, nous allons présenter en exemple le mécanisme de la papaïne (Figure 11). Le groupe réactif est constitué d'une triade catalytique : la Cys-25 est l'acide aminé qui réagit avec le substrat tandis que l'His-159 et l'Asn-175 contribuent à rendre la cystéine particulièrement réactive. En outre, la Gln-19 stabilise le noyau imidazole de l'histidine pendant la catalyse. Lors de la première étape de la réaction catalytique, la cystéine transfert son proton présent au niveau du thiol (SH) à un acide aminé adjacent ayant une chaîne latérale basique, habituellement l'histidine 159. Le soufre anionique (S-) de la cystéine produit une attaque nucléophile sur le groupement carbonyle du substrat (peptide à cliver). Un complexe intermédiaire protéase/substrat se forme pendant cette étape. L'His-159 protonée transfère son proton à l'azote (N) du substrat, il y a alors clivage d'une amine (R'-NH_2) de la partie C-terminale de la protéine. Ensuite, une molécule d'eau déprotonée par l'histidine va attaquer le complexe intermédiaire protéase/substrat, libérant ainsi l'ancienne partie N-terminale du substrat clivé avec régénération de l'enzyme libre sous sa forme initiale (57, 103, 249).

3.3. Rôles des protéases

Les protéases sont essentielles pour toutes les formes de vie, elles sont impliquées dans une multitude de fonctions métaboliques et régulatrices qui peuvent aller de la simple digestion de protéines à des fins nutritionnelles, à leur participation à des cascades métaboliques hautement régulées qui régissent des événements cruciaux dans la cellule tels que la prolifération, la différenciation, la signalisation et les voies apoptotiques. De ce fait, les protéases sont des facteurs indispensables pour le contrôle de l'homéostasie (Figure 12) chez les cellules procaryotes et eucaryotes (87, 249).

En outre, plusieurs espèces bactériennes sécrètent des protéases pouvant jouer un rôle essentiel dans la pathogénèse des infections en dégradant des protéines de l'hôte, ce qui favorise la colonisation, la dissémination, l'adhérence et l'évasion de la bactérie vis-à-vis de la réponse immunitaire de l'hôte (Figure 12) (87). Les protéases bactériennes intracellulaires sont hautement spécifiques et sont impliquées dans plusieurs processus biologiques tels l'élimination des peptides signaux des protéines, l'activation des précurseurs inactifs ou

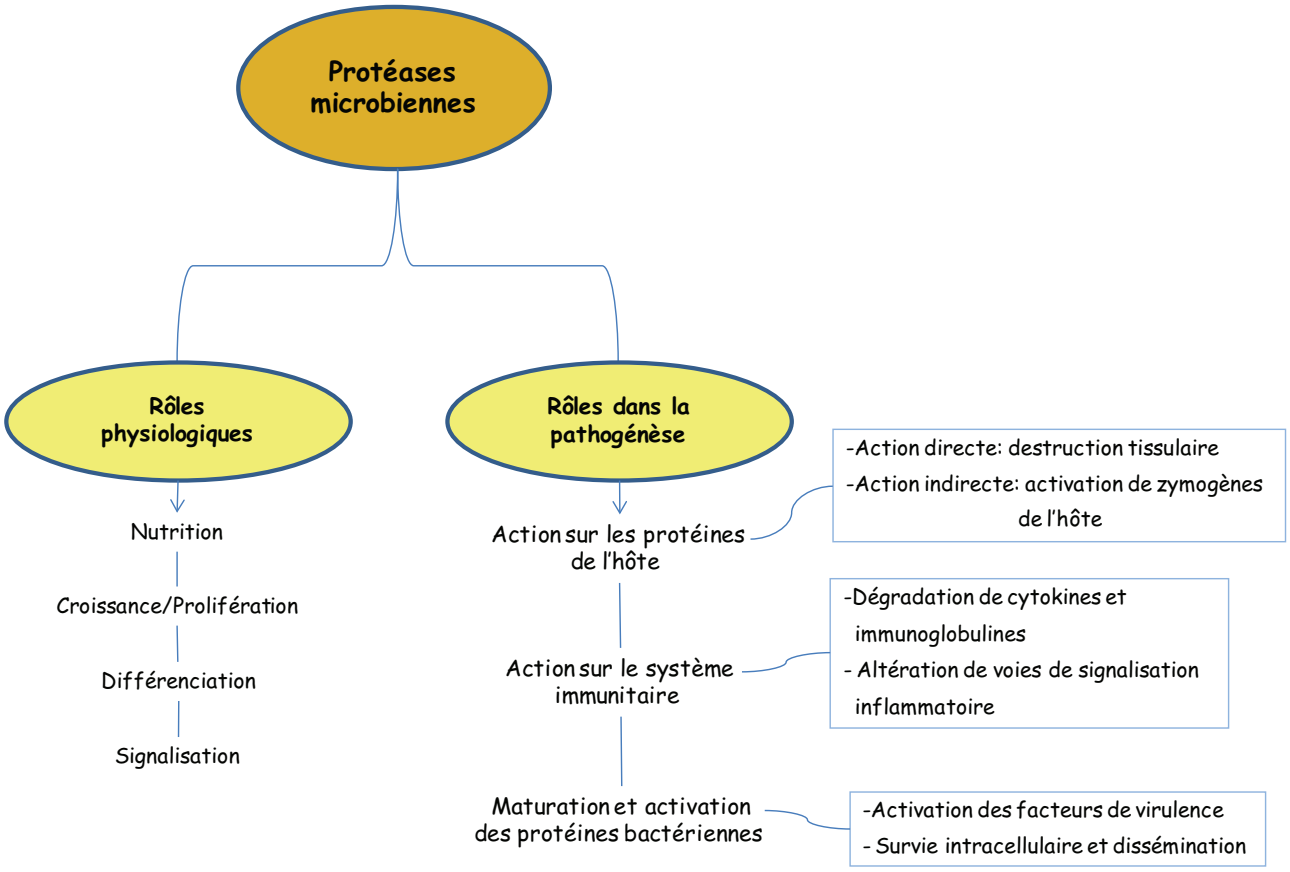


Figure 12. Potentiels rôles des protéases microbiennes. Les protéases sécrétées ou localisées à la surface des bactéries sont capables de jouer un rôle dans la virulence bactérienne. Elles peuvent agir sur différentes protéines de l'hôte, sur le système immunitaire, et/ou jouer un rôle dans l'activation de protéines bactériennes jouant un rôle dans la virulence, facilitant ainsi la dissémination et la survie intracellulaire de la bactérie, ainsi que son évasion et l'immunomodulation de la réponse immunitaire de l'hôte. Figure modifiée d'après Dos Santos (87).

zymogènes des protéases, l'inactivation des protéines régulatrices et la dégradation des protéines anormales ou étrangères (314).

Ainsi, les protéases peuvent être considérées comme des facteurs de virulence importants. C'est pourquoi la compréhension de leur rôle dans les infections microbiennes et leur exploitation en tant que cibles vaccinales est d'un grand intérêt. Nous détaillerons certains des rôles décrits pour des protéases bactériennes ci-dessous, en nous concentrant majoritairement sur les cystéine protéases.

3.3.1. Action sur les protéines de l'hôte

Les microorganismes pathogènes sont capables d'agir sur certaines protéines de l'hôte, contribuant ainsi, d'une part à la destruction tissulaire et/ou cellulaire observée au cours de certaines infections, et d'autre part à la dissémination des microorganismes.

(i) Action directe :

Plusieurs protéases agissent sur la matrice extracellulaire, un tissu conjonctif constitué par quatre classes de molécules : les collagènes, le protéoglycane, l'élastine et des protéines structurales telles que la fibronectine, la laminine et la vitronectine. Les cystéine protéases RGP et KGP de *Porphyromonas gingivalis* ont la capacité de dégrader une large gamme des protéines de l'hôte : les collagènes de type I et IV, et d'autres protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine et la laminine (151). *Streptococcus pyogenes*, bactérie responsable de plusieurs infections cutanées et muqueuses de gravité variable chez l'homme, ou encore d'un syndrome de choc toxique, produit une cystéine protéase, SpeB, capable de cliver le fibrinogène (132), la fibronectine et de dégrader la vitronectine, affectant ainsi l'intégrité structurale du tissu endothélial de l'hôte (155). Cette cystéine protéase, présente sous forme sécrétée mais également localisée à la surface de la bactérie, est aussi capable de se lier à la laminine (132). Chez *Staphyloccocus aureus*, bactérie commensale de l'homme responsable de nombreuses infections cutanéo-muqueuses ou encore d'infections systémiques, plusieurs protéases extracellulaires ont été impliquées dans le pouvoir pathogène de la bactérie : SspA (sérine protéase), SspB (cystéine protéase) et Aur (métalloprotéase) (278). Les gènes *sspA* et *sspB* sont organisés en opéron. La cystéine protéase SspB est capable de cliver la fibronectine et le fibrinogène (201). Le rôle précis des autres protéases sur les

protéines de l'hôte n'a pas été élucidé ; cependant, leur rôle dans la virulence a été mis en évidence dans un modèle souris où l'inoculation des souches mutantes dépourvues de protéases entraîne une diminution de la virulence par rapport à la souche sauvage (278).

(i) Action indirecte :

En outre, les protéases peuvent avoir un rôle indirect sur la destruction de la matrice extracellulaire en activant des zymogènes de l'hôte, ce qui se traduit par des modifications de l'homéostasie, entrainant finalement la destruction des tissus. La cystéine protéase SpeB de *S. pyogenes* est capable d'activer une métalloprotéase produite par les cellules endothéliales de l'hôte, entrainant ainsi une augmentation de la dégradation du collagène de type IV. Ce phénomène pourrait contribuer à la destruction tissulaire, à un désordre hémodynamique et à la dissémination de la bactérie (43). Chez *Vibrio vulnificus*, une bactérie d'origine alimentaire qui peut produire des septicémies gravissimes, la présence d'une métalloprotéase extracellulaire (vEP) capable de cliver plusieurs protéines associées à la coagulation sanguine a été décrite. vEP fonctionne comme un activateur de la prothrombine et une enzyme fibrinolytique, ce qui entrainerait une altération de l'homéostasie sanguine facilitant le développement d'une infection systémique par la bactérie (58).

3.3.2. Action sur le système immunitaire

Les protéases bactériennes jouent un rôle important dans la neutralisation des mécanismes de défense mis en place par l'hôte en réponse à une infection bactérienne (129). L'inflammation est l'une des premières lignes de défense ; elle a pour but d'éradiquer un pathogène lors d'un processus infectieux. Les protéases sont capables de tromper le système immunitaire en altérant cette première ligne de défense, ainsi qu'en interférant avec le système du complément. Elles peuvent aussi être directement impliquées dans l'altération des défenses de l'hôte en dégradant les cytokines et les immunoglobulines qui jouent un rôle important dans la lutte contre les microorganismes au niveau des muqueuses. Ces mécanismes aboutissent à l'altération de la fonction des phagocytes professionnels (neutrophiles, macrophages, monocytes et les lymphocytes NK pour Natural Killer) (245).

Les cystéine protéases RGP and KGP de *P. gingivalis* sont par exemple capables de dégrader et inactiver les immunoglobulines IgG, IgA et IgA sécrétoires, et les cytokines telles que

l'interleukine-6 et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-α). Ces cystéine protéases ont la capacité de supprimer l'activité bactéricide des leucocytes et sont également impliquées dans la dysrégulation du système du complément en dégradant la protéine C3, ce qui permettrait à *P. gingivalis* d'échapper à la phagocytose (151). Récemment, la capacité des protéases de cette bactérie à dégrader les α- et β-défensines humaines a été mise en évidence. Les défensines sont des peptides antimicrobiens localisés sur plusieurs cellules (principalement les neutrophiles, les leucocytes et les cellules épithéliales) et qui jouent un rôle dans l'immunité innée. La dégradation de ces défensines se traduirait par leur incapacité à se lier à la membrane microbienne et à induire la mort de la bactérie. Ce phénomène faciliterait ainsi la colonisation de l'hôte par la bactérie (48).

La sollicitation permanente des cellules du système immunitaire par les bactéries conduit à un équilibre à l'origine du phénomène de tolérance. Ainsi, dans un contexte infectieux, la bactérie serait capable d'induire une réponse inflammatoire ; puis d'inhiber l'expression des facteurs inflammatoires, lui permettant ainsi de proliférer au sein de l'organisme. Chez *S. pyogenes*, le rôle de SpeB dans l'échappement au système immunitaire a été décrit dans plusieurs études. Cette protéase a la capacité de cliver le précurseur de l'interleukine 1β pour produire une forme active capable d'induire l'inflammation (154). La protéase SpeB joue également un rôle dans le clivage ou la dégradation des immunoglobulines IgG, IgA, IgM, IgD et IgE (66), et dans la dégradation partielle ou totale de certaines cytokines menant ainsi à la perte de l'activité antibactérienne du système immunitaire de l'hôte (93). En outre, une autre protéase ancrée à la paroi de la bactérie, la serine protéase SpyCEP, peut également dégrader certaines cytokines (291), ce qui pourrait conduire à l'inhibition de l'activité pro-inflammatoire de ces cytokines lors de la réponse immune contre la bactérie pathogène, favorisant ainsi l'échappement au système immunitaire de l'hôte.

La cystéine protéase SspB de *S. aureus* est capable de cliver un médiateur de la réaction inflammatoire, le kininogène. Le clivage du kininogène permet de libérer la bradykinine, une substance vasodilatatrice qui entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire, ce qui pourrait faciliter la pénétration de la bactérie dans la circulation sanguine et donc sa dissémination (201). Cette protéase est également responsable du clivage de CD11b, une intégrine présente à la surface des monocytes et des neutrophiles, ce qui pourrait se traduire

par une diminution du nombre de phagocytoses fonctionnelles au site d'infection. Tous ces mécanismes facilitent ainsi la dissémination de *S. aureus* (283).

Par ailleurs, des IgA1 protéases capables de dégrader les immunoglobulines IgA sériques et sécrétoires ont été décrites chez plusieurs pathogènes : *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Streptococcus pneumoniae*. Les IgA jouent un rôle prépondérant dans la défense des muqueuses et représentent la première ligne de défense de l'organisme lors de l'arrivée des microorganismes pathogènes au niveau des épithéliums. La dégradation de ces immunoglobulines se traduit par une diminution de la protection des muqueuses, et un échappement de la bactérie au système immunitaire (257).

3.3.3. Productions des nutriments

Les protéases microbiennes peuvent jouer un rôle important *in vivo* en fournissant une source d'énergie aux microorganismes, ce qui favorise leur survie et leur croissance. Les acides aminés et les peptides produits lors de la dégradation protéolytique de protéines de l'hôte sont nécessaires à la survie *in vivo* de différentes bactéries, comme cela a été montré pour *P. gingivalis* (151). *S. aureus* possède plusieurs protéases extracellulaires, pouvant potentiellement produire un grand nombre des peptides nutritionnels. Ainsi, il a été montré que la sérine protéase SspA et la métalloprotéase Aur sont capables de dégrader la caséine *in vitro* (158). Chez *Lactococcus lactis*, une bactérie lactique dépendante de l'utilisation de protéines du lait comme les caséines, la présence d'une sérine protéase extracellulaire (PrtP) capable de les dégrader en plusieurs peptides a été décrite. Ces peptides générés pourraient fournir aux bactéries tous les acides aminés nécessaires à leur croissance (148).

Les protéases bactériennes jouent également un rôle dans la maturation et l'activation des protéines bactériennes impliquées dans la virulence. Ce rôle sera décrit dans le chapitre qui suit et des exemples seront présentés en section 3.4.3.

3.4. Maturation et activation des protéines bactériennes

Les protéases bactériennes peuvent être également impliquées dans la maturation et l'activation d'autres protéines bactériennes jouant un rôle dans le processus de virulence, ainsi que dans leur propre processus de maturation. Elles sont produites sous forme de précurseurs inactifs et activés ensuite par un ou plusieurs clivages protéolytiques finement régulés.

3.4.1. Régulation de l'activité des protéases et du processus protéolytique

Les protéases sont des enzymes qui représentent un danger potentiel pour les cellules si elles ne sont pas contrôlées. L'absence de régulation de l'activité protéolytique peut provoquer une protéolyse désordonnée pouvant être désastreuse pour la cellule. Les deux mécanismes connus de la protection des cellules sont : (i) la synthèse des protéases sous forme de précurseurs inactifs appelés zymogènes ou pro-enzymes, qui sont ensuite activés par clivage protéolytique et (ii) l'inactivation des protéases par des inhibiteurs de protéases (250, 314). Dans le premier mécanisme, les protéases ne deviennent actives qu'après coupure spécifique d'une ou de plusieurs liaisons peptidiques, c'est le processus de maturation des protéases. Les protéases peuvent être transformées en leur forme active, soit par d'autres enzymes, soit par elles mêmes, on parle dans ce dernier cas d'automaturation. L'activation des zymogènes par des protéolyses spécifiques est un processus irréversible.

3.4.1.1. L'exemple de *Streptococcus pyogenes*

Certains microorganismes pathogènes ont développé des stratégies afin d'éviter de subir des dommages accidentels pendant les processus protéolytiques, d'une part, et de réguler les protéases de l'hôte pouvant agir contre eux, d'autre part. Nous allons traiter la régulation complexe des processus protéolytiques qui ont lieu à la surface de *S. pyogenes* lors d'une infection. En effet, cette bactérie possède une forte activité protéolytique à sa surface du fait de l'activation de plusieurs protéines bactériennes de surface (protéases et autres) et du recrutement des protéines de l'hôte.

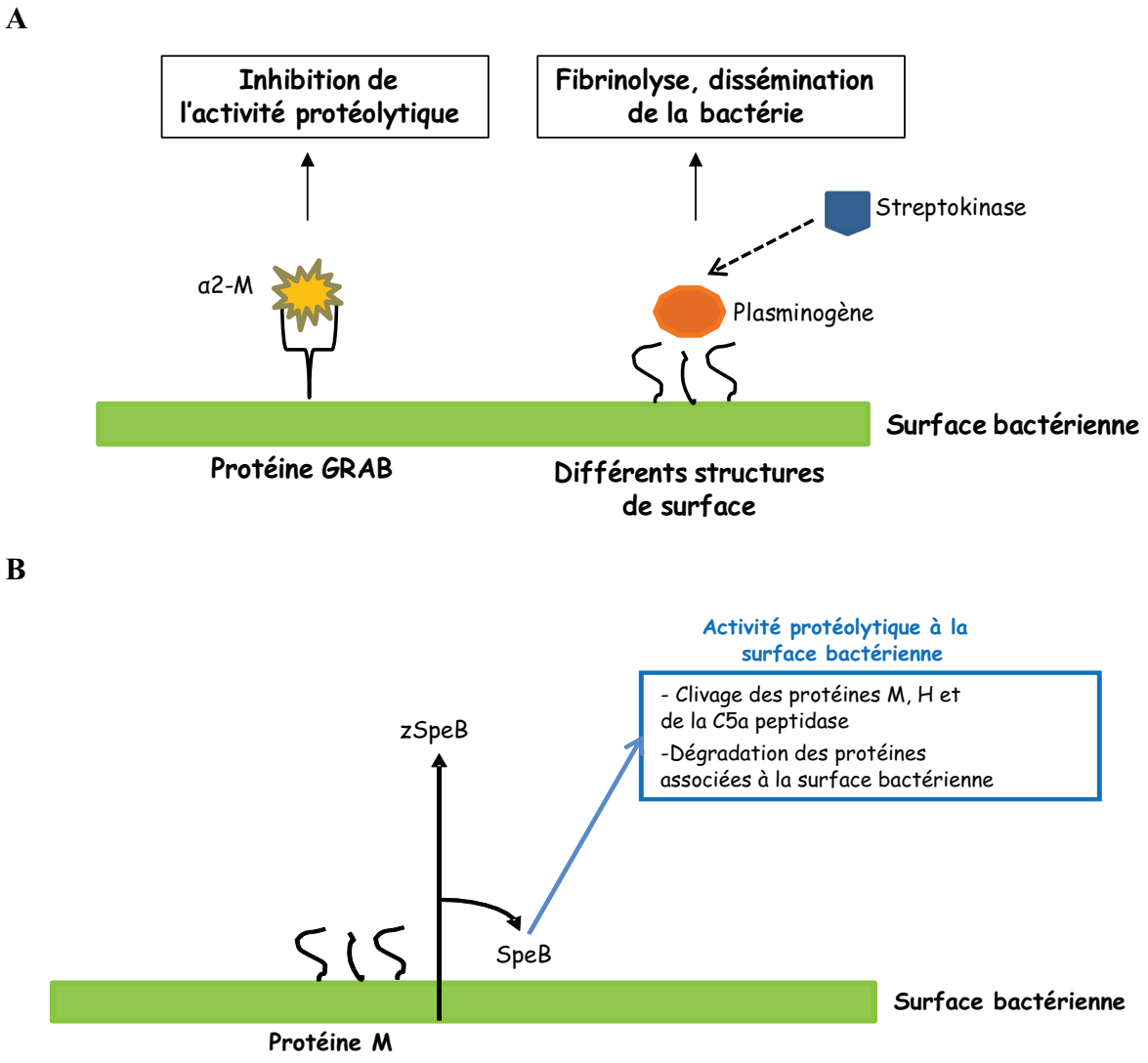


Figure 13. Modèle de régulation des processus protéolytiques à la surface de *Streptococcus pyogenes*. (A) Lors de la première partie de l'infection, *S. pyogenes* inhiberait la protéolyse par l'hôte en se liant à des inhibiteurs de protéase de l'hôte, tel l'α2-macroglobuline (α2-M). La protéine bactérienne responsable de cette liaison est GRAB (Protein G-related α-2M binding protein). Dans cette étape, le plasminogène peut également se lier à la surface bactérienne sur différentes structures de surface, y compris les protéines M, et être activé par la streptokinase. Le complexe plasminogène/streptokinase n'étant pas inhibé par l'inhibiteur physiologique (α2-antiplasmine), la dissémination de la bactérie à travers la matrice extracellulaire, les membranes basales et les cellules endothéliales est facilitée. **(B)** Dans une deuxième étape de l'infection, la bactérie produit des protéases et leur libération permettrait la dégradation des tissus humains, facilitant ainsi l'invasion par la bactérie. SpeB ne serait correctement repliée et maturée qu'après contact avec les protéines M. D'après Rasmussen & Bjorck (250).

S. pyogenes recrute différentes protéines de l'hôte comme le plasminogène qui peut être clivé en sa forme active soit par les activateurs physiologiques (tPA/uPA) soit par la streptokinase, une protéase de la bactérie. Le complexe plasminogène/streptokinase formé n'est pas inhibé par l'inhibiteur physiologique, l'α2-antiplasmine, et la fibrinolyse dérégulée qui en résulte facilite ainsi la dissémination de la bactérie à travers la matrice extracellulaire, les membranes basales et les cellules endothéliales. Par ailleurs, des inhibiteurs de protéases présentes chez l'hôte vont être utilisés par *S. pyogenes* pour faciliter la colonisation. La bactérie va fixer à sa surface l'inhibiteur de protéases α2-macroglobuline (α2-M), inhibant l'activité protéolytique de l'hôte contre la bactérie et protégeant ainsi les protéines bactériennes de surface (250).

En plus de réguler les processus protéolytiques de l'hôte en sa faveur, la bactérie contrôle l'activation de ses propres protéases. Ainsi, la cystéine protéase SpeB présente à la surface de la bactérie ne serait correctement repliée et maturée qu'après contact avec les protéines M localisées à la surface de la bactérie. Le rôle de la maturation et l'activation des protéines impliquées dans la virulence sera traité plus en détail en section 3.4.3. Dans la figure 13, nous illustrons un modèle proposé par Rasmussen & Bjorck lors de l'infection de *S. pyogenes*.

3.4.2. Processus de maturation des protéases

D'une manière générale, les protéases sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs constitués en général d'un peptide signal, d'un pro-peptide, d'un domaine catalytique et, pour les protéases de surface, d'un domaine permettant leur ancrage à la paroi bactérienne (314). Après clivage du peptide signal, l'enzyme traverse la membrane cytoplasmique, puis le clivage du pro-peptide donne naissance à la forme mature et active de la protéase. Le pro-peptide est localisé en aval du peptide signal et maintient la protéase sous une forme inactive. Il est nécessaire pour le repliement correct de la protéase sous sa forme mature et joue également un rôle dans la sécrétion de la protéase (40, 59). C'est un fragment très important pendant le processus de maturation des protéases.

La maturation d'un précurseur inactif peut avoir lieu, soit au cours d'une étape unique d'activation, soit au cours d'une cascade de clivages successifs impliquant des formes intermédiaires et menant à la forme active. Pendant ce processus, d'autres protéases (sous forme mature) peuvent intervenir, mais une auto-activation peut également se produire ; ce

processus autocatalytique pourrait être induit par des changements de pH et/ou de température. Ainsi, chez *S. aureus*, le zymogène de la sérine protéase zSspA est soumis à une maturation complexe associant un clivage par une métalloprotéase (aureolysine) à un processus autocatalytique libérant ainsi la forme mature de SspA (222). La forme mature de SspA joue à son tour un rôle dans la maturation de la cystéine protéase SspB, en clivant son pro-peptide, cette dernière n'étant pas capable de s'automaturer (201).

Le processus d'automaturation peut avoir lieu par un mécanisme en *cis* ou en *trans*, voire associant les deux. Chez *S. pyogenes*, il a été montré que la cystéine protéase SpeB est soumise à un processus autocatalytique qui implique les deux types de mécanisme. Ainsi, le zymogène zSpeB immobilisé sur une résine de sépharose est capable de libérer la forme mature, ce qui traduit un mécanisme en *cis*. Toutefois un rôle de la forme mature dans le processus de maturation du zymogène par un mécanisme en *trans* a été décrit, et il serait vraisemblablement important *in vivo* (61, 86).

Chez *P. gingivalis*, la cystéine protéase RGP subit un processus d'automaturation, mais elle est également responsable du clivage du zymogène de KGP (zKGP) une autre cystéine protéase (229).

Par ailleurs, chez *Enterococcus faecalis* un processus protéolytique un peu différent a été décrit, impliquant un clivage du côté C-terminal. Ainsi, le zymogène de la métalloprotéase GelE est clivé dans la partie N-terminale comme la plupart des protéases, mais il doit être aussi clivé dans la partie C-terminale afin de compléter le processus de maturation et rendre la forme mature de la protéase active (75).

3.4.3. Rôle de la maturation de protéines bactériennes dans la virulence

La maturation et l'activation des protéines jouant un rôle dans le processus de virulence peuvent être importantes pour la survie et à la dissémination de microorganismes pathogènes. La cystéine protéase SpeB de *S. pyogenes* peut cliver les protéines de surface bactérienne M, H et la C5a peptidase, entrainant la libération des formes fonctionnelles de ces protéines, dont certaines constituent des facteurs majeurs de virulence (Figure 13) (30).

Cystéine protéase	Bactérie pathogène	Clan	Mécanisme catalytique	Rôle dans la virulence
SpeB	*Streptococcus pyogenes*	CA	➢ Le zymogène de SpeB (zSpeB) est soumis à un processus autoprotéolytique, impliquant un mécanisme en *cis*. ➢ zSpeB est également maturée par sa forme mature, impliquant ainsi un mécanisme en *trans*	➢ Clive le fibrinogène, la fibronectine et dégrade la vitronectine ➢ Activation d'une métalloprotéase chez l'hôte, entrainant une augmentation de la dégradation de collagène de type IV ➢ Clive ou dégrade certaines cytokines : le précurseur de l'IL-1β, et les immunoglobulines IgG, IgA, IgM, IgD et IgE
SspB	*Staphylococcus aureus*	CA	➢ Le zymogène de SspB (zSspB) est clivé par la sérine protéase SspA, localisée dans le même opéron ➢ Pas de processus autoprotéolytique	➢ Clive la fibronectine et le fibrinogène ➢ Clive un médiateur de la réaction inflammatoire : le kininogène, libérant ainsi la bradykinine, un puissant vasodilatateur ➢ Clive l'integrine CD11b, altérant la phagocytose
RGP **KGP**	*Porphyromonas gingivalis*	CD	➢ Le zymogène de la protéase RGP (zRGP) est capable de se maturer et s'activer par un processus autoprotéolytique ➢ Le zymogène de KGP (zKGP) est clivé par la protéase mature RGP	➢ Dégradation des collagène de type I et IV, de la fibronectine et la laminine ➢ Dégradation des immunoglobulines : IgG, IgA et IgA sécrétoire ; des cytokines : IL-6 et TNF-α; et des α- et β-défensines ➢ Dysrégulation du système du complément (dégradation de C3)

Tableau 2. Principales cystéine protéases bactériennes et leurs propriétés.

Chez *P. gingivalis*, la cystéine protéase RGP est responsable de la maturation de diverses protéines de la surface bactérienne. Elle participe notamment à la maturation du précurseur de la prefimbriline, un composant majeur des fimbriae qui jouent un rôle important dans l'interaction initiale entre la bactérie et l'hôte. Elle joue également un rôle dans la maturation de la sous-unité mineure des fimbriae, une protéine hautement immunogène localisée à la surface de la bactérie (152). Un rôle dans la maturation des protéines de surface a été aussi mis en évidence pour une autre cystéine protéase : KGP. Elle est capable de cliver le coté C-terminal du récepteur de l'hémoglobine (229).

Les protéases de *S. aureus* peuvent avoir une activité sur d'autres protéines sécrétées par la bactérie. Ainsi, la sérine protéase SspA est capable de cliver la protéine de liaison à la fibronectine et la protéine A, toutes deux présentes à la surface (158). Un rôle pour la métalloprotéase Aur dans le clivage d'une protéine de liaison au fibrinogène (ClfB) a été mis en évidence. Le rôle biologique de ce clivage n'est pas élucidé mais il est retrouvé dans la plupart des isolats cliniques (204). Le clivage des protéines de surface pourrait favoriser le détachement des bactéries au niveau des tissus colonisés, facilitant ainsi la dissémination de la bactérie chez l'hôte.

Par ailleurs, un rôle des protéases dans la germination de spores a été démontré chez *Clostridium perfringens* S40. La sérine protéase GSP (Germination-specific protease) est capable de cliver la forme inactive de proSlec (spore cortex lytic enzyme), une protéine synthétisée au stade précoce de la sporulation, générant ainsi la forme active Slec nécessaire à l'initiation de la dégradation du cortex pendant la germination des spores (197, 305).

Dans le tableau 2, nous résumons plusieurs exemples de cystéine protéases bactériennes traitées dans ce chapitre avec leur rôle dans la virulence, et leur mécanisme de maturation.

3.5. Facteurs protéolytiques chez *C. difficile*

Le rôle des enzymes hydrolytiques dans la virulence a été mis en évidence, d'une manière générale, chez les microorganismes anaérobies. En effet, les Clostridies possèdent de

nombreuses enzymes hydrolytiques : enzymes dégradant les polysaccharides (amylase, cellulase, sialidase, hyaluronidase), protéases (collagénase, gélatinase), enzymes dégradant les lipides (lipases et phospholipases) et nucléases (203).

Chez *C. difficile*, des enzymes hydrolytiques et protéolytiques ayant un rôle potentiel dans le processus de virulence ont été décrites (243, 274). *C. difficile* synthétise au moins une hyaluronidase, une chondroitine-4-sulfatase, une gélatinase, une collagénase ainsi qu'une héparinase (243, 275). Par ailleurs, il pourrait exister une relation entre l'activité protéolytique et la virulence. En effet une étude ancienne a corrélé la virulence des souches de *C. difficile* à la production des enzymes hydrolytiques (274, 275).

Il existe au sein du génome de *C. difficile* deux cystéines protéases : Cwp84 (CD2787) et Cwp13 (CD1751) situés à distance (1200 kb) du locus *cwp*. La protéase Cwp84 a été la première protéase étudiée et mon travail de thèse a porté en partie sur la poursuite de sa caractérisation.

3.5.1. La cystéine protéase : Cwp84

La protéase Cwp84 appartient à la famille CA1 des cystéine protéases et est codée par le gène *cwp84*. Elle présente la structure en trois domaines classiques des Cwps : un peptide signal, un domaine N-terminal qui présente de fortes homologies avec plusieurs cystéine protéases et un domaine C-terminal d'ancrage potentiel à la paroi possédant trois motifs Pfam 04122 (138, 139). Le domaine N-terminal possède la triade catalytique Cys-116, His-262 et Asn-287 (270). Le gène *cwp84*, hautement conservé au sein de l'espèce (182), est transcrit de manière importante en début de phase exponentielle de croissance (270).

La présence d'anticorps anti-Cwp84 dans des sera de patients atteints d'ICD témoigne de l'expression de cette protéase au cours de l'infection (237). Par ailleurs, les niveaux d'anticorps dirigés contre Cwp84 sont significativement plus élevés dans le groupe contrôle de patients sans antécédents d'ICD, par comparaison avec le groupe de patients atteints d'une infection liée à *C. difficile*, ce qui suggère un rôle protecteur de ces anticorps par rapport à la survenue de l'infection (237).

3.5.1.1. Localisation et maturation

Dans la première étude publiée, la protéase Cwp84 est retrouvée majoritairement associée aux protéines de la couche S, sous une forme d'environ 85 kDa. La protéase purifiée (sans peptide signal) sous forme recombinante His-tag présentait un profil particulier en gel SDS-PAGE, suggérant un processus auto-protéolytique aboutissant à la formation d'une forme clivée, de poids moléculaire estimé alors à 61 kDa (139).

3.5.1.2. Rôle

In vitro, la protéase Cwp84 est capable de dégrader certaines protéines de la matrice extracellulaire de l'hôte, telles que la fibronectine, la laminine et la vitronectine, ce qui pourrait contribuer *in vivo* à la dissémination de l'infection (139). Le rôle de cette protéase dans la maturation de protéines de la couche S a été mis en évidence en utilisant un mutant par insertion obtenu grâce à la technique du Clostron. En effet, quand les protéines de la couche S sont extraites à partir de la souche mutante, une seule bande correspondant au précurseur SlpA est observée, montrant ainsi que la protéase est responsable du clivage de ce précurseur (165). De plus, l'inactivation de c*wp8*4 conduit à une modification de la croissance de *C. difficile in vitro*, indiquant que le renouvellement des protéines de la couche S est important pour la bactérie. Cette altération dans la structure de la couche S se traduit par une localisation anormale de certaines protéines Cwps, ainsi Cwp66 et Cwp2 se trouvent sécrétées dans le milieu extracellulaire (73). Cwp84 pourrait également avoir un rôle dans la maturation d'autres protéines de la surface bactérienne. Cependant, dans le modèle animal du hamster, le mutant *cwp84* produit une maladie semblable à celle de la souche sauvage (165). Ce résultat pourrait être lié à la présence de protéases chez le hamster, capables de cliver le précurseur SlpA, mais la présence d'une couche S structurée n'est peut-être pas indispensable à l'établissement de l'infection chez le hamster.

3.5.2. La cystéine protéase : Cwp13

La protéase Cwp13 présente une forte identité de séquence protéique (63,2%) avec Cwp84. Elle appartient également à la famille CA1 de cystéines protéases contenant la triade catalytique Cys-His-Asn et possède une structure en trois domaines. Après le clivage du

peptide signal, Cwp13 est clivée par un processus autocatalytique. Cwp13 est localisée à la surface de la bactérie et possède une faible activité dans le clivage de protéines de la couche S. Récemment, il a été montré qu'elle joue un rôle dans le processus de maturation de Cwp84 (73).

4. Régulation de la production des facteurs de virulence

Pendant le processus de colonisation de l'hôte, les microorganismes pathogènes peuvent être confrontés à différents types de stress, comme la diminution de la disponibilité en nutriments, les modifications de pH (par exemple l'acidité gastrique), la forte osmolarité et la basse pression en oxygène de l'intestin et des tissus. Ils doivent donc être capables de survivre et de se multiplier en s'adaptant à ces stress, et différentes stratégies convergentes existent.

D'une part, les microorganismes sont capables d'exprimer des protéines dites "de stress", les protéines chaperonnes et chaperonines, exprimées constitutivement mais dont la synthèse est augmentée à la suite d'un stress. Ces protéines permettent de protéger les microorganismes en intervenant dans le repliement de protéines endommagées ou en dégradant les protéines irréversiblement endommagées (118).

D'autre part, les microorganismes pathogènes ont développé des systèmes de détection et de transduction des signaux, afin de pouvoir s'adapter rapidement aux changements environnementaux, tels que le passage chez l'hôte. Ces mécanismes sont souvent à l'origine de la régulation de la production des facteurs de virulence, mais également du métabolisme bactérien. Ils impliquent en général un contrôle au niveau de la transcription. La régulation transcriptionnelle joue ainsi un rôle crucial dans les processus adaptatifs des bactéries (207).

4.1. Systèmes de détection et de transduction du signal

Deux principaux mécanismes de régulation des gènes permettent aux bactéries de capter les modifications de l'environnement : les systèmes à deux composants et le « quorum-sensing ». Ces systèmes sont relayés dans les cellules bactériennes par des protéines effectrices, généralement des protéines de liaison à l'ADN agissant la plupart du temps au niveau transcriptionnel.

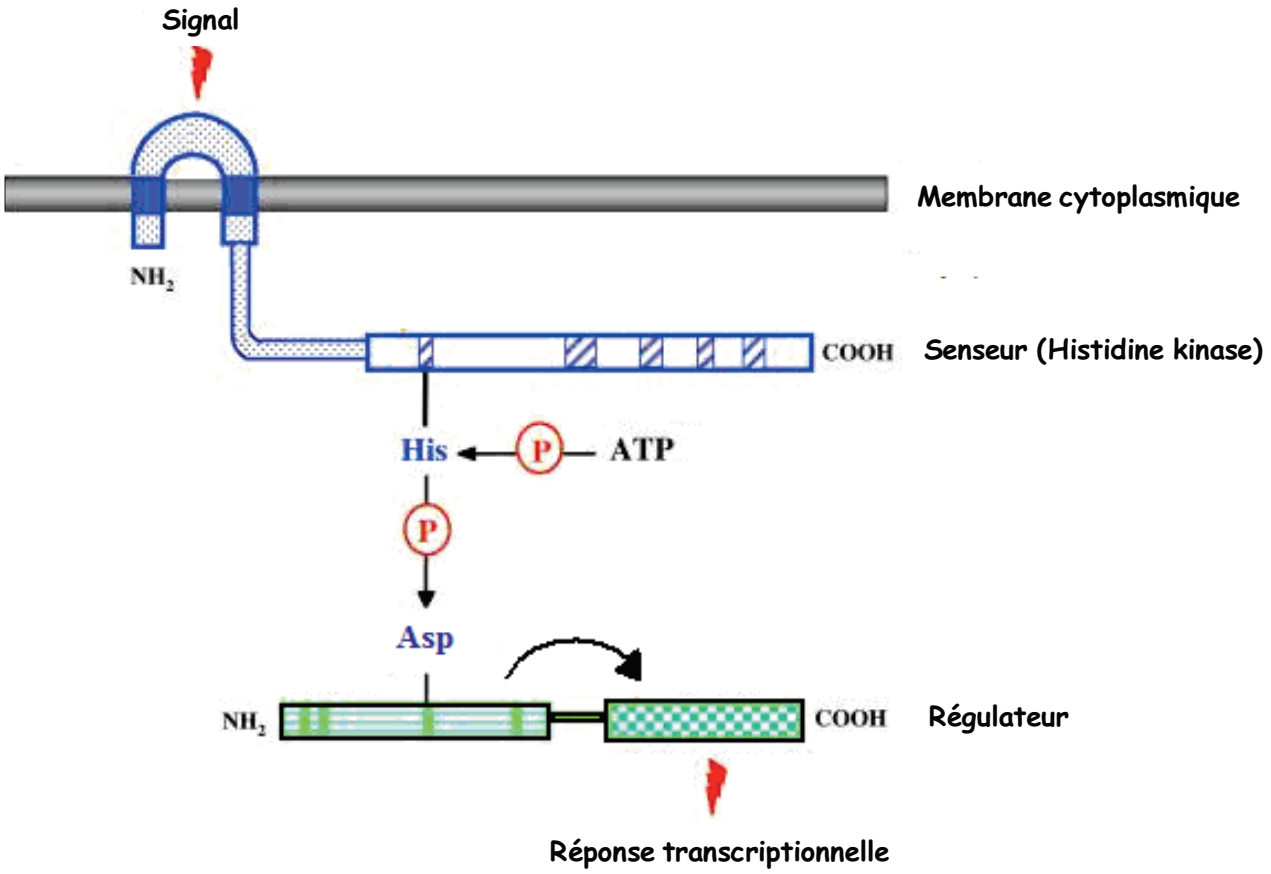


Figure 14. Représentation schématique d'un système à deux composants. Le signal est perçu par le senseur, une histidine kinase localisée dans la membrane cytoplasmique, entrainant ainsi son autophosphorylation sur un résidu histidine, à partir d'un ATP. Ensuite, il a y un transfert de phosphate sur l'élément régulateur, au niveau d'un acide aspartique. Finalement, l'élément régulateur change de conformation et initie une réponse transcriptionnelle spécifique du signal de départ. D'après Depardieu *et al.* (79).

4.1.1. Les systèmes à deux composants

Ces systèmes de détection et de transduction des signaux sont impliqués dans une grande variété de réponses régulatrices, comme par exemple la détection de l'entrée chez l'hôte. Ils se caractérisent par la présence de deux protéines qui communiquent par des transferts de phosphate, assurant ainsi la transduction du signal (28).

En réponse à un signal perçu, l'histidine kinase appelée « senseur » s'autophosphoryle à partir d'un ATP (adénosine triphosphate), sur un résidu histidine. Ensuite, l'élément régulateur est phosphorylé sur « le domaine receveur » au niveau d'un résidu d'acide aspartique par transfert du phosphate à partir du senseur ; cette phosphorylation induit un changement de conformation, qui altère les propriétés de liaison du régulateur à l'ADN. Enfin, l'élément régulateur entraîne une réponse transcriptionnelle adaptée au signal de départ, en se liant sur des séquences d'ADN spécifiques (28, 319), qui se traduit par la modification de l'expression de certains gènes (Figure 14) (79).

Plus de 4 000 systèmes à deux composants ont été identifiés dans les génomes séquencés de 145 espèces bactériennes, ce qui montre l'importance de ces systèmes dans l'adaptation des bactéries à leur environnement. En effet, un nombre plus important de ces systèmes a été trouvé chez des bactéries soumises à des changements d'environnement, par rapport aux bactéries vivant dans un environnement unique (28). Ainsi, chez *P. aeruginosa* 63 et 64 gènes codant respectivement une histidine kinase et un régulateur ont été recensés (209). Chez *S. aureus*, différents systèmes à deux composants ont été caractérisés, le système *agr* (accessory gene regulator) étant le plus étudié. Le système *agr* contient 4 gènes : *agrB*, *agrD*, *agrC* et *agrA*. Il est composé d'un système quorum sensing (AgrB et AgrD), agissant sur un système à deux composants (AgrA et AgrC). Ce système régule de nombreux gènes codant des facteurs de virulence, y compris des protéases dont la transcription est régulée positivement. Le système *agr* est présenté en détail dans la figure 15 (302).

4.1.2. Le quorum-sensing

Le quorum-sensing est un système de régulation basé sur la capacité des bactéries à communiquer entre elles, ce qui leur permet de coordonner leur comportement. Ce mécanisme permet aux bactéries de réguler la pathogénicité et de s'adapter à différents

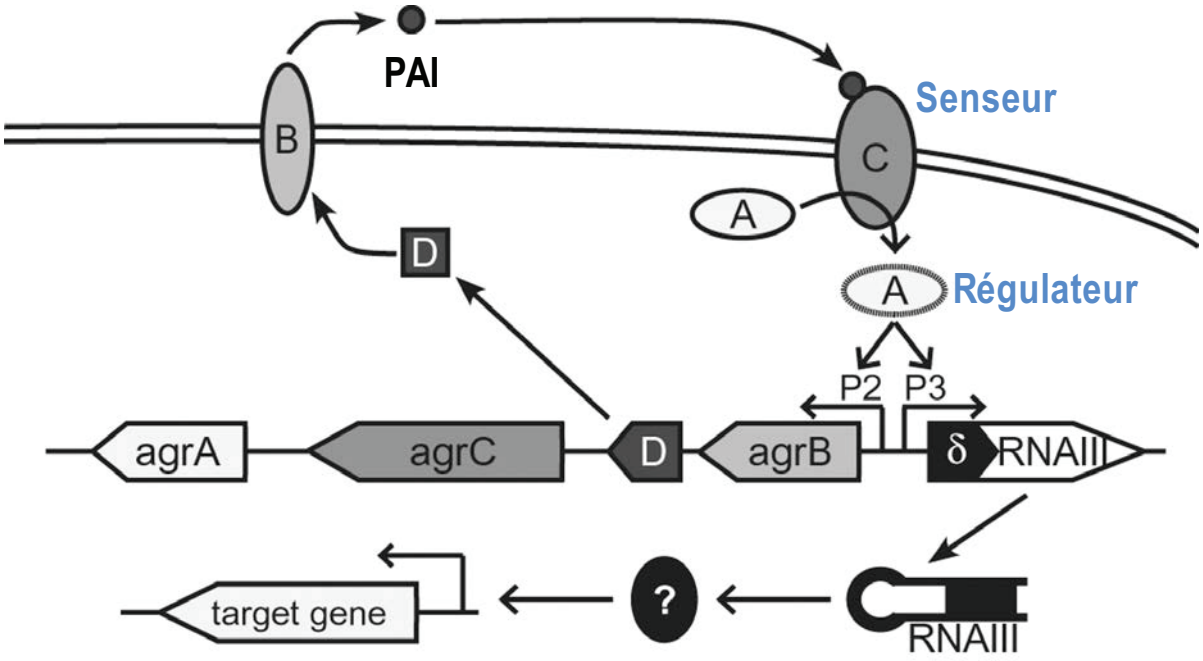


Figure 15. Système *agr* chez *Staphylococcus aureus*. Le locus *agr* est composé de deux unités de transcription différentes, ARNII et ARNIII, transcrits respectivement à partir de deux promoteurs P2 et P3. L'opéron P2 contient 4 gènes : *agrB*, *agrD*, *agrC* et *agrA*, codant pour un système à deux composants (AgrC étant le senseur et AgrA le régulateur) ainsi que pour les protéines AgrB et AgrD, responsables de la sécrétion d'un peptide auto-inductible (PAI), substrat du senseur AgrC. L'opéron P3 code pour la molécule effectrice du système *agr*, ARNIII, qui régule de manière positive ou négative la transcription de nombreux gènes cibles. Lorsque le peptide PAI est sécrété, il va se lier sur le senseur AgrC, induisant l'autophosphorylation de celui-ci, suivi d'un phosphotransfert sur le régulateur AgrA, et donc son activation. Le régulateur AgrA va se fixer sur son propre promoteur P2 et sur le promoteur P3, augmentant leur transcription. D'après Traber *et al.* (302).

environnements. Dans ce système, la communication bactérienne repose sur la production de petites molécules auto-inductibles appelées N-acyl-homosérine lactones (AHL), qui donnent une indication de la densité bactérienne dans un environnement donné. La concentration de ces molécules AHL augmente dans le milieu extérieur proportionnellement à la densité des bactéries. Ces molécules sont synthétisées par une AHL synthétase codée par un gène inductible ; lorsque la concentration de ces molécules atteint un certain seuil, elles se lient à une protéine, localisée à la surface des bactéries. La formation de ce complexe va activer indirectement la transcription de gènes de virulence mais aussi du gène inductible, d'où le nom de molécules auto-inductrices, résultant ainsi en la production coordonnée des facteurs de virulence (254). Chez certaines bactéries pathogènes, le quorum-sensing amplifie et coordonne l'expression de gènes de virulence par activation de leur transcription. Le système de quorum-sensing peut également interagir avec les systèmes à deux composants qui régulent la transcription de gènes, par exemple, le système *agr* chez *S. aureus* (Figure 15).

L'adaptation d'une bactérie à un environnement changeant est donc sous la dépendance de réseaux de régulation complexes, impliquant des systèmes à deux composants et/ou des systèmes de quorum-sensing, pour la "capture" du signal. Les modifications transcriptionnelles qui en résultent sont liées à la production de régulateurs transcriptionnels, souvent des protéines de liaison à l'ADN comme CcpA, CodY et SigH, dont nous parlerons en section 4.2.3 et 4.3.1. Ces différents mécanismes de régulation vont permettre à la bactérie une adaptation fine en fonction des conditions environnementales.

4.2. Régulation liée aux facteurs environnementaux

4.2.1. La température

La transition d'une température ambiante basse à la température corporelle plus élevée a été corrélée à des changements dans l'expression de facteurs de virulence chez de nombreuses bactéries. Des thermo-senseurs responsables de la perception des températures ont été identifiés ; il s'agit de thermomètres biologiques composés d'ADN, d'ARN ou de protéines, qui fonctionnent en modifiant leur structure en réponse à un changement de température. Ainsi par exemple, un thermomètre composé d'ADN localisé au sein d'un promoteur est

capable de modifier sa structure lorsqu'il est soumis à un changement de température ; cela se traduit par une modification de la liaison des protéines régulatrices, qui résulte en une réponse transcriptionnelle dépendante de la température (167).

Chez *Listeria monocytogenes*, l'expression de *prfA*, qui code le régulateur transcriptionnel des gènes de virulence majeurs PrfA, est influencée par la température : à des températures inferieures à 30°C, le gène est faiblement exprimé, alors qu'à la température de l'hôte (37°C) l'expression est forte. De nombreux gènes PrfA-dépendants, tel le gène *hly* codant la listeriolysine O, sont ainsi influencés par la température (71, 181). Un thermomètre biologique (GmaR) capable de modifier la mobilité et la virulence de *L. monocytogenes* a été décrit récemment. La transcription température-dépendante des flagelles dépend de MogR (répresseur) et GmaR (anti-répresseur). À 37°C, le répresseur MogR se lie aux promoteurs flagellaires, empêchant ainsi leur transcription. À des températures inférieures, l'anti-répresseur GmaR est soumis à des changements structuraux et va former un complexe avec MogR, empêchant alors l'activité répressive de celui-ci et permettant la transcription de flagelles. En conséquence, la bactérie est flagellée et mobile à température ambiante (22-28°C), mais elle est non flagellée et non mobile à la température physiologique de l'hôte (37°C). Les flagelles étant reconnus comme un signal d'infection pour l'hôte, leur absence faciliterait l'échappement au système immunitaire de l'hôte, alors que leur activation à température ambiante favoriserait la colonisation d'autres surfaces (153).

4.2.2. Le fer

Le fer est un nutriment essentiel pour la multiplication bactérienne car il intervient dans des nombreux processus cellulaires vitaux pour la bactérie. Chez l'hôte, le fer se trouve habituellement sous forme oxydée (Fe^{3+}) précipitée et donc inaccessible, ou majoritairement liée à d'autres protéines comme la lactoferrine, la transferrine, la ferritine ou dans des hémoprotéines. La quantité de fer libre étant très faible dans la plupart des environnements, les bactéries ont développé plusieurs systèmes d'acquisition du fer, les deux principaux étant d'une part, la présence en surface de protéines capables de lier le fer, et d'autre part, la sécrétion de sidérophores capables de capter et de stocker le fer. Ces différentes protéines présentent une affinité pour le fer supérieure aux protéines cellulaires et sont donc capables de

déplacer l'équilibre de fixation du fer en leur faveur. La capacité d'acquérir le fer lors d'une infection est l'une des plus importantes réponses adaptatives des bactéries (187, 272).

Cependant, ces systèmes d'acquisition et de stockage du fer doivent être finement contrôlés, car l'excès de fer peut avoir des effets nocifs pour les organismes. Chez les bactéries à Gram positif à faible pourcentage en GC, la régulation du métabolisme du fer est sous le contrôle du régulateur transcriptionnel Fur (Ferric uptake regulator), qui agit comme un répresseur transcriptionnel de nombreux gènes codant des protéines impliquées dans la capture du fer. Dans un environnement riche en fer, Fur va lier le fer et acquérir une conformation qui augmente fortement son affinité pour sa cible ADN, inhibant alors la transcription des gènes réprimés par Fur. En revanche, dans un environnement pauvre en fer, Fur non lié au fer n'est pas capable de se fixer à l'ADN, ce qui permet la transcription de ces gènes (187).

En plus de la régulation de la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme du fer, le rôle du régulateur Fur dans l'expression de gènes de virulence a été démontré. Chez *Salmonella enterica*, l'une des principales causes d'infections gastro-intestinales, l'expression de l'îlot de pathogénicité SPI1, qui code pour un système de sécrétion de type III (SST3) et d'invasion des cellules épithéliales digestives, est principalement régulée par la protéine Hild. Dans des essais *in vivo*, il a été montré que Fur activait la transcription du gène codant la protéine Hild et donc, indirectement, l'expression des gènes codant les composants de SST3 (298).

4.2.3. Répression catabolique

Les bactéries sont particulièrement sensibles au substrat carboné utilisé. Le métabolisme glucidique est soumis à plusieurs systèmes de régulation complexes, le système de répression catabolique (CCR) étant le mieux étudié jusqu'alors. Il correspond à un ensemble de mécanismes moléculaires contrôlant la hiérarchie d'utilisation des substrats carbonés dans la bactérie. Le glucose, source optimale de carbone et d'énergie, limite en général l'utilisation d'autres sources de carbone secondaires, et l'expression des protéines impliquées dans l'utilisation de ces sources carbonées secondaires est alors inhibée (117).

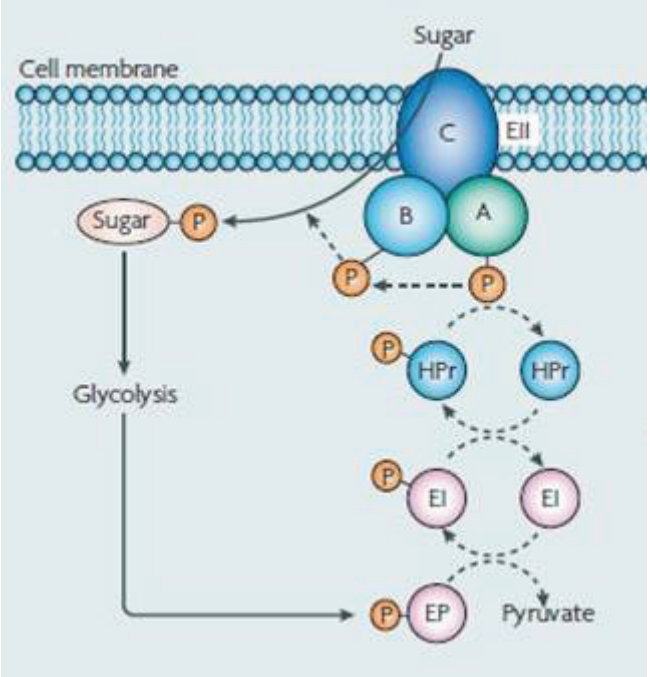


Figure 16. Organisation générale du système PTS. Lors de l'import des sucres-PTS, une cascade de phosphorylation est activée. Un phosphate est transféré du phosphoénolpyruvate (PEP) à l'enzyme I (EI). Ensuite, la protéine HPr est phosphorylée sur son résidu His-15. HPr-P assure la transmission du phosphate au complexe enzymatique spécifique EII (d'abord sur le domaine A puis sur le domaine B), celui-ci permettant finalement la phosphorylation du sucre importé et son entrée directe dans la voie glycolytique. D'après Gorke et *al*. (117).

4.2.3.1. Le système PTS

Le système principal de transport de sucres, appelé système PTS (Phosphoenolpyruvate carbohydrates phosphotransferase system), est très important dans la voie de signalisation-transduction qui mène à la CCR, et le principal système de transport de sucres chez les bactéries. Le système PTS est responsable de la détection de nombreuses sources carbonées telles que le glucose, le cellobiose, le maltose, le fructose ou le mannose qui se trouvent à l'extérieur de la cellule, et que nous appellerons sucres-PTS. Il est composé par différents constituants : le phosphoénolpyruvate (PEP) qui fonctionne comme donneur de phosphate, deux protéines solubles non spécifiques de substrat, l'enzyme I (EI) et l'histidine protéine (HPr) phosphorylée sur son histidine en position 15 et/ou sur le résidu serine en position 46, et les enzymes II (EII) composée de plusieurs protéines ou domaines, enzymes de transport spécifiques de différents sucres. Le système PTS est donc formé d'une partie commune, les protéines cytoplasmiques EI et HPr, et d'une partie spécifique du sucre transporté : l'EII localisée dans la membrane cytoplasmique. Lors de l'import du sucre-PTS, une cascade de phosphorylation réversible est activée (117, 170) (Figure 16).

Chez les Firmicutes, un système de régulation catabolique original impliquant les protéines HPrK/P (kinase /phosphatase), P~Ser-HPr et CcpA (Catabolite control protein A) est présent (Figure 17). La protéine CcpA est un régulateur transcriptionnel, appartenant à la famille des protéines régulatrices LacI/GalR, produite de façon constitutive. La phosphorylation de HPr par la protéine bifonctionnelle HPrK/P sur la Ser46 joue un rôle important dans la répression catabolique. L'activité de HPrK/P est régulée par différents métabolites comme l'ATP et le fructose-1,6-biphosphate (FBP). Ainsi, la phosphorylation de HPr a lieu quand les concentrations intracellulaires d'ATP et de FBP sont élevées. La protéine P~Ser-HPr se lie alors à la protéine CcpA et leur interaction est renforcée par des intermédiaires glycolytiques comme FBP et le glucose-6-phosphate (Glu-6-P). Ce complexe CcpA/P~Ser-HPr est alors capable de se lier aux sites *cre* (catabolite réponse élément) présents sur l'ADN, entrainant la répression ou l'activation de la transcription de gènes cataboliques (117, 300). Le type de régulation dépend de la localisation des séquences *cre* par rapport au promoteur des gènes cibles ; si la séquence *cre* est localisée en amont du promoteur du gène, le complexe aura alors un rôle d'activateur ; si elle est localisée dans le gène, il y aura alors répression de

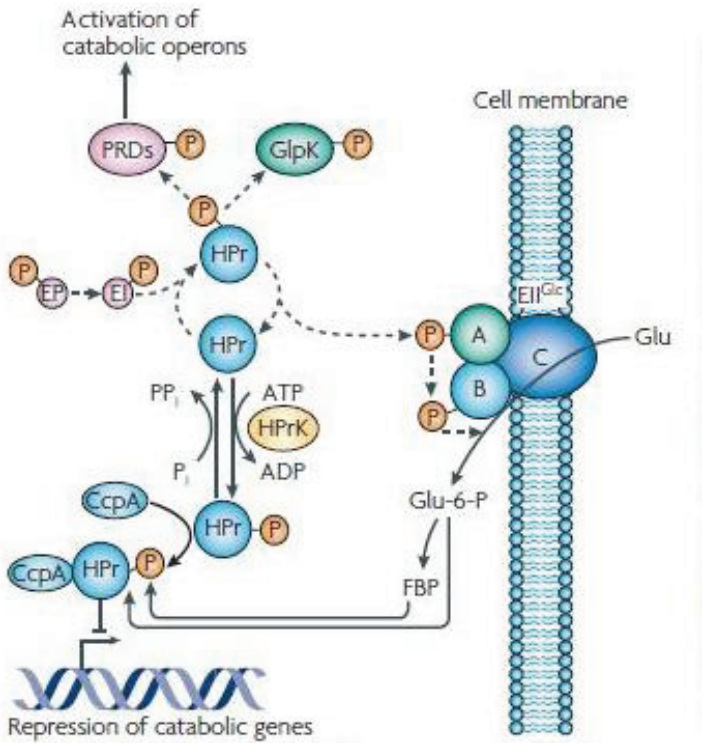


Figure 17. Le système de répression catabolique CCR chez les Firmicutes. La protéine HPr est phosphorylée sur le résidu Ser46 par la protéine bifonctionnelle HPrK/P, lorsque les concentrations intracellulaires d'ATP et du fructose-1,6-biphosphate (FBP) sont élevées. La protéine P~Ser46-HPr se lie à la protéine CcpA et leur interaction est renforcée par des intermédiaires glycolytiques comme FBP et glucose-6-phosphate (Glu-6-P). Le complexe CcpA/ P~Ser46-HPr se lie aux sites c*re* (catabolite réponse élément) sur l'ADN et réprime ou active la transcription des gènes. D'après Gorke et *al*. (117).

l'expression du gène. Le site *cre* étant le plus souvent dans le gène, la régulation est donc généralement répressive (290).

4.2.3.2. Régulation par le glucose

Chez de nombreuses bactéries pathogènes, le transport de sucres-PTS tel que le glucose a une influence sur la régulation de la transcription de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme d'autres sources de carbone, et également sur l'activité de régulateurs transcriptionnels parmi lesquels des régulateurs de gènes de virulence. Ainsi, des éléments de la CCR sont cruciaux pour l'expression de certains gènes impliqués dans la virulence.

Chez *S. pyogènes*, la régulation par le glucose de la transcription de nombreux gènes codant des facteurs de virulence a été mise en évidence par des études transcriptionnelles (164, 279). Ainsi, l'expression de l'opéron *sag* impliqué dans la production de la streptolysine, une enzyme hémolytique, et des gènes de la cytolysine SLO et de la protéase SpeB est fortement réprimée par le glucose. En revanche, la transcription de la protéine GRAB (Protein G-related α-2M binding protein) (voir figure 13) et du super antigène SpeG est favorisée par le glucose (164). La régulation de l'opéron *sag* a lieu par un système CcpA-dépendant (279).

Chez *S. aureus*, la propagation des colonies sur milieu solide est favorisée par la présence du glucose. Ce phénomène semble être lié à la présence du glucose, et non à la diminution du pH liée à son métabolisme : en effet, le maintien du pH constant en présence du glucose n'affecte pas la capacité de la bactérie à diffuser. Cette propagation est contrôlée par un système de répression catabolique, la mutation du gène *ccpA* altérant cette capacité de la bactérie (303). Un environnement riche en sucres, comme le corps humain, pourrait ainsi favoriser la diffusion de la bactérie. Par ailleurs, l'expression du système *agr* est induite par le glucose, et cette induction est diminuée chez un mutant *ccpA* (276). Chez un mutant *agr*, la capacité de *S. aureus* à diffuser en présence de glucose est complètement abolie, suggérant que cette propriété requiert l'expression du régulateur *agr* en présence du glucose, à pH constant (303).

4.2.4. Le pH

De nombreuses bactéries pathogènes à Gram positif modulent l'expression de leurs gènes en réponse à des variations de pH. Ainsi par exemple, *Streptococcus mutans* va survivre et se multiplier à un pH acide en augmentant l'expression d'un certain nombre de gènes qui participent à la protection de la bactérie contre le stress acide (322).

Une ancienne étude avait montré que le système *agr* était inactivé dans un milieu avec glucose (à pH variable) chez *S. aureus*. Cependant, cet effet semblait être plutôt dû à la diminution du pH liée au métabolisme du glucose qu'à la présence intrinsèque du glucose. Ainsi, l'expression de l'opéron *agr* diminue lorsque le pH diminue de 6,5 à 5,5 dans un milieu avec glucose. Néanmoins, la diminution de l'expression d'*agr* dans un milieu acide sans glucose n'avait pas pu être mise en évidence (255). Plus récemment, il a été montré que dans un milieu acide (pH 5,5) sans glucose, d'autres facteurs de virulence, tels *hla* codant l'alpha-toxine et *spa* codant la protéine A, sont aussi régulés ; la diminution de l'expression du système *agr* par un pH acide a été démontrée (317).

Chez *S. pyogenes*, l'adhésion et la formation de biofilms ont été associées à la présence de pili à la surface de la bactérie. L'acidification du milieu, qui résulte du métabolisme du glucose, augmente la capacité de la bactérie à former des biofilms sur des surfaces abiotiques. Ainsi, dans un milieu avec glucose quand le pH initial de 7,5 diminue jusqu'à environ 5,0 après 6 h d'incubation, une augmentation de la formation de biofilms est observée. Cette formation accrue de biofilms à pH acide a été directement associée d'une part à une augmentation de l'expression de gènes codant les composants des pili, et d'autre part à une expression plus importante de leurs régulateurs transcriptionnels (198).
La régulation la synthèse des facteurs de virulence par les facteurs environnementaux est donc un phénomène extrêmement complexe composé de nombreuses réponses adaptatives intriquées.

4.3. Régulation des facteurs de virulence chez *C. difficile*

A l'heure actuelle, un certain nombre d'études ont été réalisées sur la modulation des facteurs de virulence de *C. difficile* en fonction de différentes conditions environnementales, qui

miment la plupart du temps des conditions physiologiques chez l'hôte. Peu de systèmes de régulation de la transcription des gènes de virulence ont été étudiés et les mécanismes ne sont pas encore parfaitement élucidés.

4.3.1. Les systèmes de détection et de transduction du signal chez *C. difficile*

Chez *C. difficile*, le séquençage du génome a permis de mettre en évidence 426 séquences codant des régulateurs transcriptionnels potentiels, dont 45 protéines appartenant à des systèmes à deux composants, ainsi que 5 protéines histidine kinase et 6 protéines régulatrices orphelines (273).

4.3.1.1. Le quorum-sensing

Un système de quorum-sensing a été caractérisé chez *C. difficile*. Il s'agit d'un système de type Lux. Le gène *luxS* est présent dans la plupart des génomes bactériens, et chez certaines bactéries il intervient dans la production d'une molécule de type quorum-sensing auto-inductrice, AI-2. *C. difficile* exprime une molécule auto-inductrice AI-2 codée par le gène $luxS_{Cd}$, transcrit surtout en fin de phase exponentielle de croissance. L'expression de cette molécule AI-2 est régulée négativement par un système à deux composants, RolA/RolB (Rol, repressor of *luxS*) (51). Le rôle de ce système de quorum sensing n'est pas encore bien élucidé, toutefois il semblerait que la molécule auto-inductrice AI-2 régule positivement la transcription des gènes *tcdA*, *tcdB* et *tcdE* (180). Par ailleurs, *C. difficile* semble posséder également des composants d'un autre système de quorum-sensing analogue au système *agr* (AgrB et AgrD) de *S. aureus* (273).

4.3.1.2. Protéines régulatrices de liaison à l'ADN

De nombreuses protéines régulatrices se liant à l'ADN telles CodY, CcpA, Spo0A ont été identifiées, et pour quelques unes caractérisées, chez *C. difficile* (84, 273, 304).

CodY est un régulateur transcriptionnel qui contrôle l'expression d'un certain nombre de gènes en réponse à la disponibilité de nutriments. L'activité de CodY est modulée par le GTP

et les acides aminés dits branchés (BCAAS : branched-chain amino acids), lesquels vont augmenter l'affinité de CodY pour l'ADN. Ainsi, lors d'une diminution en nutriments dans le milieu extracellulaire, les taux de GTP et de BCCAs diminuent, entrainant une diminution de l'activité de CodY. Cette protéine régulatrice est impliquée dans la régulation du métabolisme, de la virulence et de processus cellulaires tels que la mobilité et la sporulation. Une analyse transcriptomique réalisée chez *C. difficile* en phase stationnaire révèle le rôle de CodY dans la régulation de la synthèse de certaines protéines de surface, Cwp23 (CD1803) et Cwp27 (CD0440) (de fonctions actuellement inconnues), ainsi que sur des gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés et de composants de la membrane, le transport de nutriments, les voies de fermentation. En effet, des mutants inactivés pour le gène *codY* présentent une surexpression de toutes ces protéines, indiquant que *codY* agit comme un répresseur transcriptionnel. Plusieurs gènes codant des protéines à motifs d'acides aminés conservés (EAL et/ou GG-DEF) et surexprimés dans un mutant *codY* ont été identifiés : CD0757, CD1476, CD2385, CD2873, CD2965 et CD3650. Les protéines possédant ces motifs interviennent dans le métabolisme d'un second messager nucléotidique spécifique des bactéries, la diguanosine 3',5'-(cyclic) phosphate cyclique (diGMP cyclique), qui participe au contrôle de fonctions clés comme la mobilité, l'adhésion, la formation de biofilms et l'expression de facteurs de virulence (83).

4.3.1.3. Facteurs sigma

SigH est un facteur sigma alternatif qui joue un rôle dans la transition de phase et la sporulation chez *Bacillus subtilis* ; il a été récemment caractérisé chez *C. difficile*. L'expression de ce facteur commence à augmenter à 6h, pour atteindre un plateau entre 8 et 10h de croissance. Une analyse du transcriptome effectuée avec un mutant *sigH* en phase stationnaire révèle que SigH régule 476 gène, 190 de manière positive et 286 de manière négative, dont plusieurs gènes codant des protéines impliquées dans la mobilité, la sporulation, la division cellulaire, le catabolisme de protéines ou encore la virulence. Ainsi, les gènes *tcdA*, *tcdB* et *tcdR* sont régulés négativement par SigH, mais le mécanisme sous-tendant cette régulation reste inconnu. Certaines protéines de surface sont aussi régulés par SigH, ainsi Cwp66, Cwp29 (CD2518) et Cwp27 (CD0440) sont contrôlés positivement, tandis que SlpA, CwpV et les protéines flagellaires sont contrôles négativement (269).

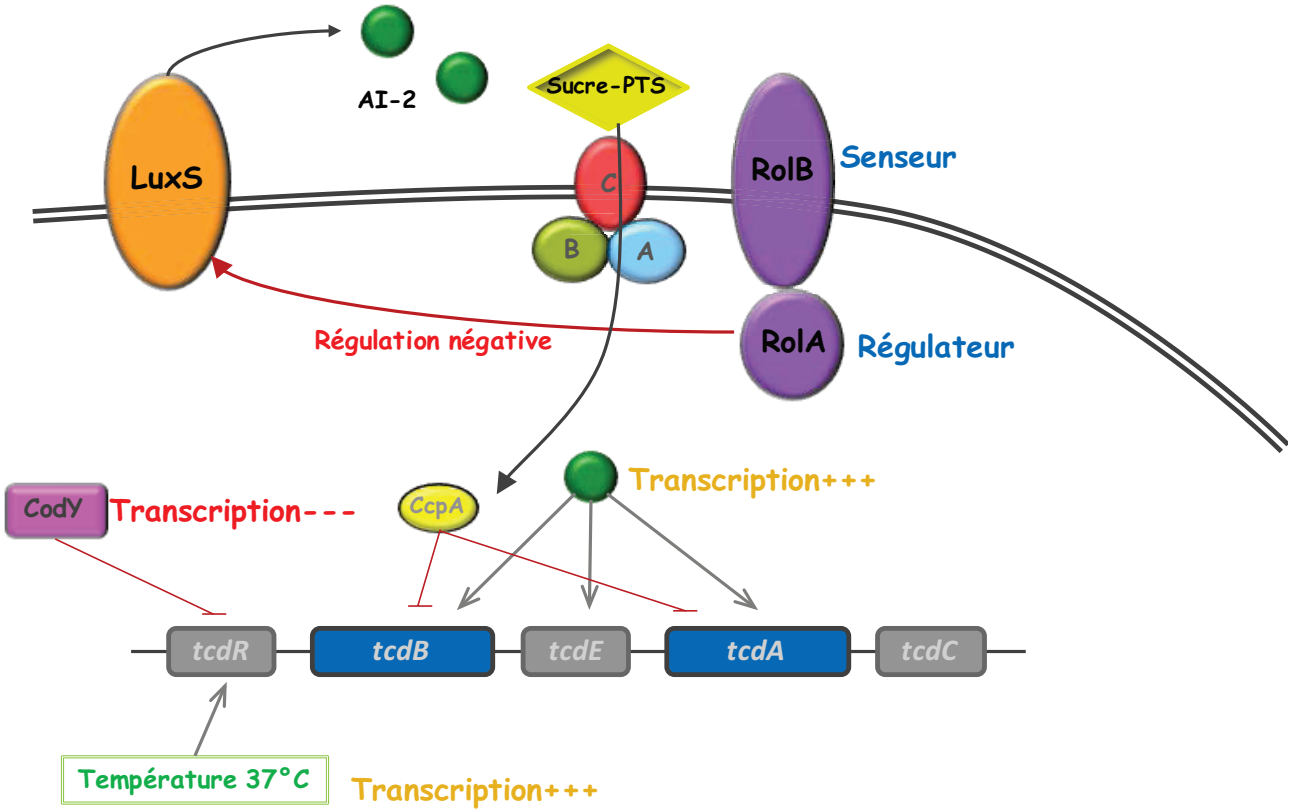


Figure 18 Régulation de la synthèse des toxines. La régulation de la synthèse des toxines par les facteurs environnementaux est très complexe et fait intervenir plusieurs systèmes de régulation. Le système LuxS de type quorum sensing est responsable de la sécrétion d'une molécule auto-inductible, AI-2, surtout en fin de phase exponentielle de croissance. Cette molécule régulerait de manière positive la transcription des gènes *tcdA, tcdB* et *tcdE*. L'expression d'AI-2 est régulée négativement par un système à deux composants, RolA/RolB. En présence de glucose ou d'autres sucres rapidement métabolisables comme le mannitol ou le fructose, la transcription des gènes *tcdA* et *tcdB* est diminuée. Ces régulations par les sucres-PTS semblent être assurées par la protéine régulatrice CcpA qu'interagit directement avec le promoteur du gène *tcdB* et la région 5' du gène *tcdA*. Lors de conditions de pauvreté de nutriments, CodY régulerait négativement les toxines, en interagissant avec le promoteur du gène *tcdR* (régulateur positif de la transcription des toxines). D'après Lee *et al*. (180), Carter *et al*. (51), Dupuy *et al*. (90), Antunes *et al*. (7), Dineen *et al*. (84) et Karlsson *et al* (161).

ABC : Il s'agit des trois constituants de l'enzyme II (EII) qui correspond à une protéine de transport membranaire spécifique de sucres.

4.3.1.4. Systèmes de régulation de la synthèse des toxines

L'étude de la régulation de la production des toxines A et B de *C. difficile* a permis de caractériser des protéines régulatrices de l'expression de leurs gènes. Ainsi, le gène *tcdR*, codant un régulateur positif, fonctionnerait comme un facteur sigma alternatif pour les ARN polymérases, leur permettant de se fixer au promoteur de gènes *tcdA* et *tcdB*, entrainant ainsi leur transcription (199, 200). En revanche, le gène *tcdC* code un régulateur négatif de type anti-facteur sigma : la protéine TcdC est capable d'inactiver et de déstabiliser la formation du complexe ARN polymérase/facteur sigma (*tcdR*), empêchant ainsi la transcription de gènes *tcdA* et *tcdB* (199, 202).

Par ailleurs, le régulateur transcriptionnel CodY régule négativement les toxines, en interagissant avec le promoteur du gène *tcdR*, ce qui aboutit à la diminution de la transcription des gènes *tcdA* et *tcdB* (84). Le quorum-sensing pourrait jouer également un rôle dans la régulation de la synthèse des toxines A et B, via la molécule auto-inductrice AI-2 régulant positivement la transcription des gènes *tcdA*, *tcdB* et *tcdE* (180) (Figure 18).

Récemment, le rôle de la protéine CcpA dans la régulation de la synthèse des toxines de *C. difficile* a été démontré ; en effet, dans un mutant *ccpA*, une dé-répression de la synthèse de toxines A et B en présence de source de carbone PTS rapidement métabolisables comme le glucose a été observé. La protéine CcpA interagit directement avec le promoteur du gène *tcdB* et la région 5' du gène *tcdA* (7) (Figure 18).

4.3.2. Facteurs environnementaux modulant l'expression des facteurs de virulence de *C. difficile*

4.3.2.1. Facteurs influençant l'adhésion

L'étape de colonisation semble être un pré-requis à l'infection par *C. difficile*, et l'adhésion en est une composante majeure. Le niveau d'adhésion des souches non toxinogènes est comparable à celui des souches toxinogènes ; l'adhésion ne semble donc pas être corrélée au niveau de production des toxines. En revanche, l'adhésion de *C. difficile* à des cellules en culture peut être modifiée par toute une série de facteurs environnementaux. Ainsi, des conditions mimant certaines situations physiologiques rencontrées par *C. difficile* dans le tube

digestif comme un choc acide, l'osmolarité élevée, la déplétion en fer, se traduisent par une augmentation de l'adhérence de *C. difficile* aux cellules Vero en culture. En effet, l'incubation préalable de bactéries (après croissance jusqu'en phase stationnaire) dans des tampons à différents pH se traduit par une adhésion plus importante lorsque la bactérie à été incubée à pH 4,0 qu'à pH 7,0, et l'adhésion est minimale après incubation à pH 10,0. Lorsque les bactéries sont incubées en présence d'une forte concentration (500 mM) en sodium ou dans des conditions de carence en fer (induites par l'addition de 200 µM de 2,2′-dipyridyl), l'adhésion est également augmentée. Dans le cas de la faible concentration en fer, l'augmentation des propriétés adhésives pourrait faciliter la colonisation des tissus cibles et ainsi l'acquisition de fer à partir de tissus encore sains (312).

Par ailleurs, un choc thermique à 60°C augmente l'adhésion de *C. difficile* aux cellules Caco-2 et HT29-MTX. Cette modification de l'adhérence pourrait s'expliquer au moins partiellement par la surexpression de la protéine GroEL, une protéine de choc thermique (97, 126). Dans une étude récente, l'expression de cette protéine a été mise en évidence après un choc acide et après un choc thermique (96). Par ailleurs, l'expression de GroEL et d'autres protéines de choc thermique telles GroES (CD0193) et DnaK (CD2461) était induite après un choc thermique à 41°C, alors que l'expression de la protéine FliC était diminuée (135).

En outre, des concentrations subinhibitrices de certains antibiotiques tels que la clindamycine et l'ampicilline augmentent également l'adhésion de *C. difficile* aux cellules en culture. Dans les mêmes conditions, ces antibiotiques augmentent nettement la transcription des gènes *groEL*, *cwp84*, et de manière plus modérée *slpA*, *cwp66* et *fbp68* (76). Une autre étude a également retrouvé une augmentation de la transcription de gènes codant certaines protéines Cwps (Cwp2, Cwp6, Cwp7, Cwp21 et Cwp84) et des protéines flagellaires, en présence de ces antibiotiques (96).

4.3.2.2. Régulation des toxines A et B

La production des toxines A et B est dépendante de la phase de croissance : leur production est faible en phase exponentielle et augmente à partir du début de la phase stationnaire. Comme nous l'avons vu précédemment, la transcription des gènes *tcdA* et *tcdB* est diminuée en présence de glucose ou d'autres sucres-PTS rapidement métabolisables par la bactérie

comme le mannitol ou le fructose (90). La transcription du gène *tcdR* est également réprimée en présence de ces sucres-PTS, ainsi la régulation de la production des toxines A et B par le système de répression catabolique pourrait être dépendante du régulateur *tcdR* (90, 200). Ces régulations par les sucres-PTS semblent être assurées par la protéine régulatrice CcpA (7) (Figure 18).

Par ailleurs, la présence de certaines acides aminés, comme la cystéine, la proline et la biotine, dans le milieu de culture peuvent entraîner une diminution de l'expression de ces toxines (159, 160).

L'expression des toxines est également régulée par la température, grâce à l'action du facteur sigma TcdR sur leurs promoteurs, les toxines sont faiblement exprimées à 22 et 42°C, mais leur expression devient maximale à 37°C, température de l'hôte (161) (Figure 18).

La régulation de la production des toxines est représentée de manière shématique sur la Figure 18.

L'effet des antibiotiques sur l'expression des toxines a fait l'objet de plusieurs études, toutefois, des résultats contradictoires ont été obtenus, en fonction des antibiotiques et des souches testées. Ainsi, des concentrations subinhibitrices de clindamycine se traduisent par une variation de l'effet cytotoxique dans 6 des 56 souches testées (219). Dans une autre étude, des concentrations subinhibitrices de pénicilline et de vancomycine se traduisent par une augmentation de l'activité cytotoxique (16). Une étude s'intéressant à l'expression des gènes codant les toxines a montré que des concentrations subinhibitrices de métronidazole, vancomycine et linézolide augmentent l'expression de gènes *tcdA* et *tcdB* (110).

TRAVAUX PERSONNELS

Objectifs du projet de thèse

Avant que la sécrétion des toxines responsables de l'altération de l'épithélium colique ait lieu, *C. difficile* doit persister dans le tractus digestif, franchir la barrière de mucus et coloniser l'épithélium digestif. Certains facteurs de virulence impliqués dans l'adhésion aux tissus hôtes et plus généralement dans le processus de colonisation ont été identifiés : les deux protéines de la couche S, les adhésines Cwp66 et Fbp68, les protéines flagellaires FliC et FliD (46, 127, 294, 313). Parmi les enzymes hydrolytiques potentiellement impliquées dans cette étape de colonisation, figure la protéase Cwp84, dont la caractérisation a été débutée au laboratoire (139).

L'objectif de ces travaux de thèse était de décrire l'impact de conditions environnementales mimant les conditions physiologiques sur l'expression de facteurs de colonisation et par conséquent leur rôle potentiel dans le processus de colonisation.

Pour répondre à cet objectif, nos travaux de recherche se sont axés autour de deux thématiques principales.

Dans un premier temps, nous avons poursuivi l'étude de la cystéine protéase Cwp84, afin d'élucider son processus d'automaturation en relation avec son activité protéolytique physiologique et son rôle dans la virulence. Nous avons également analysé la régulation de l'expression de la protéase et de sa maturation par le glucose et le pH. Ces travaux ont fait l'objet de deux articles, le premier publié dans "Journal of Bacteriology" et le second qui sera prochainement soumis sous forme d'article court dans "Applied and Environmental Microbiology".

En parallèle de ce travail sur la protéase Cwp84, nous avons démarré une analyse plus globale sur la modulation des protéines de surface par le glucose et/ou le pH, grâce à des approches de protéomique et de transcriptomique, afin d'observer leur influence sur l'expression de certains facteurs de colonisation. En outre, les analyses protéomiques ont permis de mettre en évidence des protéines potentiellement présentes à la surface de *C. difficile*, et dont les homologues ont été associés à un rôle dans la virulence chez d'autres bactéries à Gram positif. Ces résultats seront présentés successivement dans la deuxième partie des travaux personnels « Régulation des facteurs de virulence de *C. difficile* par les facteurs environnementaux » et dans un troisième chapitre « Identification de facteurs de virulence potentiels ».

La cystéine protéase, Cwp84

1. Introduction

La cystéine protéase Cwp84 a été la première protéase caractérisée chez *C. difficile*. *In vitro*, il a été montré que la protéase est capable de dégrader certaines protéines de la matrice extracellulaire (139), ce qui pourrait jouer un rôle dans la dissémination de la bactérie *in vivo*. Plus récemment, le rôle de la protéase dans la maturation de protéines de la couche S (165), et probablement dans la maturation d'autres protéines Cwps, a été mis en évidence (73). Le processus de maturation de cette protéase associée à la surface de la bactérie n'était pas défini au début de mes travaux de thèse, de même que la (les) forme(s) de Cwp84 responsable(s) de la maturation de protéines Cwps et/ou la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire. L'objectif de nos travaux expérimentaux était donc, d'une part, d'analyser le processus de maturation et d'activation de la protéase, et d'autre part, de définir les formes protéolytiques actives. La localisation cellulaire des différentes formes de la protéase a été également étudiée *in vitro*. Au cours de ce premier travail, nous avons constaté que le processus de maturation de Cwp84 pouvait être modulé en fonction des conditions environnementales. Nous avons donc poursuivi par une étude sur l'impact de conditions environnementales (présence de glucose et acidification du milieu) sur la modulation de l'expression de Cwp84 et de son processus de maturation.

2. Article 1

« Localization of the *Clostridium difficile* cysteine protease Cwp84 and insights into its maturation process »

Diana Chapetón Montes, Thomas Candela, Anne Collignon, and Claire Janoir

Journal of Bacteriology, 2011, **193**:5314-5321.

Présentation de l'article

La cystéine protéase Cwp84 joue un rôle majeur dans la maturation du précurseur des protéines de la couche S, SlpA, et pourrait également jouer un rôle *in vivo* dans la dégradation de certaines protéines de la matrice extracellulaire. Afin de mieux comprendre comment elle peut agir sur ces deux types de substrat, son processus de maturation et sa localisation ont été étudiés. Nous avons travaillé à la fois sur les différentes formes recombinantes de la protéase ainsi que sur la localisation de ces différentes formes dans la bactérie.

Nous avons montré que le processus de maturation de la protéase recombinante purifiée sans peptide signal sous forme de protéine de fusion His-tag, $Cwp84_{30-803}$, a lieu selon un processus séquentiel qui commence au niveau du domaine C-terminal, suivi par un ou plusieurs clivages dans le domaine N-terminal. Par séquençage N-terminal et analyse en spectrométrie de masse, nous avons montré que le clivage en N-terminal se déroule majoritairement au niveau de la Ser-92, tandis que le domaine C-terminal est clivé au niveau de la Lys-518. Le poids moléculaire de la forme clivée mature a été mesuré à 47 kDa. Le processus de maturation de la protéase semble impliquer l'action d'une protéase exogène, associée à au moins une étape autocatalytique en *cis* ou en *trans*.

Pour analyser le rôle potentiel de cette protéase mature, nous l'avons purifiée sous forme de protéine de fusion His-tag, $Cwp84_{92-518}$. Cette protéase recombinante ne présentait pas d'activité protéolytique. En revanche, la protéase recombinante $Cwp84_{30-518,}$ intégrant le pro-peptide, et que nous avons également purifiée sous forme de protéine de fusion, a montré une

activité protéolytique sur la fibronectine. Au cours de sa purification, nous avons retrouvé une forme supplémentaire qui correspond très vraisemblablement à la forme sans pro-peptide ($Cwp84_{92-518}$), nous ne pouvons donc pas affirmer quelle est la forme active. En revanche, cette expérience montre que le pro-peptide est essentiel à la conformation correcte de la protéase Cwp84.

En parallèle, la localisation de la protéase a été étudiée *in vitro*, d'une part sur la bactérie entière par immunofluorescence et d'autre part dans différents fractions cellulaires : les protéines de la couche S, les protéines de surface et la fraction extracellulaire à l'aide d'anticorps spécifiques. L'analyse par immunofluorescence des bactéries en phase stationnaire nous a permis de confirmer la localisation de Cwp84 à la surface. Par immunoblot, nous avons montré que Cwp84 est associée aux protéines de la couche S, essentiellement sous une forme d'environ 80 kDa, forme présente également dans les protéines de surface et dans la fraction extracellulaire. Dans ces deux dernières fractions, nous avons aussi récupéré une forme de poids moléculaire proche de 50 kDa, qui pourrait correspondre à la forme dite mature de 47 kDa, en particulier à partir des bactéries cultivées dans un milieu contenant du glucose. Les deux formes sont retrouvées principalement à la surface bactérienne et faiblement dans la fraction extracellulaire. Nous avons également établi que la protéase présente dans la fraction extracellulaire était capable de se réassocier de manière spécifique à la surface de *C. difficile*.

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Oct. 2011, p. 5314–5321 Vol. 193, No. 19
0021-9193/11/$12.00 doi:10.1128/JB.00326-11
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Localization of the *Clostridium difficile* Cysteine Protease Cwp84 and Insights into Its Maturation Process[▽]

Diana ChapetónMontes,[1] Thomas Candela,[1] Anne Collignon,[1,2] and Claire Janoir[1]*

EA 4043, Université Paris-Sud 11, Faculté de Pharmacie, 5 Rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France,[1] and Service de Microbiologie, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France[2]

Received 8 March 2011/Accepted 12 July 2011

***Clostridium difficile* is a nosocomial pathogen involved in antibiotic-associated diarrhea. *C. difficile* expresses a cysteine protease, Cwp84, which has been shown to degrade some proteins of the extracellular matrix and play a role in the maturation of the precursor of the S-layer proteins. We sought to analyze the localization and the maturation process of this protease. Two identifiable forms of the protease were found to be associated in the bacteria: a form of ~80 kDa and a cleaved one of 47 kDa, identified as the mature protease. They were found mainly in the bacterial cell surface fractions and weakly in the extracellular fraction. The 80-kDa protein was noncovalently associated with the S-layer proteins, while the 47-kDa form was found to be tightly associated with the underlying cell wall. Our data supported that the anchoring of the Cwp84 47-kDa form is presumably due to a reassociation of the secreted protein. Moreover, we showed that the complete maturation of the recombinant protein Cwp84$_{30\text{-}803}$ is a sequential process beginning at the C-terminal end, followed by one or more cleavages at the N-terminal end. The processing sites of recombinant Cwp84 are likely to be residues Ser-92 and Lys-518. No proteolytic activity was detected with the mature recombinant protease Cwp84$_{92\text{-}518}$ (47 kDa). In contrast, a fragment including the propeptide (Cwp84$_{30\text{-}518}$) displayed proteolytic activity on azocasein and fibronectin. These results showed that Cwp84 is processed essentially at the bacterial cell surface and that its different forms may display different proteolytic activities.**

Clostridium difficile, a Gram-positive spore-forming anaerobic bacterium, is the leading bacterial cause of nosocomial intestinal infection worldwide and is responsible for illness ranging from mild diarrhea to life-threatening pseudomembranous colitis (8, 16). The clinical relevance of *C. difficile* has increased significantly during the past few years, particularly since 2003, when hypervirulent PCR-ribotype 027 strains have been involved in outbreaks and have been associated with severe disease in North America and Europe (39).

As in other pathogenic bacteria, *C. difficile* expresses several virulence factors. The two large clostridial toxins A (TcdA) and B (TcdB) are the most important and the best-characterized virulence factors of *C. difficile* (24, 26, 30, 37), leading to clinical manifestations by disorganizing the cell actin cytoskeleton. At present, the interactions between *C. difficile* and the host cell surface are not fully understood, even if several cell surface proteins, including adhesins and flagella, have been shown to mediate bacterial attachment (5, 17, 18, 35, 38). The S layer is a paracrystalline array on the outer cell surface that completely coats the bacterium; it is composed of two proteins, the high-molecular-weight S-layer protein (HMW-SLP) and the low-molecular-weight S-layer protein (LMW-SLP), derived from a common precursor, SlpA (6). These two proteins are the major surface proteins in *C. difficile* and play a role in the intestinal colonization and in the inflammatory process (1, 5). However, the colonization step needs to be further characterized in order to better understand the whole pathogenesis process of *C. difficile*.

Proteolytic and hydrolytic enzymes also play a role in the pathogenesis of several diseases (27, 32). Cwp84 is a surface-associated cysteine protease, which displays a proteolytic activity toward several proteins of the extracellular matrix (ECM) such as fibronectin, laminin, and vitronectin (20). As a member of papain-like proteins, Cwp84 possesses the catalytic triad cysteine, histidine, and asparagine (34). It has been recently shown to play a key role in the maturation of the precursor SlpA into two components of the S-layer, the HMW-SLP and the LMW-SLP (10, 23). The translational product of *cwp84* gene is a preproenzyme (Cwp84$_{1\text{-}803}$, 803 amino acid residues, 84 kDa) containing a hydrophobic signal peptide of 32 amino acid residues, an N-terminal domain of 338 amino acid residues (amino acids 33 to 370) containing the catalytic triad, and a C-terminal domain with three Pfam 04122 motifs, presumed to serve as an anchoring domain to the underlying cell wall. Previously, we have shown that Cwp84 is matured presumably by an autoproteolytic cleavage (20). We also showed that *cwp84* is highly conserved in *C. difficile* strains of different toxinotypes or serotypes (34). Furthermore, this protease induces an immune response during the course of the infection, as shown by the presence of specific antibodies in patients with *C. difficile* infection (CDI) (29, 41). These observations suggested that Cwp84 could play a role in *C. difficile* pathophysiology.

The aim of our study was to investigate the localization of Cwp84 in the bacterium and its maturation process, in relation to its putative role in *C. difficile* virulence.

* Corresponding author. Mailing address: Université Paris-Sud 11, Faculté de Pharmacie, Département de Microbiologie, 5 Rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France. Phone: 33 1 46 83 56 34. Fax: 33 1 46 83 55 37. E-mail: claire.janoir-jouveshomme@u-psud.fr.

▽ Published ahead of print on 22 July 2011.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. *Clostridium difficile* strain 630 was cultured at 37°C in an anaerobic chamber (Jacomex, France) in tryptone-yeast extract infusion broth (pH 7.4), with (TYG) or without (TY) glucose (Difco Laboratories). *Bacillus subtilis* strain 168 was grown aerobically in brain heart infusion (BHI) broth or agar (Difco Laboratories). The *Escherichia coli* recombinant strains BL21/pET-28a(+)Ω*cwp*$84_{30\text{-}803}$ (20), BL21/pET28a(+)Ω*cwp*$84_{92\text{-}518}$, BL21/pET28a(+)Ω*cwp*$84_{30\text{-}518}$, and BL21/pET28a(+)Ω*cwp*84_{C116A} were grown in LB agar or in broth (Difco Laboratories) supplemented with 50 μg of kanamycin/ml to maintain the pET plasmid at 37°C. The *cwp84* mutant strain, the 630Δ*erm cwp*84_{347a}::*erm* strain (a generous gift from Neil Fairweather, Imperial College of London, England), and the 630Δ*erm fbpA*$_{640a}$::*erm* strain were cultured in BHI supplemented with 5 μg of erythromycin/ml.

Animal model. Eight germfree mice (purchased from the CNRS, Orléans, France) were inoculated orally with 5×10^5 vegetative cells of *C. difficile* strain 630 and were sacrificed at 40 h postchallenge. The cecal contents were collected, and protease inhibitor cocktail (Sigma) was immediately added. Bacteria were pelleted, and bacterial proteins were extracted from different fractions.

***C. difficile* protein extraction.** *C. difficile* proteins were extracted from bacteria grown in different media or from bacteria collected from mouse ceca at 40 h postchallenge.

S-layer proteins. The S-layer proteins (SLPs) were prepared by the low-pH glycine extraction method as previously described (6).

Cell surface-associated proteins. Surface-associated proteins were extracted using the method of Wexler et al. (40) with some modifications. Briefly, harvested and washed cells were resuspended in 1 mM Tris (pH 6.8) with 60 μg of mutanolysin/ml, followed by incubation at 37°C for 30 min. After mixing with a vortex (30 s) at room temperature, the cells were harvested by centrifugation at 20,000 × *g* for 20 min, and the supernatant containing the cell wall-associated proteins was retained. In some experiments, *trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido (4-guanidino) butane (E64; Sigma), a specific cysteine protease inhibitor, was added to the Tris buffer at a final concentration of 10 μM.

Secreted proteins. To collect the extracellular proteins from broth culture, the bacteria were removed by centrifugation (4,500 × *g*, 20 min, 4°C), and the supernatant was filtered by passage through a 0.45-μm-pore-size sterile filter. The proteins in the supernatant were precipitated by adding 10% trichloroacetic acid (Invitrogen) with gentle shaking at 4°C for 15 h. The proteins were then pelleted by centrifugation (5,000 × *g*, 60 min, 4°C) and suspended in 8 M urea.

The protein concentration was determined by the Bradford method using bovine albumin (1 mg/ml) as a standard. Protein extraction for each growth condition was performed in triplicate.

SDS-PAGE and immunoblotting. The proteins from different extracts were separated by SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide separating gel and transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Amersham Biosciences) for immunoblotting with specific anti-Cwp84 antibodies (used at a 1:5,000 dilution in blocking buffer). Primary antibodies were detected using alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (1:20,000; Sigma) and BCIP/NBT substrate (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium; Sigma). In experiments detecting the His tag of the recombinant protein Cwp$84_{30\text{-}803}$, anti-His tag antibodies were used as a 1:10,000 dilution in blocking buffer, and detection was performed as indicated above.

Recombinant Cwp84 proteins production and purification. Four recombinant proteins were produced. They correspond, respectively, to the proprotein form Cwp$84_{30\text{-}803}$, the cleaved mature form Cwp$84_{92\text{-}518}$, the mature form, including the propeptide Cwp$84_{30\text{-}518}$, and the Cwp$84_{30\text{-}803}$ containing the substitution C116A (Cwp84_{C116A}). The fragments corresponding to the processed cleaved form Cwp$84_{92\text{-}518}$ and the partially cleaved form Cwp$84_{30\text{-}518}$ (incorporating the N-terminal propeptide of the protease) were cloned into pET28a(+) (Novagen) and expressed in *E. coli* BL21 Star(DE3) (Invitrogen) under the control of IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside). The primers used to amplify by PCR the fragment from nucleotides 274 to 1554 were Cwp84_{92}(F) (5′-CTAGCTAGCTCAAGTGTAGCATACAACCC-3′) and Cwp84_{518}(R) (5′-CCGGAATTC**TTA**AACTGCTGTTTCATATC-3′), incorporating the NheI and EcoRI restriction sites, respectively (underlined). The Cwp84_{518}(R) primer contained a stop codon (indicated in boldface). The primers used to amplify by PCR the fragment from nucleotides 88 to 1554 were Cwp84_{30}(F) (5′-TGAGCTAGCGCAGAAAACCATAAAACTCTAGATG-3′), incorporating also the NheI restriction site, and Cwp84_{518}(R). The resulting NheI/EcoRI-digested PCR products were each inserted into the linearized pET28a(+) to create the N-terminal His-tag proteins Cwp$84_{92\text{-}518}$ and Cwp$84_{30\text{-}518}$. The resulting constructions were transformed in *E. coli* BL21 according to the manufacturer's instructions. The nucleotide sequences of the junctions between the vector and the insert were confirmed.

To generate site-directed mutagenesis of Cwp84, we used the oligonucleotides 5′-CAAGGAAGTCTTAATACAGCATGGTCTTTTTCAGGTATG-3′ and 5′-CATACCTGAAAAAGACCATGCTGTATTAAGACTTCCTTG-3′. Briefly, a PCR of 18 cycles was performed using pET28a(+)Ω*cwp*$84_{30\text{-}803}$ as a template and Phusion polymerase (Finnzymes). The parental plasmid was digested by DpnI, and the PCR product was transformed into *E. coli* BL21. The active residue Cys-116 was then substituted with an Ala residue.

Recombinant Cwp$84_{30\text{-}803}$ (previously rCwp84) was purified as already described (20); in one experiment, Cwp$84_{30\text{-}803}$ purification was modified by adding E64 in the purification buffers at a final concentration of 50 μM to inhibit, at least partially, the putative automaturation of the protease. The recombinant Cwp$84_{30\text{-}518}$, Cwp$84_{92\text{-}518}$, and Cwp84_{C116A} were purified using the same protocol, with some modifications. Briefly, clones were grown in 1 liter of LB supplemented with 50 μg of kanamycin/ml at 37°C to an optical density at 600 nm of 0.6 to 0.8. Protein expression was then induced by the addition of IPTG at a final concentration of 1 mM at 37°C, and the cells were harvested at 4 h postinduction for Cwp$84_{30\text{-}518}$ and Cwp84_{C116A} and at 6 h postinduction for Cwp$84_{92\text{-}518}$. The recombinant forms of the protease were then purified by affinity chromatography using the BD Talon cobalt affinity resin (Clontech Laboratories, Inc.) in accordance with the standard protocol provided by the manufacturer. Elution was performed with a gradient of imidazole (10 mM to 1 M), and elution fractions were dialyzed overnight against phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4). Elution fractions were then divided into aliquots and frozen at −80°C for storage until use. These fractions were analyzed using SDS–12% PAGE.

Proteolytic activity of recombinant Cwp84s. The proteolytic activities of Cwp$84_{30\text{-}803}$, Cwp$84_{30\text{-}518}$, Cwp$84_{92\text{-}518}$, and Cwp84_{C116A} were determined by using azocasein (Sigma) as a substrate, as previously described (20). The proteolytic activity of active forms of the protease was further assayed on fibronectin (Sigma) at an enzyme/substrate ratio of 1:1 or 1:10 at 37°C for 16 h in 25 mM Tris buffer (pH 7.5). Experiments were performed with 2 mM dithiothreitol (DTT), a reducing agent known as cysteine protease activator, and the samples were analyzed using SDS–8% PAGE. Moreover, the proteolytic activity of Cwp$84_{30\text{-}803}$ on Cwp84_{C116A} was analyzed at an enzyme/substrate ratio of 1:100 at 37°C for 0, 2, 4, 6, and 24 h in 200 μl of PBS with 2 mM DTT; Cwp84_{C116A} was incubated alone under the same conditions.

Reassociation of recombinant Cwp84 with the *C. difficile* and *B subtilis* cell surface. The *cwp84* mutant and *B. subtilis* were grown to stationary growth phase in TYG and BHI, respectively. In a first set of experiments, the *cwp84* mutant was washed once in PBS and then incubated 1 h at 37°C in anaerobiosis with 20 μg of Cwp$84_{92\text{-}518}$. Bacteria were washed five times with PBS–0.05% Tween in order to eliminate the recombinant protease that had not been associated tightly with the bacterial surface. As a negative control, *C. difficile* 630*fbpA*$_{640a}$::*erm* and purified recombinant FbpA protein were incubated under the same conditions. To analyze whether the reassociation was specific, we performed a second set of experiments in which we varied the number of bacteria while keeping the concentration of protein constant, as previously described (22). Thus, different dilutions of bacteria were incubated in 100 μl of PBS with 2 μg of Cwp$84_{92\text{-}518}$ for 1 h at 37°C. The samples were centrifuged at 10,000 × *g* for 5 min, and the pellet was resuspended in 100 μl of PBS. The potential reassociation of Cwp$84_{92\text{-}518}$ with *C. difficile* and *B. subtilis* cell surface was tested in the same conditions, except that *B. subtilis* was grown in an aerobic environment. Analysis was performed by dot blotting with specific anti-Cwp84 antibodies (1:5,000 dilution) to detect Cwp84 that had reassociated with bacterial cells.

Immunofluorescence microscopy. The localization of Cwp84 was examined by immunofluorescence microscopy. The strains 630 and 630Δ*erm cwp*84_{347a}::*erm* were cultured in TY for 15 h at 37°C. The cells were washed with PBS, 10^8 CFU ml^{-1} was fixed on a slide using ethanol, and 5% bovine serum albumin in PBS was used as a blocking agent. Incubation with a first antibody (specific anti-Cwp84, 1:200) was performed for 1 h at room temperature in blocking buffer. The samples were then washed with PBS and incubated with 1:500 dilution of fluorescein-conjugated Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG as the secondary antibody (Molecular Probes/Invitrogen) for 1 h at room temperature. The cells were washed again and stained with the nuclear stain DAPI (4′,6′-diamidino-2-phenylindole; Molecular Probes). Control experiments were carried out similarly. Rabbit anti-FliC (1:200 dilutions) was used as the control for another surface protein, and bacteria were incubated without primary or secondary antibody as negative controls. Fixed samples were analyzed by epifluorescence using a Nikon Eclipse 80i microscope, and the images were analyzed using ImageJ software (31).

MALDI/TOF-MS, LC-MS/MS, and N-terminal protein sequencing. Purified Cwp$84_{30\text{–}803}$ was incubated with 2 mM DTT for 4 h, in order to collect the

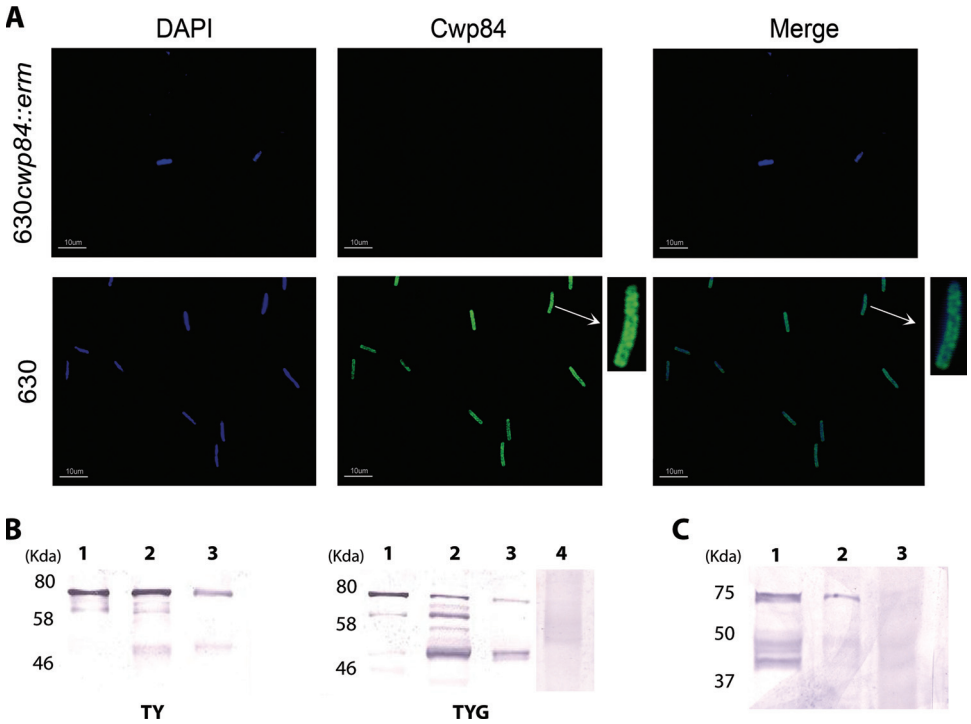


FIG. 1. Localization of Cwp84 in *C. difficile*. (A) Immunofluorescence microscopy of Cwp84 (green) by Alexa Fluor 488 in whole bacteria, comparing the 630 and the 630Δ*erm cwp84*$_{347a}$::*erm* strains; the nucleus was stained by DAPI (blue). (B and C) Immunoblot analysis using Cwp84 antibodies was carried out on protein extracts collected from bacteria grown in TY and TYG media (B) or from bacteria isolated from monoxenic *C. difficile*-associated mice (C). Lane 1, glycine extract; lane 2, cell surface-associated proteins; lane 3, extracellular proteins; lane 4, cell surface-associated proteins from the *cwp84* mutant strain. The various fractions were subjected to SDS–12% PAGE. The positions of molecular mass marker proteins (kDa) are indicated (Biolabs for the *in vitro* experiments and Bio-Rad for the *in vivo* experiment).

mature cleaved form of the protease (mCwp84). This form was subjected to matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) for the determination of the molecular weight using a Perceptive Biosystems/Applied Biosystems/ABI Voyager DE-STR MALDI-TOF mass spectrometer. Automated Edman sequence analysis of mCwp84 was performed on the proteins transferred onto PVDF membrane (Amersham/GE Healthcare). The blots were stained in 0.1% Coomassie blue and 1% acetic acid and then destained with 50% methanol. Dry membranes were stored at −20°C. N-terminal sequencing was carried out at the Institute of Biochemistry and Molecular and Cellular Biophysics (IBBMC-UMR CNRS 8619; Team Chemistry of Proteins, University Paris-Sud 11) on an Applied Biosystems Procise Sequenator using established protocols. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analyses were performed using a 1200 Series Nano-LC system (Agilent Technologies), coupled with an Agilent 6330 XCT ion trap equipped with a nanospray Chip Cube ion source, at the proteomic platform of IFR 141 (University Paris-Sud 11).

RESULTS

Localization of Cwp84. (i) *In vitro* experiments. In a previous work, we showed by immunoblotting that Cwp84 was surface associated and was recovered mainly in the glycine extract associated with the S layer (20). To confirm that the protease was located on the cell surface, immunofluorescence analysis was performed in the present study on *C. difficile* strain 630 after growth in TY medium. As shown in Fig. 1A, Cwp84 was localized on the cell surface. In the same conditions, flagella were observed at the bacterial surface of *C. difficile* (36; data not shown). As expected, the 630Δ*erm cwp84*$_{347a}$::*erm* strain (Fig. 1A) and the controls omitting the first or second antibodies were not labeled (data not shown), indicating that the fluorescent signal was Cwp84 specific.

To further analyze the exact localization of Cwp84, different fractions of *C. difficile* proteins, extracted after growth in TY or TYG media, were studied by immunoblot analysis. In the glycine extract, regardless of growth medium, Cwp84 was recovered mainly as a protein of ~80 kDa, as previously observed (Fig. 1B, lane 1) (20). The glycine extraction method exploits the ability of low pH to remove the S layer and associated proteins from the bacterial surface without producing changes in the SLP; proteins that are extracted by this method should be noncovalently associated with the underlying cell wall.

In the cell surface-associated protein extract (Fig. 1B, lane 2), anti-Cwp84 antibodies mainly revealed three different forms of the protease: the 80-kDa form, an intermediate form of ~60 kDa, and a mature form of ~50 kDa as determined by electrophoretic migration. However, some differences were observed in the relative amounts of these three protease forms according to the growth medium. For example, the mature 50-kDa Cwp84 was recovered especially in the TYG medium. The method used to collect these extracts combines the use of mutanolysin to gently disorganize the cell wall with an abrasive method and consequently promotes the release of tightly cell wall-associated proteins. To ensure that these cleaved (intermediate and mature) forms of Cwp84 were not the result of a proteolytic process of the 80-kDa protein during the extraction steps, experiments were performed with E64 in the extraction

solutions. No difference was observed (data not shown), suggesting that these different forms are truly associated with the bacteria. Moreover, no reaction was observed with the surface-associated proteins from the *cwp84* mutant, indicating that the detection of lower-molecular-weight proteins was not due to a cross-reaction. These results suggest that Cwp84 could exist at the *C. difficile* surface under different forms anchored to the bacterial cell surface in different ways. In the extracellular fraction, we observed both the 80-kDa form and the mature 50 kDa-form (Fig. 1B, lanes 3).

(ii) *In vivo* experiments. After *C. difficile* challenge in mice, bacteria expressed Cwp84 at the cell surface mainly associated with the S-layer proteins in the glycine extract (Fig. 1C, lanes 1 and 2). The cysteine protease was detected as the 80-kDa form, processed intermediates forms, and the mature cleaved 50-kDa form. Cwp84 was not detected in the extracellular fraction.

Proteolytic processing of recombinant $Cwp84_{30-803}$. In our first Cwp84 study, we observed that $Cwp84_{30-803}$ was processed into a cleaved form, called mCwp84 (20). The mCwp84 migrates on SDS-PAGE at ~50 kDa similarly to the cleaved mature form found mainly in the cell surface extract. So we hypothesized that the cleavage was due to an autoproteolytic process and we observed that this process began during the metal affinity purification and the dialysis steps.

Therefore, to be able to observe the intermediate forms, we slowed down the maturation process, and we then performed purification of $Cwp84_{30-803}$ under conditions of partial proteolytic inhibition. SDS-PAGE analysis showed that at 0, 2, and 4 h postincubation with 2 mM DTT intermediate forms of $Cwp84_{30-803}$ were detected, and the majority of $Cwp84_{30-803}$ had been converted in the mature form (mCwp84) at 6 h (Fig. 2A, lane 5). Whereas for $Cwp84_{30-803}$ purified without the cysteine protease inhibitor the protease was quite fully matured after the dialysis (0 h postincubation), intermediate forms were detected only at very low levels (Fig. 2A, lane 6).

Immunoblot analysis of protease fractions purified with E64 revealed that anti-His tag antibodies reacted with distinct protein bands that were considered to correspond to the whole recombinant $Cwp84_{30-803}$ and some of its processed intermediate forms (Fig. 2B). The histidine tag at the N-terminal end was still present in Cwp84 cleaved forms after 2 h of incubation with 2 mM DTT (Fig. 2B, lane 3), suggesting that the maturation process of recombinant $Cwp84_{30-803}$ begins at the C-terminal end. Since no His tag was detected after 4 h (Fig. 2B, lane 4), the maturation of $Cwp84_{30-803}$ seems to proceed via cleavage at the N-terminal end. These results suggested that the maturation process of $Cwp84_{30-803}$ occurred via sequential cleavage beginning at the C-terminal end, followed by one or more cleavages at the N-terminal end.

To determine the cleavage sites, the band corresponding to the mature form mCwp84 (~50 kDa as determined by SDS-PAGE) was analyzed using MALDI-TOF mass spectrometry, MS/MS, and N-terminal Edman sequencing. The molecular mass obtained by MALDI-TOF was 47,136 Da. N-terminal sequencing revealed that a major cleavage site at the N-terminal part of the $Cwp84_{30-803}$ occurred between the Lys-91 and Ser-92, with an N-terminal amino acid sequence being SSVAYN (Fig. 3). This cleavage seemed to be heterogeneous, with a minor site occurring between the Ser-93 and the Val-94 residues. By MS/MS, we identified a cleavage at the C-terminal end at Lys-491, and we confirmed the cleavage at the N-terminal end at Ser-92. Therefore, the predicted molecular mass of this cleaved form (Ser-92–Lys-491) was 44,500 Da calculated using ExPaSy software, which differed from the predicted molecular mass of 47,136 Da by more than 2,600 Da. This discrepancy indicated that the cleavage at the C-terminal end might take place downstream from this site, most likely between Lys-518 and Val-519 (Fig. 3), and that it has been hidden by trypsin digestion performed for MALDI analysis.

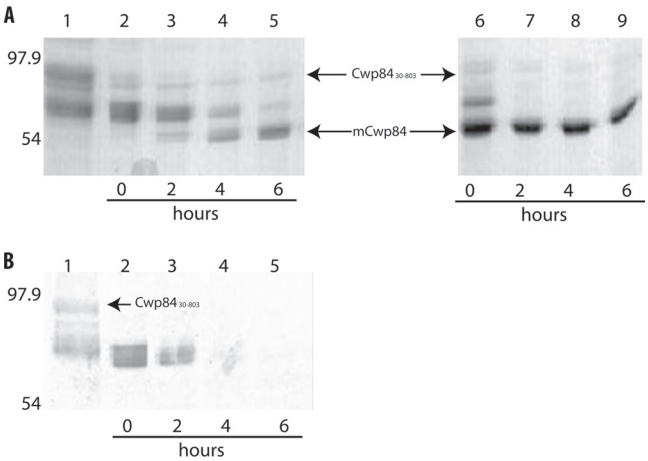


FIG. 2. Proteolytic process of $Cwp84_{30-803}$. The recombinant protease $Cwp84_{30-803}$ was purified in the presence or absence of 50 μM E64 and then incubated under reducing conditions with 2 mM DTT. (A) SDS-PAGE analysis. Purification of $Cwp84_{30-803}$ in the presence of the cysteine protease inhibitor (lanes 2 to 5) resulted in the detection of intermediate forms at 0, 2, and 4 h and the mature form at 6 h, whereas the purification in the absence of E64 (lanes 6 to 9) resulted in the detection of the mature form from 0 h. Lane 1 corresponds to the protease before dialysis. (B) Immunoblot analysis with anti-His tag antibody. In the presence of E64, the histidine tag fused to the N-terminal end was detected in the total and some of the processed intermediate forms of Cwp84; however, the mature form was not detected, suggesting that proteolytic process of Cwp84 begins at the C-terminal end, and follows at the N-terminal end. The Bio-Rad molecular mass standard (in kilodaltons) was used.

To assess whether maturation of Cwp84 was an autoproteolytic process, we constructed an active-site substitution, $Cwp84_{C116A}$. As expected, $Cwp84_{C116A}$ displayed no proteolytic activity against azocasein. Surprisingly, after purification we did not observe, as expected, only the total protease form but instead four bands corresponding to the total and intermediate forms, suggesting that these forms could ultimately be due to degradation during the purification steps. Incubation of $Cwp84_{C116A}$ with 2 mM DTT for 24 h did not lead to additional cleavage (Fig. 4A), suggesting that the mutated protease was not able to complete its own cleavage process. In contrast, incubation with $Cwp84_{30-803}$ led to the conversion to intermediate and mature forms at 2, 4, 6, and 24 h (Fig. 4B), similar to the autocatalytic process of $Cwp84_{30-803}$. This, together with the previous results, suggested that the complete maturation process of Cwp84 proceeds, at least partially, by an autocatalytic mechanism involving a transmaturation.

Purification and characterization of the proteolytic activities of $Cwp84_{30-803}$, $Cwp84_{92-518}$, and $Cwp84_{30-518}$. In our pre-

FIG. 3. Schematic representation of Cwp84 proteolytic processing. *cwp84* encodes a protein of 803 amino acid residues. The peptide signal (■), the catalytic domain (□), and the domain corresponding to the anchoring domain (▧) are indicated. The scheme shows the three Pfam 04122 motifs and the catalytic triad (Cys-116, His-262, and Asn-287). The amino acids involved in the proteolytic cleavage are indicated.

vious study, we could not be certain which protein form was responsible for the proteolytic activity (20). Therefore, we cloned the *cwp84* gene region corresponding to the mature form ($Cwp84_{92\text{-}518}$), deduced from previous analysis, into a pET expression vector. The purified recombinant $Cwp84_{92\text{-}518}$ was tested for proteolytic activity on azocasein and fibronectin. However, $Cwp84_{92\text{-}518}$ did not show any proteolytic activity on these substrates, suggesting that the mature form was expressed as an inactive enzyme. Thus, a larger DNA fragment corresponding to the mature form, including the propeptide of Cwp84, was cloned into the pET expression vector. This form, named $Cwp84_{30\text{-}518}$, was expressed and purified by using an affinity column. However, after SDS-PAGE analysis, two forms of the protease, $Cwp84_{30\text{-}518}$ and another form with a lower molecular weight, corresponding presumably to mature $Cwp84_{92\text{-}518}$, were detected (data not shown). This purified fraction displayed proteolytic activity on azocasein. As shown in Fig. 5, the recombinant proteases $Cwp84_{30\text{-}518}$ (lanes 4 and 5) and $Cwp84_{30\text{-}803}$ (lanes 2 and 3) were able to degrade fibronectin.

Reassociation of Cwp84 at the *C. difficile* surface. The existence of the mature form of the protease both as a surface-associated protein and as an extracellular protein suggests a putative reassociation of this form to the bacterial surface. As shown in Fig. 6A, incubation of 20 μg of recombinant $Cwp84_{92\text{-}518}$ with the *cwp84* mutant bacteria resulted in the detection of labeled bacterial cells after immunodetection with specific anti-Cwp84 antibodies. No labeling was observed after incubation in the same conditions of another surface protein FbpA with the corresponding knockout strain 630Δ*erm fbpA*$_{640a}$::*erm*. This suggests that the protease is able to reassociate with the *C. difficile* surface.

To address whether Cwp84 is able to reassociate specifically with the bacterial surface of *C. difficile*, or whether it may associate with any bacterial surface, different concentrations of bacteria were incubated with 2 μg of $Cwp84_{92\text{-}518}$. As shown in Fig. 6B, an efficient association of recombinant protein with the surface of *C. difficile* was detected in a concentration-dependent manner; the level of reassociation of recombinant protein decreased in parallel with the decrease of the bacterial number. When *B. subtilis* was incubated with $Cwp84_{92\text{-}518}$ under identical conditions, a labeling in a nonuniform manner was observed (Fig. 6B), suggesting that the association at the surface of *B. subtilis* is nonspecific. These results argued for the presence of a binding site for $Cwp84_{92\text{-}518}$ at the bacterial surface of *C. difficile*.

DISCUSSION

Cysteine proteases represent a large group of proteolytic enzymes that have been shown to contribute to a large variety of complex functions. Bacterial proteases play a critical role in the pathogenesis of several human and animal diseases by direct damage to host tissues and by activating zymogens and often also participate in the turnover of bacterial proteins (25, 33). Cwp84 is the first characterized protease of *C. difficile*; this cysteine protease plays a key role in the maturation of S-layer proteins (10, 23). Cwp84 has also been shown to possess *in vitro* degrading activity against human ECM proteins (20), but the physiological relevance of this property is not yet known. In addition, it was hypothesized that Cwp84 could undergo autocatalytic maturation, as previously observed for numerous papain family cysteine proteases (32). The aim of the present study was to examine the localization of Cwp84 in the bacterial cell and its maturation process.

We have shown that the maturation process of recombinant $Cwp84_{30\text{-}803}$ proceeds in sequential cleavage reactions, beginning at the C-terminal domain. The cleavage at the N-terminal domain is heterogeneous, with the major cleavage site identi-

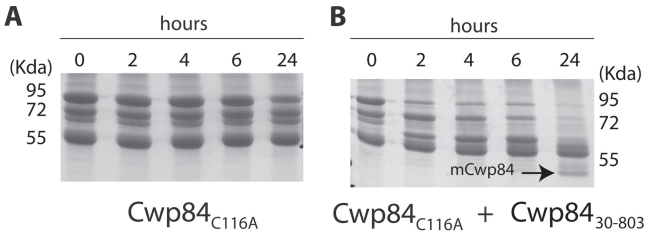


FIG. 4. Purification of $Cwp84_{C116A}$ and transmaturation by $Cwp84_{30\text{-}803}$. The mutated protease $Cwp84_{C116A}$ was incubated at 37°C alone or with $Cwp84_{30\text{-}803}$ under reducing conditions for 0, 2, 4, 6, and 24 h. $Cwp84_{C116A}$ alone with 2 mM DTT does not show the maturation process (A), whereas incubation of $Cwp84_{C116A}$ with $Cwp84_{30\text{-}803}$ at an enzyme/substrate ratio of 1:100 resulted in the increase of intermediate forms at 4 and 6 h and detection of mature form at 24 h (B). The molecular mass standard used was purchased from Fermentas.

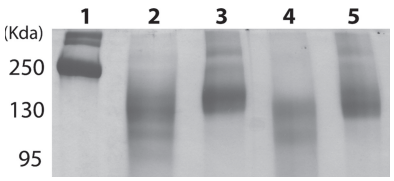


FIG. 5. Proteolytic activities of $Cwp84_{30\text{-}803}$ and $Cwp84_{30\text{-}518}$ on fibronectin. The recombinant proteases were incubated for 16 h with fibronectin at enzyme/substrate ratios of 1:1 and 1:10. All experiments were performed under reducing conditions (2 mM DTT). Lane 1, fibronectin control (5 μg); lane 2, $Cwp84_{30\text{-}803}$ and fibronectin (1:1); lane 3, $Cwp84_{30\text{-}803}$ and fibronectin (1:10); lane 4, $Cwp84_{30\text{-}518}$ and fibronectin (1:1); lane 5, $Cwp84_{30\text{-}518}$ and fibronectin (1:10). The molecular mass standard used was from Fermentas.

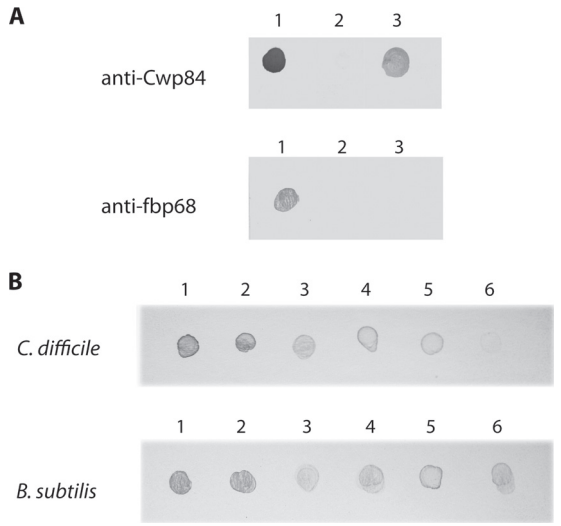


FIG. 6. Reassociation of Cwp84 protein. Bacteria were loaded onto a nitrocellulose membrane and treated with specific anti-Cwp84 or anti-Fbp68 antibodies. (A) *C. difficile* strains 630Δ*erm cwp84*$_{347a}$::*erm* and 630Δ*erm fbpA*$_{640a}$::*erm* were incubated with 20 μg of Cwp84$_{92-518}$ or 20 μg of FbpA (lane 3). Lane 1, positive control Cwp84$_{92-518}$; lane 2, negative control 630Δ*erm cwp84*$_{347a}$::*erm* and 630Δ*erm fbpA*$_{640a}$::*erm* not incubated with the recombinant proteins. (B) Different numbers of *C. difficile* 630Δ*erm cwp84*$_{347a}$::*erm* and *B. subtilis* bacteria. Samples—5×10^8 (lane 1), 10^8 (lane 2), 10^7 (lane 3), 10^6 (lane 4), 10^5 (lane 5), or 10^4 (lane 6)—were incubated with 2 μg of Cwp84$_{92-518}$. The samples were centrifuged, and the reassociation of recombinant Cwp84 was analyzed by dot blotting.

fied at Lys-91, in accordance with the recent results from de la Riva et al. (11). It is noteworthy that the consensus cleavage site of SlpA into the mature S-layer proteins is also located after a serine residue (13, 14), but no other consensus motif has been recovered in Cwp84. The C-terminal cleavage site has been presumably identified at Lys-518. The molecular mass of the mature recombinant Cwp84 has been determined to be 47 kDa. Some members of the M4 family of metalloproteases require processing at the N-terminal end, and at the C-terminal end to become fully active (12). Since we observed a maturation process on purified recombinant protease, it is likely that these cleavages occurred via an autocatalytic mechanism. However, purification of the inactive mutated Cwp84$_{C116A}$ showed that some of the Cwp84 cleavages, leading to intermediary forms of the protease, could be due to a degradation process. Nevertheless, conclusive proof that ultimate conversion to the 47-kDa form proceeds via an autocatalytic mechanism was obtained from our processing experiments, where the different forms of the mutated Cwp84$_{C116A}$ protease were cleaved by active Cwp84$_{30-803}$, leading to accumulation of the mature form (Fig. 4). Autocatalytic maturation of cysteine proteases could be due to *cis* or *trans* processing (7). It is therefore possible that the first cleavages could be due to the activity of an exogenous protease, as recently suggested by de la Riva et al. for the removal of the propeptide leading to the 77-kDa form associated with the S layer; the following cleavages could then result from an autoproteolytic mechanism. Maturation of protease involving both exogenous and autocatalytic processing has already been described (28).

In the mouse model, we found that Cwp84 is associated with the bacterial surface in different forms, suggesting that the proteolytic maturation of Cwp84 occurs in the gut. The absence of Cwp84 in the extracellular fraction could be due to the dilution of the cecal contents.

In the present study, we showed that Cwp84 was expressed as an extracellular protein and mostly localized at the bacterial surface. Surface localization is not usual for bacterial cysteine protease but has been already reported for the SpeB protease of *Streptococcus pyogenes* (19). We confirmed here that Cwp84 exists at the bacterial cell surface associated with the S-layer proteins mainly as an ~80-kDa protein, and this is consistent with the recent results from de la Riva et al. (11). Since we had not precisely determined the molecular weight of this form in the bacterial cell, it could correspond either to the proprotein (amino acids 33 to 803) or to a form without the propeptide (amino acids 92 to 803). The association of the protease with the S-layer proteins is not unexpected, since the latter are substrates for Cwp84 (23). Moreover, the C-terminal part of Cwp84 contains three PF04122 Pfam "cell wall binding" motifs, which could mediate anchoring to the cell wall (6, 21). These motifs are also found in three copies in the HMW-SLP (15), suggesting that these two proteins may share a binding mechanism to the *C. difficile* surface. This mechanism is not yet characterized but is likely to involve a noncovalent attachment mode.

Furthermore, we also recovered the protease as a lower-molecular-weight form, in both the extracellular and the cell wall-associated protein fractions, especially when *C. difficile* was grown in the TYG medium. This form shared the same molecular weight as the cleaved one, which resulted from maturation of the recombinant Cwp84$_{30-803}$, and we assume that it is the same mature form of the protease. The mature protease could be secreted into the extracellular fraction after cleavage at the C-terminal part. However, it is surprising to recover this mature form tightly associated with the underlying cell wall. It should be noted that this last result is consistent with a previous proteomic study, where Cwp84 was recovered in the extracts collected after enzymatic degradation of the peptidoglycan (42). One hypothesis is that the secreted cleaved protease could be reassociated with the bacterial surface, since it has been shown for some surface proteins in other bacteria (2, 9), and previously proposed as an anchoring mechanism of GroEL at the *C. difficile* surface (18). To further investigate this hypothesis, the ability of recombinant Cwp84$_{92-518}$ to reassociate at the surface of *C. difficile* was explored. This recombinant protein was able to specifically reassociate at the surface of the 630Δ*erm cwp84*$_{347a}$::*erm* mutant; this specific reassociation was not observed with *B. subtilis*. The recombinant protein Cwp84$_{92-518}$ does not possess the three complete PF04122 Pfam motifs but only 11 amino acids of the first motif. Therefore, the Pfam motifs may not be necessary for the reassociation of the mature protease. Neither GW nor LysM conserved anchoring motifs have been recovered (4). Thus, the Cwp84 anchoring domain to the underlying cell surface is still unknown but could be mediated by interactions either with the peptidoglycan or lipoteichoic acids.

Cwp84 is located at the bacterial surface and also released extracellularly and may contribute to the pathogenicity of *C. difficile* by several mechanisms. Cwp84 participates in the turnover of S-layer proteins (23). It is therefore possible that the

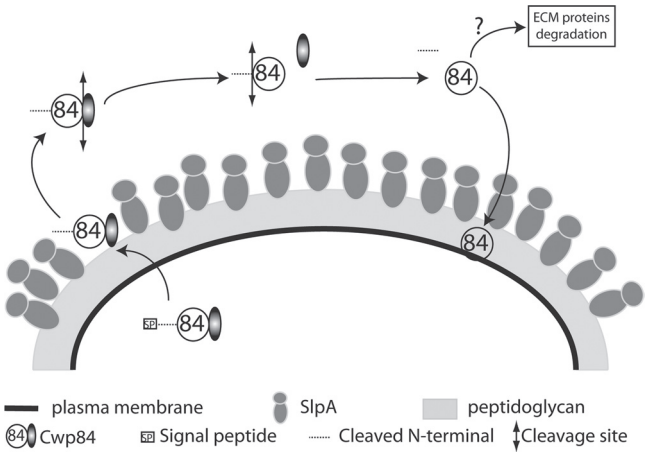


FIG. 7. Cwp84 localization and maturation process model. The Cwp84 native form is composed of a signal peptide, an N-terminal propeptide (dashed line), an N-terminal part (empty circle), and a C-terminal part (partially filled circle). The native protein is exported to the S layer probably via the SecA secretion system, where the signal peptide is removed. $Cwp84_{33\text{-}803}$ is then associated with the S layer where the N-terminal peptide (dash line) is potentially removed. At this subcellular position, it is likely that $Cwp84_{30\text{-}803}$ cleaves the SlpA protein and participates in the S-layer turnover. When $Cwp84_{30\text{-}803}$ is released from the bacterial surface, it is first cleaved at the C-terminal part, leading to $Cwp84_{30\text{-}518}$, and then after the N-terminal propeptide, leading to $Cwp84_{92\text{-}518}$. According to our observations in *E. coli*, at least the final cleavage is probably due to an automaturation mechanism. The mature $Cwp84_{92\text{-}518}$ is thereafter reassociated with the underlying cell wall. When the mature form is not surface bound, it potentially degrades the ECM host proteins.

different forms of Cwp84 may promote either the cleavage of SlpA or additional functions in the development of the infection. We did not investigate in the present study which form of the protease could be responsible for the maturation of the S-layer protein, but it is likely to be the form $Cwp84_{30\text{-}803}$ associated with the S layer. In contrast, degrading activity against human tissues could be expressed by the mature extracellular Cwp84. Indeed, in a previous study, we showed that Cwp84 has a degrading activity on some ECM proteins (20), but we could not assign this role to one defined form of the protease. Here, purification of the cleaved forms helped us to answer this question. We observed that the purified recombinant mature $Cwp84_{92\text{-}518}$ had no proteolytic activity on tested substrates, whereas the purified $Cwp84_{30\text{-}518}$ demonstrated catalytic activity against azocasein and fibronectin. The inactivity of mature $Cwp84_{92\text{-}518}$ may be due to a defective folding of the active site of this recombinant protein. Other recombinant cysteine proteases have been purified directly under the mature form and have also been shown to be inactive, suggesting that the propeptide may play a role in the maturation and correct folding of the catalytically mature protein (3). In fact, the recombinant $Cwp84_{30\text{-}518}$ was also cleaved during the purification in the mature protease; therefore, we could not exclude that the proteolytically active form is the $Cwp84_{92\text{-}518}$ and that presence of propeptide is essential for correct folding before maturation of the active mature protease.

In which subcellular compartment Cwp84 maturation occurs remains to be determined. However, according to our results, we could hypothesize that, after removal of the peptide signal from the preproprotein and translocation across the cytoplasmic membrane, the 84-kDa proprotease or the 77-kDa form (without propeptide) is associated with the S layer. Cleavage at the C-terminal domain leads ultimately to the secretion of mature Cwp84, where it can cleave host proteins and also be reassociated with the bacterial surface (Fig. 7). These different phases may require stringent regulation by environmental conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

Diana Chapetón Montes is supported by a doctoral fellowship from the French Ministry of Higher Education and Research.

We thank Celine Boursier for assistance in the proteomic analyses (proteomic platform, IFR 141, Université Paris-Sud) and Séverine Péchiné for valuable advice. We especially thank Neil Fairweather for the gift of the *cwp84* mutant strain and assistance with the manuscript.

REFERENCES

1. **Ausiello, C. M., et al.** 2006. Surface layer proteins from *Clostridium difficile* induce inflammatory and regulatory cytokines in human monocytes and dendritic cells. Microbes Infect. **8:**2640–2646.
2. **Bergmann, S., M. Rohde, G. S. Chhatwal, and S. Hammerschmidt.** 2001. α-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. Mol. Microbiol. **40:**1273–1287.
3. **Bromme, D., F. S. Nallaseth, and B. Turk.** 2004. Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. Methods **32:**199–206.
4. **Buist, G., A. Steen, J. Kok, and O. P. Kuipers.** 2008. LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. Mol. Microbiol. **68:**838–847.
5. **Calabi, E., F. Calabi, A. D. Phillips, and N. F. Fairweather.** 2002. Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. Infect. Immun. **70:**5770–5778.
6. **Calabi, E., et al.** 2001. Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*. Mol. Microbiol. **40:**1187–1199.
7. **Chen, C. Y., et al.** 2003. Maturation processing and characterization of streptopain. J. Biol. Chem. **278:**17336–17343.
8. **Cloud, J., and C. P. Kelly.** 2007. Update on *Clostridium difficile* associated disease. Curr. Opin. Gastroenterol. **23:**4–9.
9. **Coutte, L., et al.** 2003. Role of adhesin release for mucosal colonization by a bacterial pathogen. J. Exp. Med. **197:**735–742.
10. **Dang, T. H., et al.** Chemical probes of surface layer biogenesis in *Clostridium difficile*. ACS Chem. Biol. **5:**279–285.
11. **de la Riva, L., S. E. Willing, E. W. Tate, and N. F. Fairweather.** 2011. Roles of cysteine proteases Cwp84 and Cwp13 in biogenesis of the cell wall of *Clostridium difficile*. J. Bacteriol. **193:**3276–3285.
12. **Del Papa, M. F., L. E. Hancock, V. C. Thomas, and M. Perego.** 2007. Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage. J. Bacteriol. **189:**8835–8843.
13. **Eidhin, D. N., A. W. Ryan, R. M. Doyle, J. B. Walsh, and D. Kelleher.** 2006. Sequence and phylogenetic analysis of the gene for surface layer protein, *slpA*, from 14 PCR ribotypes of *Clostridium difficile*. J. Med. Microbiol. **55:**69–83.
14. **Fagan, R. P., et al.** 2009. Structural insights into the molecular organization of the S-layer from *Clostridium difficile*. Mol. Microbiol. **71:**1308–1322.
15. **Fagan, R. P., et al.** 2011. A proposed nomenclature for cell wall proteins of *Clostridium difficile*. J. Med. Microbiol. **60:**1225–1228.
16. **Heinlen, L., and J. D. Ballard.** 2010. *Clostridium difficile* infection. Am. J. Med. Sci. **340:**247–252.
17. **Hennequin, C., C. Janoir, M. C. Barc, A. Collignon, and T. Karjalainen.** 2003. Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. Microbiology **149:**2779–2787.
18. **Hennequin, C., et al.** 2001. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. Microbiology **147:**87–96.
19. **Hytonen, J., S. Haataja, D. Gerlach, A. Podbielski, and J. Finne.** 2001. The SpeB virulence factor of *Streptococcus pyogenes*, a multifunctional secreted and cell surface molecule with strepadhesin, laminin-binding and cysteine protease activity. Mol. Microbiol. **39:**512–519.
20. **Janoir, C., S. Péchiné, C. Grosdidier, and A. Collignon.** 2007. Cwp84, a surface-associated protein of *Clostridium difficile*, is a cysteine protease with degrading activity on extracellular matrix proteins. J. Bacteriol. **189:**7174–7180.
21. **Karjalainen, T., et al.** 2001. Molecular and genomic analysis of genes encoding surface-anchored proteins from *Clostridium difficile*. Infect. Immun. **69:**3442–3446.
22. **Kern, T., et al.** 2008. Toward the characterization of peptidoglycan structure and protein-peptidoglycan interactions by solid-state NMR spectroscopy. J. Am. Chem. Soc. **130:**5618–5619.

23. **Kirby, J. M., et al.** 2009. Cwp84, a surface-associated cysteine protease, plays a role in the maturation of the surface layer of *Clostridium difficile*. J. Biol. Chem. **284:**34666–34673.
24. **Kuehne, S. A., et al.** The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. Nature **467:**711–713.
25. **Lantz, M. S.** 1997. Are bacterial proteases important virulence factors? J. Periodontal Res. **32:**126–132.
26. **Lyras, D., et al.** 2009. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. Nature **458:**1176–1179.
27. **Matsushita, O., and A. Okabe.** 2001. Clostridial hydrolytic enzymes degrading extracellular components. Toxicon **39:**1769–1780.
28. **Nickerson, N. N., L. Prasad, L. Jacob, L. T. Delbaere, and M. J. McGavin.** 2007. Activation of the SspA serine protease zymogen of *Staphylococcus aureus* proceeds through unique variations of a trypsinogen-like mechanism and is dependent on both autocatalytic and metalloprotease-specific processing. J. Biol. Chem. **282:**34129–34138.
29. **Péchiné, S., C. Janoir, and A. Collignon.** 2005. Variability of *Clostridium difficile* surface proteins and specific serum antibody response in patients with *Clostridium difficile*-associated disease. J. Clin. Microbiol. **43:**5018–5025.
30. **Pothoulakis, C.** 2000. Effects of *Clostridium difficile* toxins on epithelial cell barrier. Ann. N. Y. Acad. Sci. **915:**347–356.
31. **Rasband, W. S.** ImageJ. National Institutes of Health, Bethesda, MD. http://rsb.info.nih.gov/ij/.1997–2005.
32. **Rasmussen, M., and L. Bjorck.** 2002. Proteolysis and its regulation at the surface of *Streptococcus pyogenes*. Mol. Microbiol. **43:**537–544.
33. **Rudenskaya, G. N., and D. V. Pupov.** 2008. Cysteine proteinases of microorganisms and viruses. Biochemistry (Moscow) **73:**1–13.
34. **Savariau-Lacomme, M. P., C. Lebarbier, T. Karjalainen, A. Collignon, and C. Janoir.** 2003. Transcription and analysis of polymorphism in a cluster of genes encoding surface-associated proteins of *Clostridium difficile*. J. Bacteriol. **185:**4461–4470.
35. **Tasteyre, A., M. C. Barc, A. Collignon, H. Boureau, and T. Karjalainen.** 2001. Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. Infect. Immun. **69:**7937–7940.
36. **Tasteyre, A., et al.** 2000. A *Clostridium difficile* gene encoding flagellin. Microbiology **146**(Pt. 4)**:**957–966.
37. **Voth, D. E., and J. D. Ballard.** 2005. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. Clin. Microbiol. Rev. **18:**247–263.
38. **Waligora, A. J., et al.** 2001. Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. Infect. Immun. **69:**2144–2153.
39. **Warny, M., et al.** 2005. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet **366:**1079–1084.
40. **Wexler, H., M. E. Mulligan, and S. M. Finegold.** 1984. Polyacrylamide gel electrophoresis patterns by *Clostridium difficile*. Rev. Infect. Dis. **6:**S229–S234.
41. **Wright, A., D. Drudy, L. Kyne, K. Brown, and N. F. Fairweather.** 2008. Immunoreactive cell wall proteins of *Clostridium difficile* identified by human sera. J. Med. Microbiol. **57:**750–756.
42. **Wright, A., et al.** 2005. Proteomic analysis of cell surface proteins from *Clostridium difficile*. Proteomics **5:**2443–2452.

3. Article 2

« Influence of environmental conditions on the expression and the maturation process of the *Clostridium difficile* surface associated protease Cwp84 »

Diana Chapetón Montes, Anne Collignon, and Claire Janoir

À soumettre

Présentation de l'article

Chez *C. difficile*, un rôle des sucres-PTS dans la régulation de la production des facteurs majeurs de virulence, les toxines A et B, a été démontré. Afin d'analyser si les sucres-PTS pourraient éventuellement être impliqués dans la régulation de la synthèse d'autres facteurs de virulence, nous avons analysé l'effet du glucose sur la cystéine protéase Cwp84.

Dans un premier temps, nous avons comparé l'expression et le processus protéolytique de la protéase à la surface de la bactérie, après croissance dans un milieu sans glucose (TY) et avec glucose (TYG). Les résultats montrent que l'expression de la protéase est plus importante en TGY qu'en TY, après 15h de culture. En outre, le profil de la protéase dans les extraits de surface présente également des particularités après 15 h de culture en présence de glucose : en effet, dans ces conditions, nous observons sur gel SDS-PAGE l'apparition d'une bande correspondant vraisemblablement à la forme clivée mature de 47 kDa, qui n'est pas présente dans les protéines de surface extraites après 8h de culture, quelque soit le milieu, ou après 15h de culture en milieu TY. La présence de glucose dans le milieu pourrait donc se traduire également par une modification du processus protéolytique. La fermentation du glucose par *C. difficile* se traduit par une diminution du pH du milieu, particulièrement après 15 h de culture. Ainsi, afin de vérifier si les modifications de l'expression et du processus protéolytique de Cwp84 sont liées à un effet direct du glucose ou à l'acidification progressive du milieu, nous avons étudié d'une part l'effet immédiat du glucose, et d'autre part, l'impact du maintien à pH constant d'un milieu avec glucose sur la protéase. L'ajout de glucose dans

une culture TY au milieu de la phase exponentielle (6h), se traduit par un effet quasi nul du glucose, l'expression de *cwp84* étant stable après 1h30 d'exposition au glucose. De plus, dans un milieu avec glucose maintenu à pH constant (TYG+MOPS), d'une part l'expression de la protéase est nettement inférieure à ce que nous observons dans un milieu TGY, d'autre part nous ne retrouvons pas la forme mature de 47 kDa. Pour confirmer l'effet d'un pH acide sur le processus protéolytique de la protéase, nous avons purifié la protéase recombinante $Cwp84_{30\text{-}803}$, soit à pH 8,0, soit à pH 5,8. A pH acide, la protéase recombinante a été convertie en la forme mature de 47 kDa, tandis qu'à un pH basique (pH 8.0), nous n'observons pas la forme mature.

L'expression de la protéase Cwp84 semble donc être modulée plutôt par un pH acide (lié ou non au métabolisme du glucose), que directement par le glucose. En outre, le pH acide jouerait également un rôle dans le processus protéolytique, essentiellement dans le clivage des formes intermédiaires vers la forme clivée mature.

Influence of environmental conditions on the expression and the maturation process of the *Clostridium difficile* surface associated protease Cwp84

Diana Chapetón Montes[1], Anne Collignon[1,2], and Claire Janoir[1*]

[1]EA 4043, Université Paris-Sud 11, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

[2]Service de Microbiologie, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, France

Running title: Impact of pH on *C. difficile* cysteine protease Cwp84

* Corresponding author:

Claire Janoir

Université Paris-Sud 11, Faculté de Pharmacie, Département de Microbiologie,

5 rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France.

Phone: + 33 1 46 83 56 34.

Fax: + 33 1 46 83 55 37.

E-mail: claire.janoir-jouveshomme@u-psud.fr

Abstract

Expression of the *C. difficile* protease gene, *cwp84*, was moderately up-regulated by the decreasing pH due to glucose metabolism. Purification under different pH conditions influenced the proteolytic process of Cwp84. Acidic pH could then favor the appearance of different forms of Cwp84 that may have different roles during the infection.

48 *Clostridium difficile* is the main cause of post-antibiotic nosocomial diarrhea, ranging from
49 mild diarrhea to pseudomembranous colitis (4). Clinical symptoms of *C. difficile* infections
50 (CDI) are related to the production of the two toxins, TcdA and TcdB (17). However, the first
51 step of the infectious process is colonization of the host, involving various surface proteins
52 (10, 16, 18). The best characterized colonization factors are the major surface proteins of *C.*
53 *difficile,* the two S-layer proteins, the HMW (high molecular weight)-SLP and the LMW (low
54 molecular weight)-SLP (1). These two proteins are derived from a common precursor SlpA,
55 after cleavage by the cysteine protease, Cwp84 (5, 13). Cwp84 is mainly surface-associated,
56 but has also been recovered from the extracellular medium. It displays proteolytic activity
57 toward some extracellular matrix proteins (ECM) (11). Recently, it has been suggested that
58 the protease Cwp84 also has an essential role in the subcellular localization of other cell wall
59 proteins (6), and that its maturation process involves both exogenous and autocatalytic
60 processing, essentially at the bacterial cell surface (3, 6).
61 Previously, we have shown that in surface-associated protein extracts obtained in the
62 stationary growth phase, Cwp84 expressed different protein profiles depending on the growth
63 medium : in TY (Tryptone + Yeast extract, Difco), Cwp84 was primarily recovered as a ~80
64 kDa form, while in TYG (TY containing 0.5% glucose) the protease was recovered both as
65 the ~80 kDa form and as a 47 kDa-form, tightly associated with the underlying cell wall (3)
66 (Figure 1). The form of ~80 kDa is undoubtedly the 77 kDa form without the propeptide
67 described by de la Riva *et al.* associated to the S-layer, and responsible for the cleavage of
68 SlpA. The form of 47 kDa band may correspond to the cleaved mature form of the protease
69 (3, 6). This difference suggests that glucose could have a regulatory role in the maturation
70 process of Cwp84 or in its subcellular localization. The fermentative metabolism of glucose
71 by *C. difficile* results in the accumulation of organic acids and consequently to a decrease of

72 pH overtime. In TYG, we measured a pH shift from 7.4 to 6.0 at 8 h, and to 5.6 at 15 h, while
73 the pH of TY medium did not vary by more than 0.4 units after 15 h of growth.
74 Therefore, in this study, we analyzed the potential modulation of Cwp84 expression and
75 Cwp84 maturation in response to glucose and environmental acidification.
76 **Effect of glucose**. First, we checked that *C. difficile* growth curves were roughly similar in
77 TY and TYG media (Figure 2) for the strain 630. In a first set of experiments, we quantified
78 by real-time RT-PCR the level of *cwp84* transcription, from late exponential- (8 h) and
79 stationary-phase cultures (15 h). Total RNA was isolated from three independent cultures in
80 TY and in TYG media, as previously described (7). The kinetics of *cwp84* expression was
81 approximately similar whether or not glucose was added in culture media: in TY a 5-fold
82 *cwp84* transcription decrease was observed in the stationary phase as compared to the late
83 exponential-phase and a 1.5-fold slight decrease in TYG between the stationary and the end of
84 exponential phase. Thus, the transcription of *cwp84* gradually decreased over time in the two
85 media. Comparing the *cwp84* transcription in TY and TYG, a weak 3-fold over-expression of
86 *cwp84* was observed in the late exponential-phase in TYG *vs*. TY (2.90±1.40), while in the
87 stationary-phase the expression of *cwp84* was significantly increased 8-fold in glucose
88 containing media as compared to glucose free media (7.79±0.66, $p<0.05$). These results
89 suggested that the presence of glucose in the growth media results in a moderate up-regulation
90 of *cwp84* transcription, especially during the stationary phase. This was surprising since the
91 residual concentration of glucose, as measured by the Glucose (HK) Assay kit (Sigma), was
92 1.64 $mg.ml^{-1}$ after 8 h of growth and only 0.05 $mg.ml^{-1}$ after 15 h. Therefore, we measured the
93 immediate effect of glucose on the c*wp84* expression by adding 0.5 % of glucose in TY
94 cultures. We, however, did not observe a significant modulation in the transcription level of
95 *cwp84* after 1h30 of incubation. Consequently, the increased expression of *cwp84* observed in
96 TYG is likely to be due to the drop of pH in the media throughout the period of growth.

97 **Effect of acidic pH due to glucose metabolism**. Then, we performed RNA and proteins
98 quantification in a TYG buffered media (by addition of 150 mM MOPS [3-
99 morpholinopropane-1-sulfonic acid], pH 7.4) and consequently maintained constant around
100 7.4. Extraction of proteins was performed in duplicate, as described elsewhere (2) and the
101 Cwp84 amount was measured by densitometry analysis of immunoblots performed on glycin
102 extracts with specific anti-Cwp84 antibodies, as previously (3). We chose to evaluate the
103 amount of S-layer associated Cwp84, since it has been shown previously that the protease was
104 mainly found in this subcellular location (11).
105 The *C. difficile* growth yield was comparable in TYG and TYG-MOPS (Figure 2). We
106 observed a steady transcription of *cwp84* (1.34 fold) in the late exponential-phase but a
107 100-fold decrease in the stationary-phase in bacteria grown in TYG-MOPS as compared to
108 bacteria grown in TYG (data not shown). These results were correlated with the Cwp84
109 amount in the S-layer proteins extracts. The amount of the 77 KDa form was similar at 8 h in
110 bacteria grown either in TYG or TYG-MOPS. In contrast, at 15 h the amount of Cwp84 77
111 KDa form was lower in bacteria grown in TYG-MOPS as compared to bacteria from TYG
112 (Figure 3A). Together, these results are in favor for an up-regulation of the *cwp84* expression
113 by the resulting acidic pH rather than a direct effect of glucose.
114 Furthermore, in the cell surface-associated proteins extracts, the Cwp84 proteolytic process
115 observed in TYG was not observed in MOPS (Figure 3B). This suggests that the acidic pH
116 could also play a role in the modulation of the Cwp84 maturation process. To address this
117 question, we purified the recombinant protein $Cwp84_{30\text{-}803}$ (whole protein without peptide
118 signal) (3) under pH 8.0 or 5.8 buffer conditions.
119 **Effect of acidic pH on the maturation process of recombinant Cwp84.** The purification of
120 Cwp84 was performed as previously described except that all solutions used were buffered at
121 pH 5.8 or pH 8.0. SDS-PAGE analysis showed that the recombinant protease purified in

122 acidic conditions was converted in the mature form of 47 KDa during the purification, while
123 this mature form was not observed in the elution fractions recovered from purification at pH
124 8.0 (Figure 4). This result suggests that the acidic pH has an effect on the Cwp84 proteolytic
125 process, leading to the complete maturation of Cwp84.
126
127 Growth of *C. difficile* at an acidic pH, associated or not with sugar metabolism, led to
128 enhanced Cwp84 maturation process, as previously described for other proteases (12, 14).
129 During the course of infection, after spore germination, *C. difficile* encounters a gradual
130 decrease in pH along the digestive tract. Indeed, it has been shown that an acid colonic
131 environment occurs not only in patients with Crohn's disease but also in normal children and
132 in normal adults (8, 9, 15). The two major forms of Cwp84, encoded by the single gene
133 *cwp84,* are supposed to have different targets for their proteolytic activities. The S-layer
134 associated 77 kDa form may cleave the SlpA precursor (6) and the 47 kDa, found both as a
135 surface-associated protein and as an extracellular protein, may degrade some ECM proteins
136 (3). In response to pH modification in the colonic micro-environment, *C. difficile* could both
137 increases the production of the protease and initiates the release of the 77 KDa form from its
138 surface, followed by its cleavage in the mature 47 kDa form. A differential partitioning of
139 Cwp84 under different pH conditions could therefore participate to the adaptation of Cwp84
140 to the host microenvironment.
141

142 **ACKNOWLEDGEMENTS**

143 This work was supported in part by a Ph.D. grant awarded to Diana Chapeton Montes by the
144 French Ministry of Higher Education and Research. We are grateful to Claire Dubois for her
145 help in experimentations and to Claudine Deloménie for her kind assistance in RT-PCR
146 analyses.

147 **REFERENCES**

148

149 1. **Calabi, E., F. Calabi, A. D. Phillips, and N. F. Fairweather.** 2002. Binding of
150 *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. Infect Immun
151 **70:**5770-5778.

152 2. **Calabi, E., S. Ward, B. Wren, T. Paxton, M. Panico, H. Morris, A. Dell, G.**
153 **Dougan, and N. Fairweather.** 2001. Molecular characterization of the surface layer
154 proteins from *Clostridium difficile*. Mol Microbiol **40:**1187-1199.

155 3. **ChapetonMontes, D., T. Candela, A. Collignon, and C. Janoir.** 2011. Localization
156 of the *Clostridium difficile* cysteine protease Cwp84 and insights into its maturation
157 process. J Bacteriol **193:**5314-5321.

158 4. **Cloud, J., and C. P. Kelly.** 2007. Update on *Clostridium difficile* associated disease.
159 Curr Opin Gastroenterol **23:**4-9.

160 5. **Dang, T. H., L. de la Riva, R. P. Fagan, E. M. Storck, W. P. Heal, C. Janoir, N. F.**
161 **Fairweather, and E. W. Tate.** 2010. Chemical probes of surface layer biogenesis in
162 *Clostridium difficile*. ACS Chem Biol **5:**279-285.

163 6. **de la Riva, L., S. E. Willing, E. W. Tate, and N. F. Fairweather.** 2011. Roles of
164 cysteine proteases Cwp84 and Cwp13 in biogenesis of the cell wall of *Clostridium*
165 *difficile*. J Bacteriol **193:**3276-3285.

166 7. **Deneve, C., C. Delomenie, M. C. Barc, A. Collignon, and C. Janoir.** 2008.
167 Antibiotics involved in *Clostridium difficile*-associated disease increase colonization
168 factor gene expression. J Med Microbiol **57:**732-738.

169 8. **Fallingborg, J., L. A. Christensen, M. Ingeman-Nielsen, B. A. Jacobsen, K.**
170 **Abildgaard, and H. H. Rasmussen.** 1989. pH-profile and regional transit times of the
171 normal gut measured by a radiotelemetry device. Aliment Pharmacol Ther **3:**605-613.

172 9. **Fallingborg, J., L. A. Christensen, M. Ingeman-Nielsen, B. A. Jacobsen, K.**
173 **Abildgaard, H. H. Rasmussen, and S. N. Rasmussen.** 1990. Measurement of
174 gastrointestinal pH and regional transit times in normal children. J Pediatr
175 Gastroenterol Nutr **11:**211-214.

176 10. **Hennequin, C., C. Janoir, M. C. Barc, A. Collignon, and T. Karjalainen.** 2003.
177 Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium*
178 *difficile*. Microbiology **149:**2779-2787.

179 11. **Janoir, C., S. Péchiné, C. Grosdidier, and A. Collignon.** 2007. Cwp84, a surface-
180 associated protein of *Clostridium difficile*, is a cysteine protease with degrading
181 activity on extracellular matrix proteins. J Bacteriol **189:**7174-7180.

182 12. **Khan, A. R., and M. N. James.** 1998. Molecular mechanisms for the conversion of
183 zymogens to active proteolytic enzymes. Protein science : a publication of the Protein
184 Society **7:**815-836.

13. **Kirby, J. M., H. Ahern, A. K. Roberts, V. Kumar, Z. Freeman, K. R. Acharya, and C. C. Shone.** 2009. Cwp84, a surface-associated cysteine protease, plays a role in the maturation of the surface layer of *Clostridium difficile*. J Biol Chem **284:**34666-34673.

14. **Rolland, S., C. Bruel, C. Rascle, V. Girard, G. Billon-Grand, and N. Poussereau.** 2009. pH controls both transcription and post-translational processing of the protease BcACP1 in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. Microbiology **155:**2097-2105.

15. **Sasaki, Y., R. Hada, H. Nakajima, S. Fukuda, and A. Munakata.** 1997. Improved localizing method of radiopill in measurement of entire gastrointestinal pH profiles: colonic luminal pH in normal subjects and patients with Crohn's disease. Am J Gastroenterol **92:**114-118.

16. **Tasteyre, A., M. C. Barc, A. Collignon, H. Boureau, and T. Karjalainen.** 2001. Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. Infect Immun **69:**7937-7940.

17. **Voth, D. E., and J. D. Ballard.** 2005. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. Clin Microbiol Rev **18:**247-263.

18. **Waligora, A. J., C. Hennequin, P. Mullany, P. Bourlioux, A. Collignon, and T. Karjalainen.** 2001. Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. Infect Immun **69:**2144-2153.

Figure legends

Figure 1. **Partitioning of the different Cwp84 forms according to the growth media**. Immunoblot analysis was carried out on 10 µg of cell surface-associated proteins bacteria, grown in medium without (lane 1) or with glucose (lane 2). Cell surface-associated proteins were recovered by an abrasive method after an enzymatic degradation of the cell wall. At 8h, anti-Cwp84 antibodies reacted only with a ≈80 kDa form, while at 15 h Cwp84 was recovered as the ~80 kDa form and the mature 47 kDa-form.

217 **Figure 2. *C. difficile* growth curve in different media and *cwp84* expression in the**
218 **stationary growth phase as compared to the late exponential growth phase.** *C. difficile*
219 630 was grown at 37°C in an anaerobic chamber, in TY, TYG or TYG-MOPS. Growth was
220 followed by assessment of the CFU/ml. The expression of *cwp84*, quantified by RT-PCR, is
221 showed as the percentage of transcription level after 15 hours of growth as compared to the
222 transcription level in the late-exponential phase (8 h): a 5-fold decrease and a 1.5-fold
223 decrease were observed in TY and TYG, respectively. Symbols; ♦ $CFU.ml^{-1}$ in TY, ■
224 $CFU.ml^{-1}$ in TYG and ▲ $CFU.ml^{-1}$ in TYG-MOPS.
225
226 **Figure 3. Effect of acidic pH due to glucose metabolism**. Immunoblot analysis was carried
227 out on proteins extracts from bacteria grown in medium with glucose, buffered or not with
228 MOPS 150 mM, after 8h or and 15h of growth. (A) In the S-layer proteins, extracted by the
229 low-pH glycin method, the amount of the Cwp84-77 KDa form was determined by
230 densitometry scanning and the results are presented as mean and standard deviation values of
231 two independent experiments. (B) In the cell surface-associated proteins extracts, anti-Cwp84
232 antibodies reacted with intermediaries and the mature 47 KDa form in TYG (lane 1), and with
233 a ~80 KDa and ~70KDa forms in TYG-MOPS (lane 2).

234 **Figure 4. Effect of acidic pH on the Cwp84 maturation process**. SDS-PAGE analysis was
235 carried out on $Cwp84_{30\text{-}803}$ purified under buffered conditions of pH 5.8 or pH 8.0. The acidic
236 pH seems to promote the proteolytic process leading to the mature form of 47 KDa.
237

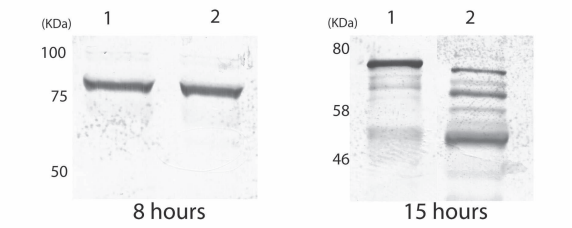


Figure 1.

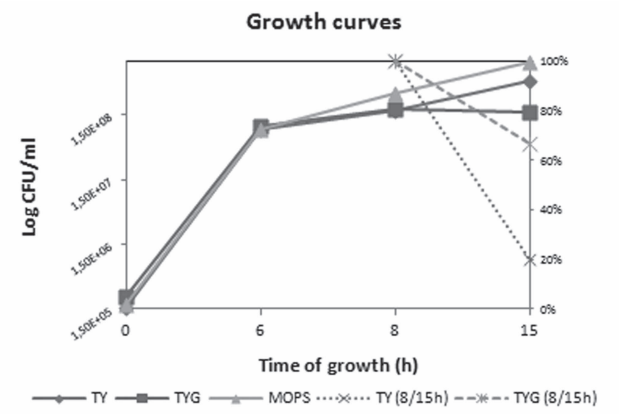

Growth curves
Log CFU/ml
1,50E+08
1,50E+07
1,50E+06
1,50E+05
0
6
8
15
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Time of growth (h)
TY
TYG
MOPS
TY (8/15h)
TYG (8/15h)

Figure 2.

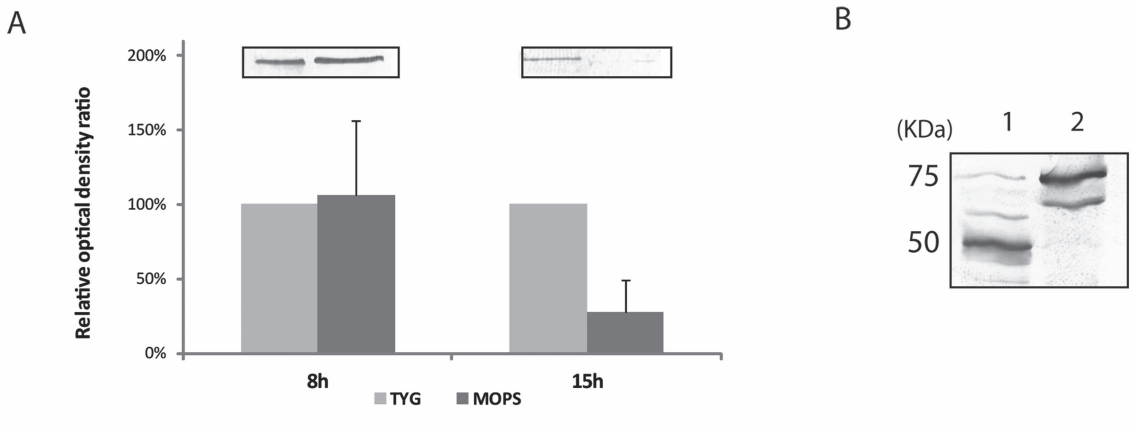

A
B
Relative optical density ratio
200%
150%
100%
50%
0%
8h
15h
TYG
MOPS
(KDa)
1
2
75
50

Figure 3.

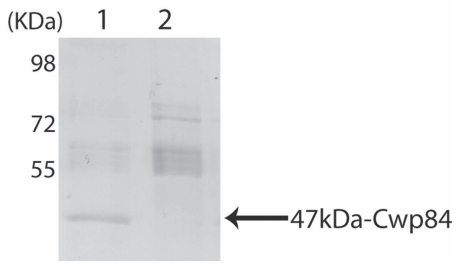


Figure 4.

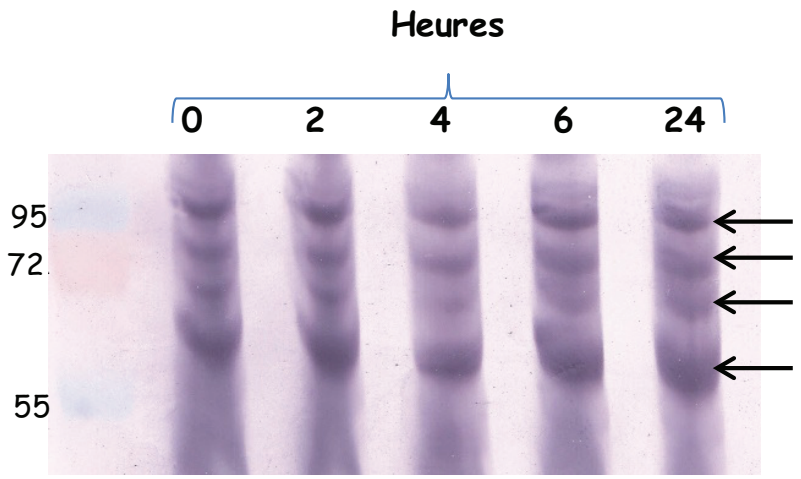


Figure 19. Impact d'un lysat de *E. coli* sur la protéase purifiée $Cwp84_{C116A}$. La protéase mutée purifiée est mis en contact avec un extrait de *E. coli* à volume équivalent (100 µl) et l'ensemble est incubé 2, 4, 6 ou 24 heures à 37°C. Le profil des fractions purifiées reste inchangé, suggérant que *E. coli* n'est pas capable de dégrader et/ou cliver la protéase recombinante.

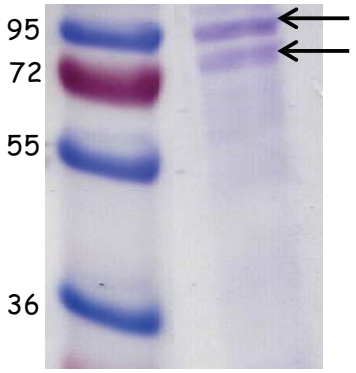


Figure 20. Purification de la protéine recombinante $Cwp84_{30-803}$ en présence d'urée 8M. L'ensemble de la purification de $Cwp84_{30-803}$ est menée en conditions dénaturantes, par ajout d'urée 8M dans tous les tampons de la purification. Après élution de la protéine par un gradient d'imidazole, nous observons deux formes de la protéase pouvant correspondre à la forme totale, et une première forme intermédiaire.

4. Autres résultats

4.1. Processus protéolytique et/ou dégradation pendant la purification ?

Afin de nous assurer que les clivages observés pendant la purification des protéases recombinantes $Cwp84_{30\text{-}803}$ et $Cwp84_{C116A}$ n'étaient pas produits par des protéases cytoplasmiques de *E. coli* et/ou pendant la purification, des expériences complémentaires ont été réalisées.

4.1.1. Impact d'un lysat de *E. coli* sur la $Cwp84_{C116A}$

La purification de la protéase mutée $Cwp8_{4C116A}$ se traduisant par la présence dans les fractions d'élution de la forme totale et de formes intermédiaires, nous avons voulu vérifier que des protéases de *E. coli* n'étaient pas à l'origine de ce phénomène. Ainsi, nous avons mis en contact, à volume équivalent, la protéase $Cwp84_{C116A}$ avec un extrait de *E. coli* BL21 pendant 0, 2, 4, 6 et 24 heures. Comme le montre la figure 19, le profil de la protéase $Cwp84_{C116A}$ n'est pas modifié après 24 h d'incubation. Ce résultat montre que la souche de *E. coli* dans laquelle ont été produites les différentes formes de la Cwp84 au cours de nos travaux, ne possède pas de protéases capables de cliver et/ou dégrader la protéase recombinante.

4.1.2. Purification de $Cwp84_{30\text{-}803}$ avec l'urée

Une deuxième expérience nous a permis de confirmer que les clivages de la protéase recombinante observés au cours des purifications ne sont pas liés à des protéases cytoplasmiques de *E. coli*. Nous avons réalisé une purification de la protéine recombinante $Cwp84_{30\text{-}803}$ en conditions dénaturantes (ajout d'urée 8M dans les différents tampons de purification). Dans ces conditions, nous observons deux bandes pouvant correspondre à la forme totale et à une première forme intermédiaire (Figure 20), les autres formes intermédiaires et la forme mature de 47 kDa ne sont pas observées. Ces résultats nous

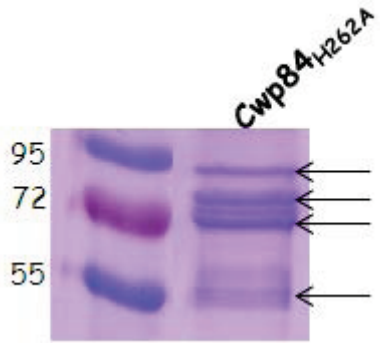


Figure 21. Purification de la protéine recombinante Cwp84$_{H262A}$. L'analyse SDS-PAGE de la protéine recombinante purifiée, montre un profil complexe avec la forme de ≈77 kDa et des formes intermédiaires, mais sans la présence de la bande mature de 47 kDa.

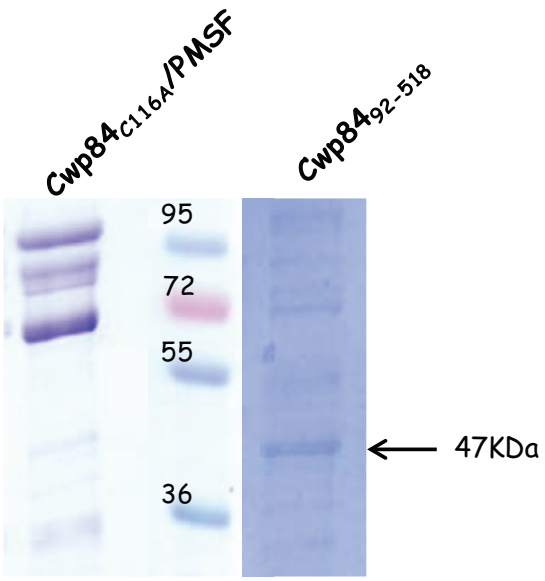


Figure 22. Purification de la protéine recombinante Cwp84$_{C116A}$ en présence de PMSF 1 mM. L'analyse SDS-PAGE de la protéine purifiée à pH 8,0 en présence d'un inhibiteur des sérine protéases (PMSF) met en évidence des bandes majoritaires correspondant à la forme totale et à certaines formes intermédiaires. La protéine recombinante Cwp84$_{92-518}$ a été utilisée comme témoin de la forme mature de 47 KDa.

permettent de conclure que la majorité des clivages à l'origine des formes intermédiaires et de la forme clivée mature de 47 kDa ne sont pas le produit d'une dégradation par *E. coli*. Toutefois, il semble y avoir un premier clivage de type exogène au cours de la production de la protéase par *E. coli*.

4.2. Purification des protéases mutées : Cwp84$_{H262A}$ et du double mutant Cwp84$_{C116A/H262A}$

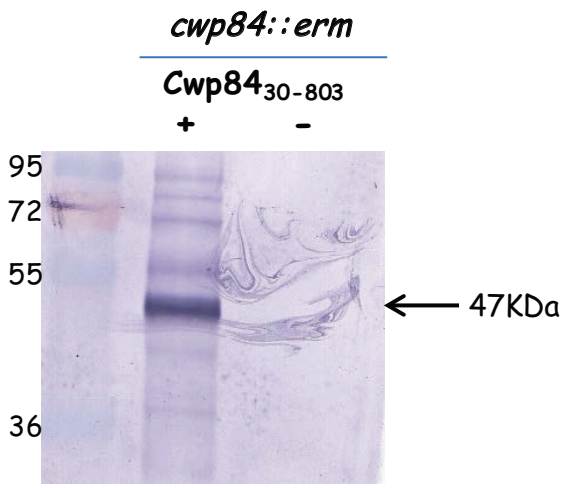
La purification de la protéase Cwp84$_{C116A}$, mutée sur la cystéine du site actif, se traduisant par un profil complexe avec la forme de ≈77 kDa et des formes intermédiaires, nous avons décidé d'étudier le rôle de l'histidine de la triade catalytique dans le processus protéolytique de la protéase. Nous avons donc construit un mutant au niveau de l'histidine 262, Cwp84$_{H262A}$ et un double mutant Cys/His, Cwp84$_{C116A/H262A}$. La purification de ces deux mutants se traduit par un profil quasi semblable à celui de la protéase mutée sur la cystéine, avec une forme de ≈77 kDa et des formes intermédiaires, mais sans la présence de la bande mature de 47 kDa (Figure 21).

4.3. Purification de la souche mutante Cwp84$_{C116A}$ avec PMSF

L'analyse de la séquence de la protéase Cwp84 délétée des séquences contenant le site actif cystéine protéase, grâce à la base de données des peptidases MEROPS, a permis de mettre en évidence la présence d'un site actif potentiel de type sérine protéase. Ainsi, la séquence correspondant aux acides aminés 301-803 présente une identité de 26,9% avec une peptidase de *Leadbetterella byssophila* appartenant à la sous-famille S8A (« non attribuée ») des sérine protéases, le site actif potentiel étant localisé au niveau de l'acide aminé Ser418. Elle présente également une identité (22,0%) avec une peptidase associée à la surface bactérienne de *Lactobacillus helveticus* appartenant à la famille S8 des sérine protéases, le site catalytique potentiel repéré dans ce cas étant la dyade Asp433 et Ser587.

Afin de déterminer si des étapes du processus protéolytique de la cystéine protéase ne sont pas dues à une activité sérine protéase, nous avons purifié la protéine recombinante Cwp84$_{C116A}$ en présence d'un inhibiteur de sérines protéases : le PMSF (flurorure de

A



B

Figure 23. Ré-association de la protéase recombinante Cwp84$_{30-803}$ à la surface de *C. difficile*. A. La protéase recombinante est capable de s'associer à la surface de la souche 630Δ*erm::cwp84*, majoritairement sur la forme mature. **B.** Différentes concentrations de la protéase sont incubées avec 100 µg de peptidoglycane (PG) de *C. difficile* contenant les polysaccharides associés, pendant 1 heure dans 100 µl de PBS pH 7,4. Le contrôle positif (+) est la protéase recombinante, le contrôle négatif (-) est composé de PG seul.

phenylméthanesulfonyle), à la concentration finale de 1 mM (Figure 22). L'analyse des fractions d'élution en gel SDS-PAGE montre que leur profil est très semblable à celui observé lors de la purification de la $Cwp84_{C116A}$ sans PMSF (*cf.* article 1, figure 4A). En effet, la purification de $Cwp84_{C116A}$ avec ou sans PMSF se traduit par l'apparition de bandes correspondant à la forme totale, et aux formes intermédiaires. Ainsi, l'hypothèse de l'intervention d'un site sérine protéase dans le processus protéolytique de Cwp84 semble écartée.

4.4. Réassociation

Nous avons montré précédemment que la protéase recombinante $Cwp84_{92-518}$ (correspondant à la forme mature) pouvait se ré-associer à la surface de *C. difficile* (*cf.* article 1, figure 6). Des essais supplémentaires ont été réalisés afin de déterminer à quelle structure de la paroi était réassociée la protéase. Les bactéries provenant d'une culture en phase stationnaire (en milieu TGY) de la souche mutée 630Δ*erm::cwp84*, ont été mises en contact avec 20 µg de la protéase $Cwp84_{30-803}$, le tout a été incubé pendant 1 heure en anaérobiose, et une extraction des protéines de surface a été réalisée. Nous observons une réassociation majoritaire de la forme de 47kDa (Figure 23A). Nous avons par la suite réalisé une extraction du peptidoglycane de la souche 630, selon une technique décrite précédemment (47). Les essais réalisés montrent une réassociation de la protéase $Cwp84_{30-803}$ à cette structure, concentration-dépendante. Cette purification nous ayant permis de récupérer le peptidoglycane ainsi que les polysaccharides qui lui sont associés, ce résultat suggère que la protéase est capable de se ré-associer soit directement au peptidoglycane, soit aux polysaccharides (Figure 23B).

4.5. Activité protéolytique des cultures bactériennes

Des cultures en phase stationnaire dans différents milieux de culture TY, TGY et MOPS sont centrifugées afin de récupérer d'une part le surnageant, et d'autre part, les bactéries. L'activité protéolytique est mesurée sur ces différentes fractions, en utilisant comme substrat l'azocaséine. Les surnageants (100 µl) et les bactéries (remises en suspension dans 100 µl de Tris 25 mM pH 7,5) sont donc incubés avec une solution à 5 mg/ml d'azocaséine pendant 8 h.

	DO 336nm	
Milieu	**Bactérie**	**Surnageant**
TY	0,104	0,744
TYG	0,221	1,322
MOPS	0,347	1,117

Tableau 3. Activité protéolytique de la bactérie et du surnageant sur l'azocaséine. Les bactéries et le surnageant issus d'une culture de 15 h sont mis en contact avec le substrat azocaséine (5 mg/ml en tampon Tris 25 mM pH 7,5). Après 8 h d'incubation, de l'acide trichloracétique à la concentration finale de 5% est ajouté afin de précipiter l'azocaséine qui n'a pas été digérée. La quantité de résidu chromogène relarguée dans le surnageant lors de la digestion de l'azocaséine est mesurée par son absorbance à 336 nm.

La quantité de résidu chromogène relarguée dans le surnageant lors de la digestion de l'azocaséine est mesurée par son absorbance à 336 nm. Nous observons d'une part que l'activité est plus importante dans le surnageant quel que soit le milieu de culture d'origine, et d'autre part qu'elle est plus importante dans les milieux avec glucose à pH constant ou variable (Tableau 3).

4.6. Activité de la protéase sur les protéines recombinantes de la couche S

Afin d'analyser l'effet de la protéase recombinante $Cwp84_{30\text{-}803}$ sur les protéines de la couche S, des protéines recombinantes rSlpA, rHMW et rLMW aimablement fournis par le Dr N. Fairweather (Imperial College, London) ont été utilisées. Les protéines recombinantes du précurseur et des protéines de la couche S ont été incubées seules ou en présence de différents ratios [1:1 et 1:10 (m:m) enzyme:substrat] de $Cwp84_{30\text{-}803}$ en solution Tris 25 mM, pH 7,5 et en présence de DTT 2 mM, pendant 4 heures à 37°C. Des analyses par gel SDS-PAGE et immunoblot nous ont permis de montrer que dans les conditions utilisées, la protéase recombinante n'est pas capable de cliver le précurseur rSlpA, mais elle semble plutôt le dégrader, de même que la protéine rHMW. En revanche, la protéine rLMW semble être clivée par la protéase (Figure 24B). Sur la figure 24A, nous observons que sur les puits substrat:enzyme à ratio 1:1, la protéase est retrouvée essentiellement sous la forme mature de 47 kDa après incubation avec les protéines recombinantes de la couche S ; en revanche, lorsqu'elle est mise en contact avec le précurseur rSlpA nous observons des formes intermédiaires mais pas la forme mature.

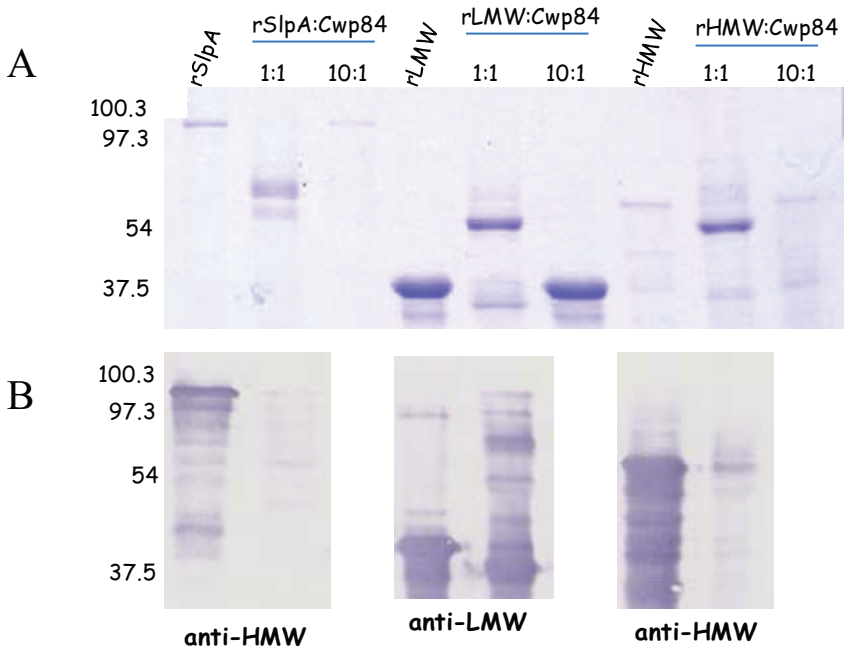


Figure 24. Activité protéolytique de la protéase recombinante Cwp84$_{30\text{-}803}$ sur des protéines recombinantes de la couche S : rSlpA, rLMW et rHMW. A. Gel SDS-PAGE ; **B**. Immunoblot réalisé avec des anticorps spécifiques aimablement fournis par le Dr N. Fairweather (Imperial College, London). L'incubation a lieu 4 h à 37°C. Au ratio 1:1 la Cwp84 semble dégrader le précurseur SlpA, de même que la protéine HMW-SLP. En revanche, la protéase clive la protéine SLP-LMW. On notera que la protéase est retrouvée essentiellement sous sa forme mature de 47 KDa après incubation avec les LMW- et HMW-SLP, mais il persiste des formes intermédiaires lorsqu'elle est mise en contact avec le précurseur SlpA

5. Discussion

L'étude des mécanismes de la colonisation de l'hôte par *C. difficile* est importante pour la compréhension globale de la pathogénicité de cette bactérie. Nous avons travaillé sur la première protéase caractérisée chez *C. difficile*, Cwp84, principalement du point de vue de sa répartition cellulaire qui semble varier en fonction de sa maturation.

➢ *Processus de maturation de la protéase recombinante et corrélation avec la protéase native*

Au cours de la première étude portant sur cette protéase, il avait été suggéré que la protéase recombinante $Cwp84_{30\text{-}803}$ présentait un processus de maturation autocatalytique. En effet, cette protéase recombinante est capable de se maturer en conditions réductrices (DTT 2 mM), ou plus lentement en conditions non réductrices, aboutissant en quelques heures à la formation d'une protéine mature d'environ 50 kDa (139). Nos premiers travaux ont donc porté sur la caractérisation de ce phénomène de maturation de la protéase recombinante.

Nous avons vérifié que la présence de ces différentes formes de la protéase n'était pas le reflet d'une dégradation de la protéase recombinante par des protéases cytoplasmiques de *E. coli*, mais correspondait bien à des produits de maturation de la protéase. Nos résultats suggèrent qu'un seul clivage, menant à une forme intermédiaire, pourrait être lié à une dégradation de la protéase recombinante lors de sa production chez *E. coli*.

Nous avons montré que le processus de maturation de la protéase recombinante $Cwp84_{30\text{-}803}$ a lieu selon un processus séquentiel qui commence dans le domaine C-terminal, suivi par un ou plusieurs clivages dans le domaine N-terminal qui mènent à la forme finale $Cwp84_{92\text{-}518}$. Cette forme correspond à ce que nous avons appelé la forme clivée définitive ou forme mature, dont la masse expérimentale a été déterminée à 47 kDa. Le processus séquentiel de maturation impliquant plusieurs formes intermédiaires est fréquent parmi les cystéines protéases. En particulier, huit intermédiaires ont été décrits lors de la maturation de la cystéine protéase recombinante de *Streptococcus pyogenes* (61).

In vivo, à la surface la bactérie, la forme majoritaire retrouvée est une forme de 77 kDa associée aux protéines de la couche S (60, 73). Cette forme correspond à la protéine totale ayant perdu son pro-peptide, (acides aminées 92 à 803) (73). Une autre forme peut également être mise en évidence, de poids moléculaire approximatif 50 kDa, dans la fraction sécrétée et dans les extraits pariétaux de *C. difficile*, après croissance de la bactérie jusqu'à la phase stationnaire en milieu TYG (60). Nous pensons que cette forme correspond à la forme mature de 47 kDa ($Cwp84_{92-518}$) définie précédemment. Mais jusqu'alors, nos tentatives pour purifier cette forme à partir de la fraction extracellulaire par immunoprécipitation ou à partir d'un extrait de protéines de surface par chromatographie liquide, se sont soldées par des échecs.

Toutefois, dans la bactérie, le processus protéolytique de Cwp84 semble être un peu différent de celui de la protéase recombinante. Dans la bactérie, le premier clivage correspond vraisemblablement à l'hydrolyse du pro-peptide (acides aminés 30-91) pour donner naissance à la forme de 77 kDa, associée aux protéines de la couche S. Ce clivage semble être en majorité d'origine exogène, la protéase impliquée étant une autre cystéine protéase également associée à la surface bactérienne, Cwp13, comme le montrent des travaux récents, réalisés dans une souche mutée pour le gène *cwp13* et complémentée. Cette cystéine protéase est elle-même activée par un processus autocatalytique (73).

Les différences observées sur la séquence des clivages entre la protéase dans la bactérie (premier clivage en N-terminal) et la protéase recombinante (premier clivage en C-terminal) peuvent être liées à la différence d'environnement de ces deux formes : associée à une couche protéique dans le premier cas et en solution dans le deuxième, ce qui peut être à l'origine de différences de force ionique et de conformation suffisantes pour modifier les acides aminés substrats de la protéase.

D'autre part, de la Riva *et al*. ont montré que le clivage du pro-peptide de la protéase dans la bactérie n'est pas autocatalytique alors que notre hypothèse est que les différents clivages observés sur la protéase recombinante (y compris le clivage du pro-peptide) sont liés, au moins partiellement, à une activité en *cis* ou en *trans* de la protéase elle-même. Il faut d'ailleurs noter que l'inactivation de la protéase Cwp13 ne se traduit pas par une inhibition totale du clivage du pro-peptide de Cwp84, mais seulement partielle, ce qui suggère l'existence d'un autre mécanisme de clivage du pro-peptide (Figure 23). Pour essayer de comprendre l'origine des clivages de la protéase recombinante, nous avons purifié la protéase

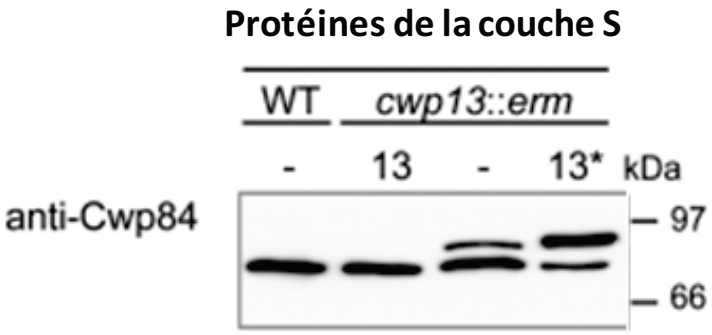


Figure 25. Processus de maturation de la protéase Cwp84 dans un mutant *cwp13* (*cwp13 ::erm*), d'après les travaux de la Riva *et al.* (73)**.** Chez la souche sauvage (WT) et la souche mutée complémentée (13), la protéase Cwp84 est observée sous la forme de 77 KDa correspondant au clivage du pro-peptide, tandis que dans la souche mutée (-) et celle complémenté avec la protéase Cwp13 mutée sur le site actif, $Cwp13_{C109A}$, (13*), la protéase Cwp84 est observée sous deux formes, correspondant à la forme totale et à la forme sans pro-peptide. Ces résultats suggèrent que la protéase *cwp13* joue un rôle dans le clivage de la protéase Cwp84, mais qu'il existe également un autre mécanisme indépendant de clivage du pro-peptide de Cwp84.

recombinante mutée au niveau de la cystéine active 116, $Cwp84_{C116A}$. Chez *C. difficile*, cette mutation entraîne l'apparition du précurseur SlpA des protéines de la couche S, ce qui témoigne de l'importance de cet acide aminé dans l'activité protéolytique de la protéase vis à vis de ce substrat (73). La purification de la protéine recombinante $Cwp84_{C116A}$ se traduit par un profil avec la forme totale et au moins trois formes clivées intermédiaires (Figure 4, article 1), sans la présence de la forme clivée mature de 47 kDa ; l'activité protéolytique sur azocaséine de cette protéase mutée est totalement absente, ce qui témoigne de la réelle inactivation de la protéase. De la même manière, des résultats préliminaires montrent que la purification du mutant $Cwp84_{H262A}$ ou du double mutant $Cwp84_{C116A/H262A}$ aboutit au même profil. Ces résultats suggèrent qu'une partie du processus protéolytique serait due à un mécanisme ne dépendant pas de l'activité liée à la cystéine et à l'histidine de la triade catalytique. Une analyse plus fine de la séquence peptidique nous a révélé la présence d'une homologie avec des sites de sérine protéase. Bien que cette homologie soit faible, il nous a semblé intéressant de réaliser une purification de la $Cwp84_{C116A}$ en présence d'un inhibiteur de sérine protéases (PMSF) afin de vérifier si le processus de maturation observé n'était pas du à ce site, mais nous avons encore retrouvé le même profil. Les acides aminés cystéine et histidine du site actif responsable de l'activité protéolytique de la Cwp84 ne semblent donc pas impliqués dans le processus d'automaturation. Deux hypothèses peuvent être évoquées pour expliquer ces résultats : d'une part, le troisième acide aminé de la triade catalytique classique des cystéine protéases, l'asparagine en position 287, pourrait jouer un rôle important dans le processus autocatalytique, comme cela a été montré pour SpeB (61) ; d'autre part, les clivages pourraient être liés à des attaques nucléophiles d'acides aminés différents de la triade catalytique, comme cela a été évoqué pour certains autotransporteurs des bactéries à Gram négatif (72). La mutation de l'asparagine 287 dans la protéase $Cwp84_{30\text{-}803}$ et dans la protéase mutante $Cwp84_{C116A}$ est en cours afin d'apporter une réponse à la première hypothèse.

➢ *Localisation et rôle*

La localisation de la protéase dans les extraits de protéines de la couche S n'est pas surprenante puisque l'un des rôles majeurs de Cwp84 dans la physiologie bactérienne est le clivage du précurseur SlpA en protéines matures de la couche S. Il est donc naturel de penser que la forme de 77 kDa est bien responsable du clivage du précurseur de la couche S.

Cependant, nos expériences ont montré que la protéase recombinante $Cwp84_{30-803}$ n'est pas capable, dans les conditions expérimentales choisies, de cliver le précurseur SlpA recombinant pour libérer les deux protéines de la couche S (Figure 22). Plusieurs explications peuvent être proposées : 1) les conditions de l'expériences (pH, température, force ionique,...) n'étaient pas adéquates pour l'expression de l'activité protéolytique de Cwp84 sur SlpA ; 2) l'ancrage de Cwp84 dans la couche S est indispensable à son activité protéolytique sur le précurseur, pour des raisons stériques et/ou de cinétique, comme cela a été montré pour la maturation de l'hémagglutinine filamenteuse (FHA) de *Bordetella pertussis* par la subtilisine, serine protéase qui doit être ancrée dans la membrane externe pour être capable de maturer la FHA (67) ; seule la forme de 77 kDa est capable de maturer SlpA, or dans nos conditions expérimentales, cette forme est rapidement transformée en forme de 47 kDa. La preuve absolue de l'activité de la forme de 77 kDa sur SlpA reste donc encore à apporter.

La localisation de la protéase dans la fraction sécrétée ainsi que associée à la surface cellulaire sous la forme de 47 kDa est plus surprenante. Nos expériences ont montré qu'il pourrait s'agir d'une réassociation de la forme sécrétée de 47 kDa sur un constituant de la paroi cellulaire. En effet, *in vitro*, nous avons montré que la forme mature recombinante $Cwp84_{92-518}$ est capable de se réassocier de manière spécifique à la paroi de la bactérie. Ce phénomène n'est pas totalement inhabituel. Ces dernières années, il a été suggéré pour un certain nombre de protéines de surface qu'elles étaient d'abord sécrétées avant d'être réassociées à la paroi, en particulier certaines adhésines. En effet, pour que des protéines capables de lier des composants de la matrice extracellulaire puissent jouer un rôle comme adhésine, leur localisation à la surface bactérienne est essentielle, vraisemblablement par un mécanisme de réassociation à des composants de la paroi (62). L'adhésine PavA de *S. pneumoniae* capable de lier la fibronectine ne possède pas des motifs d'ancrage à la paroi bactérienne et son mécanisme de sécrétion n'est pas connu. Chez *C. difficile*, la protéine de choc thermique GroEL semble être associée de cette manière à la paroi (128). En ce qui concerne Cwp84, le rôle physiologique de cette réassociation n'est pas encore compris. La forme extracellulaire de 47 kDa pourrait jouer un rôle dans la dégradation de certaines protéines de la matrice extracellulaire. Effectivement, nous avons montré qu'*in vitro*, la protéine recombinante $Cwp84_{30-518}$ (correspondant à la forme mature $Cwp84_{92-518}$ purifiée avec le pro-peptide) est capable de dégrader la fibronectine, de la même manière que la protéase $Cwp84_{30-803}$ en présence de DTT 2 mM (139). Bien que la forme $Cwp84_{30-518}$ ne corresponde pas à la forme

mature Cwp84$_{92\text{-}518}$ (47 kDa), elle est clivée en la forme mature de 47 kDa pendant la purification. Ainsi, nous ne pouvons pas exclure que la forme active soit bien la forme Cwp84$_{92\text{-}518}$. En effet, il a été montré auparavant que la purification de certaines cystéine protéases recombinantes directement sous leur forme mature se traduisait par des protéases dépourvues d'activité, suggérant que le pro-peptide jouerait un rôle dans le repliement correct des protéases et donc dans leur activité (40).

In vivo, la répartition différentielle de la protéase Cwp84 dans les différentes fractions, soit au niveau extracellulaire soit à la surface de *C. difficile,* pourrait ainsi permettre à la protéase de jouer des rôles variés pendant le processus de colonisation. Tandis qu'à la surface de la bactérie la Cwp84 jouerait un rôle dans la maturation de la couche S et de protéines associées comme Cwp2 et l'adhésine Cwp66 (73), la forme extracellulaire pourrait jouer un rôle dans la dissémination de la bactérie, en dégradant certaines des protéines de la matrice extracellulaire.

➢ *Influence des facteurs environnementaux*

Il est intéressant de noter que cette répartition différentielle semble soumise à un contrôle par certains facteurs environnementaux. Nous avions observé que la forme de 47 kDa associée à la paroi bactérienne apparaissait uniquement lorsque la bactérie était cultivée en phase stationnaire en milieu TGY (TY + glucose) (réactifs DIFCO) et non en milieu TY. Comme l'expression des gènes codant les toxines, *tcdA* et *tcdB*, est réprimée par le glucose et d'autres sucres sucres-PTS rapidement métabolisables (90), nous avons analysé l'expression et la répartition cellulaire de la protéase Cwp84 dans un milieu avec et sans glucose.

Nos résultats montrent que l'expression de la protéase Cwp84 n'est que très peu modifiée de manière directe par le glucose. En revanche, la surexpression de Cwp84 constatée dans le milieu TGY par rapport à un milieu TY semble liée à la diminution du pH consécutive au métabolisme fermentatif du glucose par *C. difficile*. Par ailleurs, en purifiant la protéase recombinante Cwp84$_{30\text{-}803}$ à deux pH, pH acide 5,8 et pH basique 8,0, nous avons montré que la protéase est convertie en la forme mature de 47 kDa uniquement à pH acide. Ce résultat suggère que le pH acide favoriserait la maturation complète de la protéase, par un dernier clivage de nature auto-protéolytique. La forme intermédiaire antérieure à ce clivage est en voie d'identification.

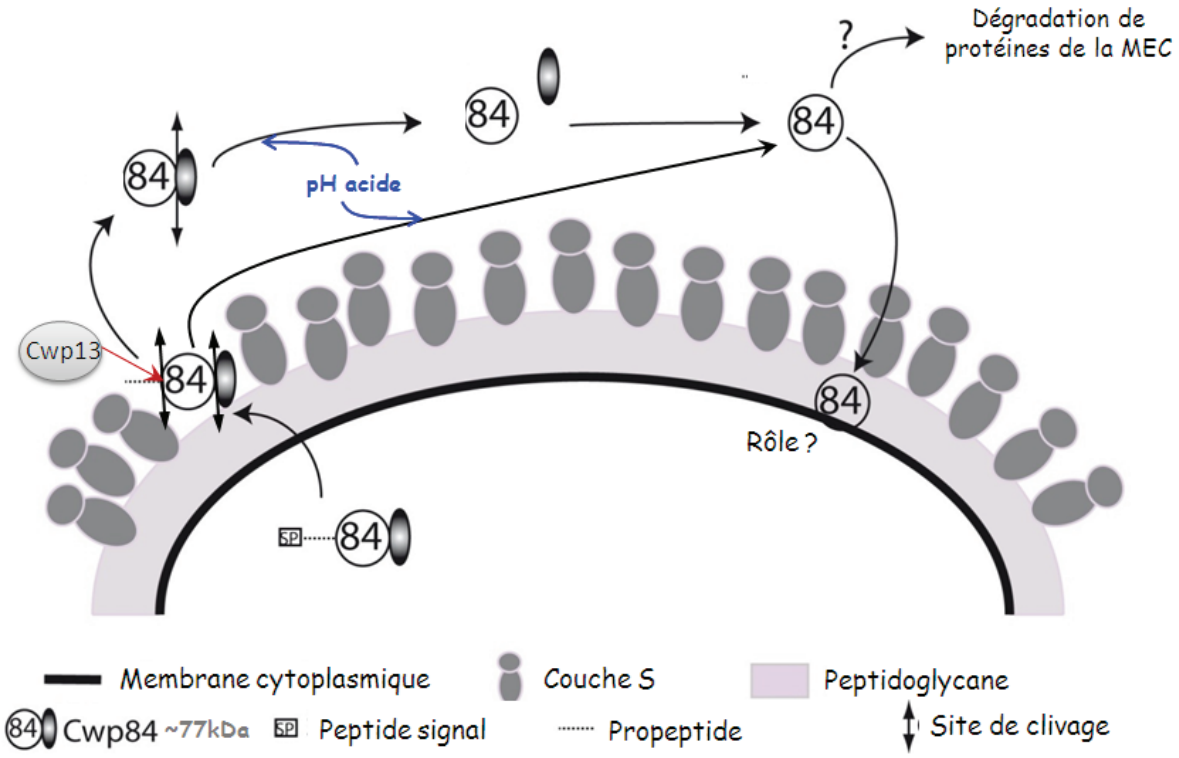


Figure 26. Modèle hypothétique du cycle de la protéase dans la physiopathologie de *C. difficile*. La protéase Cwp84 est synthétisée dans le cytoplasme sous forme de zymogène non actif, puis adressée à la membrane cytoplasmique où le peptide signal va être clivé. Au niveau de la couche S, le propeptide est clivé majoritairement par la cystéine protéase Cwp13, donnant naissance ainsi à la forme de 77 kDa associée aux protéines de la couche S, qui serait capable de cliver le précurseur de protéines de la couche S. La protéase peut être libérée dans le milieu extracellulaire, soit sous sa forme de 77 kDa, soit sous la forme de 47 kDa après maturation par un processus essentiellement autoprotéolytique, favorisée par un pH acide. Cette forme mature serait capable de dégrader les protéines de la matrice extracellulaire. Une partie de cette forme pourrait alors être réassociée à la paroi ; toutefois, le rôle physiologique de cette réassociation est inconnu.

Pour conclure, nous pouvons proposer un modèle hypothétique du rôle de la protéase Cwp84 dans la physiopathologie de *C. difficile* (Figure 26). La protéase Cwp84 est synthétisée dans le cytoplasme sous forme de zymogène non actif (139), puis adressée à la membrane cytoplasmique qu'elle traverse en perdant son peptide signal, vraisemblablement par le système Sec. Au niveau de la couche S, elle subit un clivage de son pro-peptide majoritairement lié à l'action de la protéase Cwp13, la forme de 77 kDa ainsi produite pouvant cliver le précurseur de la couche S. Au décours d'une infection chez un hôte, la bactérie transite le long du colon et est donc soumise à un pH acide qui peut atteindre un pH d'environ 6,0 (100, 268). La diminution du pH entraînerait une modification de conformation de la protéase associée à la couche S et l'activation de clivages sans doute autoprotéolytiques menant à la forme de 47 kDa, dépourvue des motifs Pfam 04122. Cette forme serait alors relarguée dans l'environnement et pourrait exercer son effet de destruction sur différentes protéines de la matrice extracellulaire. Une deuxième hypothèse pourrait être la libération de la forme de 77 kDa à l'occasion du renouvellement de la couche S, et sa maturation consécutive dans le milieu extérieur. Une partie de cette forme pourrait alors être réassociée à la paroi, le rôle de cette réassociation restant à définir. L'influence du pH pourrait favoriser la maturation de la protéase au niveau du côlon, en favorisant ainsi l'activation de Cwp84.

6. Conclusion et perspectives

Ce travail a permis d'affiner nos connaissances sur le processus protéolytique de la cystéine protéase Cwp84, sa modulation par les facteurs environnementaux et la localisation des différentes formes de la protéase dans la bactérie. Nos résultats nous ont permis de conclure à un processus d'activation de la protéase impliquant des clivages exogènes et autocatalytiques menant à la forme mature de la protéase de 47 kDa, ainsi qu'au réancrage de la forme mature. Nous avons aussi mis en évidence que le processus protéolytique est favorisé par un pH acide, lié ou non au métabolisme du glucose. La localisation de la protéase à la surface, ainsi que dans le milieu extracellulaire a été démontrée.

Le mécanisme précis du processus protéolytique reste à déterminer. La première perspective de ce travail est d'explorer le rôle du troisième acide aminé de la triade catalytique, l'asparagine 287, dans le processus protéolytique. La mutation de l'asparagine 287 dans la protéase $Cwp84_{30\text{-}803}$ et dans la protéase mutante $Cwp84_{C116A}$ est en cours, afin d'élucider le rôle de cet acide aminé dans le processus protéolytique.

L'hypothèse selon laquelle les différentes formes de la protéase pourraient avoir des substrats différents et jouer de ce fait un rôle spécifique à chacune dans la pathogenèse des infections est séduisante mais il reste à confirmer plusieurs données.

Nous ne connaissons pas le rôle exact de la forme de 77 kDa. Il a été montré qu'elle est associée aux protéines de la couche S, et un rôle dans le clivage de protéines de la couche S a été suggéré. Il paraît difficile de déterminer le rôle exact de cette forme car la purification de la protéase hors de la bactérie se traduit par un processus protéolytique avec l'accumulation de la forme mature de 47 kDa. À notre connaissance, il n'existe pas d'inhibiteurs de cystéine protéases parfaitement réversibles, ce qui rend délicat la purification d'une protéine active sous cette forme. Par ailleurs, il reste à identifier de manière certaine la forme extracellulaire mature de 47 kDa dans la bactérie et à confirmer son rôle dans la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire. D'autres tentatives de purification de cette forme vont être entreprises afin de vérifier qu'elle correspond bien à la protéase recombinante $Cwp84_{92\text{-}518}$; son activité protéolytique sur fibronectine sera également vérifiée.

Des analyses préliminaires nous ont permis de montrer que cette forme mature est capable de se ré-associer à la paroi de *C. difficile*, vraisemblablement à un constituant associé au peptidoglycane que nous n'avons pas encore identifié. Les acides teichoïques ou les polysaccharides neutres (105) semblent de bons candidats, mais cette hypothèse reste à confirmer. Enfin, le rôle physiologique de cette ré-association devra être identifié.

Régulation de la production des facteurs de virulence de *C. difficile* par l'environnement

1. Introduction

Comme nous l'avons dit précédemment, les facteurs de virulence sont finement régulés par les facteurs environnementaux, ce qui confère à la bactérie la faculté de s'adapter rapidement aux changements de milieu, qu'il s'agisse de température, de substrat carboné disponible, ou de pH, entre autres.

Dans la première partie des travaux personnels, nous avons décrit un effet du pH acide, lié ou non au métabolisme du glucose, sur l'expression et le processus protéolytique de la protéase. Waligora *et al.* avaient précédemment montré que l'incubation de *C. difficile* à pH acide 4,0 se traduisait par une adhésion plus importante de *C. difficile* à des cellules Vero, par rapport à une incubation des bactéries à pH 7,0. Les auteurs suggéraient une induction de l'expression d'adhésines à pH acide (312). Ainsi, nous avons décidé d'analyser l'effet d'un pH acide lié au métabolisme du glucose sur les protéines de surface de *C. difficile*, et plus particulièrement sur certains facteurs de virulence tels Cwp66, HMW-SLP et les protéines flagellaires.

La première partie de ce travail a porté sur la mise au point d'une cartographie du protéome de surface de la souche 630 en utilisant l'électrophorèse bidimensionnelle (2-D). Nous avons ensuite comparé le profil des protéines de surface extraites après culture de la souche 630 dans un milieu sans (TY) et avec glucose (TGY) par électrophorèse 2-D, afin de déterminer si la diminution du pH liée à la présence de glucose induisait une différence qualitative des profils. Cette étude a été complétée par une analyse comparative quantitative de certains facteurs de colonisation, au niveau protéique par la réalisation d'immunoblots avec des anticorps spécifiques, et au niveau transcriptomique par l'analyse de l'expression des gènes correspondants.

2. Matériel et méthodes

2.1. Souches bactériennes et conditions de culture

La souche de *Clostridium difficile* 630 (première souche entièrement séquencée), isolée d'un patient atteint de colite pseudo-membraneuse, a été cultivée en bouillon TY (tryptone et extrait de levure, DIFCO) ou TGY (TY additionné de 0,5% de glucose) en anaérobiose (Chambre de Freter, Jacomex) à 37 °C pendant 15 h. La souche est conservée congelée dans du BHI-glycérol à -80°C et décongelées sur gélose Columbia cystéinée enrichie en sang de cheval (4%).

2.2. Extraction des protéines de surface

L'extraction des protéines de surface est réalisée à partir de ces cultures en phase stationnaire selon une technique d'abrasement de la paroi bactérienne décrite précédemment par Wexler *et al*. (320) et modifiée par un traitement enzymatique préalable de la bactérie par la mutanolysine (Sigma) à une concentration finale de 60 µg/mL (*cf*. protocole Article 1).

2.3. Analyse des protéines de surface par immunoblot

Une quantité équivalente des protéines de surface extraites est analysée par immunoblot après transfert sur membrane de PVDF à partir d'un gel SDS-PAGE. Les membranes sont saturées toute une nuit en tampon de blocage (NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%, Tris-HCl 10 mM, lait écrémé 5%, pH 8,0), puis mises en contact avec le premier anticorps à la dilution appropriée pendant deux heures : anti-HMW/SLP (aimablement fournis par le Dr Neil Fairweather, Imperial College, London) au 1/1 000ème, anti-FliC au 1/2 000ème et anti-Cwp66-N-ter au 1/1 000ème. Après lavages, les membranes sont mises en contact avec un anticorps anti-immunoglobuline G de lapin conjugué à la phosphatase alcaline, dilué au 1/20 000ème en tampon de blocage pendant deux heures, puis à nouveau lavées. La révélation est effectuée en ajoutant le substrat de la phosphatase alcaline, une solution de nitro blue tetrazolium et de 5-bromo-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP).

2.4. Analyse des protéines de surface par électrophorèse 2-D

Après séparation des échantillons par électrophorèse bidimensionnelle, l'identification des protéines a été réalisée par spectrométrie de masse et recherche des homologies dans la base de données Mascot (disponible à l'URL : http://www.matrixscience.com). Cette technique a été réalisée en collaboration avec la plateforme TransProt de l'IFR141-IPSIT (Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique : du Fondamental au Médicament) de l'université Paris-Sud 11.

2.4.1. Préparation des échantillons

2.4.1.1. Précipitation et solubilisation des protéines

Afin de purifier et concentrer les échantillons, une précipitation des extraits de protéines de surface est réalisée avec le kit ProteoExtract™ Protein Precipitation (Calbiochem) selon les indications du fournisseur. Les protéines sont immédiatement remises en solution dans un tampon composé d'urée 7 M, thiourée 2 M, CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate) 3%, nonidet P-40 1%, tampon IPG (Immobilized pH Gradients) 0,5% et de quelques grains de bleu de bromophenol ; le dithiothréitol (DTT) est ajouté extemporanément à la solution de solubilisation, à une concentration finale de 1%.

L'urée et la thiourée sont des agents chaotropes qui permettent de casser les liaisons intramoléculaires faibles. Le Nonidet P-40 est un détergent non ionique, qui participe à la solubilisation et à la prévention de la précipitation des protéines. Le tampon IPG contient un mélange d'ampholytes qui augmente la solubilité de l'échantillon et assure une conductibilité uniforme au cours de la focalisation. Enfin, le DTT permet de maintenir les groupements thiol sous forme réduite -SH, empêchant la formation de ponts disulfure intra- ou inter-moléculaires, ce qui permet le dépliement de la protéine.

2.4.1.2. Dosage des protéines

La concentration protéique des échantillons est dosée grâce au Kit 2-D QUANT (GE-Healthcare), suivant les recommandations du fournisseur. Ce dosage, compatible avec les réactifs utilisés pour les gels 2-D, est basé sur la liaison spécifique des ions cuivre aux

protéines précipitées. Le dosage de chaque échantillon est obtenu par comparaison avec une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA).

2.4.2. Isoélectrofocalisation (IEF) : 1ère dimension

La 1ère dimension est effectuée sur des bandelettes de gel de polyacrylamide à 4% (Immobilin DryStrip gels, GE-Healthcare), pré-coulées et déshydratées, de 18 cm de longueur, couvrant un gradient de pH allant de 3 à 11, sur un générateur thermostaté de type Ettan IPGphor II (GE-Healthcare). L'isoélectrofocalisation (IEF) permet de séparer les protéines selon leur point isoélectrique (pI), pH pour lequel la charge électrique globale de la protéine est nulle.

Après réhydratation en solution de solubilisation (10 h minimum, à température ambiante), les bandelettes sont positionnées sur le générateur, dans un plateau (Manifold, GE-Healthcare) prévu pour l'IEF.

Le programme de focalisation se développe en plusieurs étapes : une phase de conditionnement (50 V jusqu'à atteindre un total de 400 Vh puis 200 V jusqu'à atteindre un total de 200 Vh) qui permet d'éliminer l'excès des sels, puis une montée en voltage qui s'effectue en gradient jusqu'à 1000 V (total de 3000 Vh) suivi d'une montée jusqu'à 8000 V (total de 30000 Vh), pour finir par une phase de focalisation (8000 V jusqu'à atteindre 40000 Vh). À ce stade, les bandelettes peuvent être utilisées directement ou conservées à -20°C.

2.4.3. Etape d'équilibration

Cette étape permet de charger toutes les protéines négativement, n'altérant pas ainsi la 2ème dimension qui se fait en fonction de la masse moléculaire des protéines. Les bandelettes sont équilibrées dans un tampon composé d'urée 6 M, Tris-HCl 50 mM (pH 8,8), glycérol 30 % et SDS 2 %. Dans un premier temps, du DTT 1% est ajouté au tampon d'équilibration et les bandelettes sont agitées pendant 15 minutes à température ambiante, afin de réduire les protéines et saturer le gel en SDS. Dans un deuxième temps, les bandelettes sont placées pendant 15 minutes dans le tampon d'équilibration contenant 2,5% d'iodoacétamide, afin de minimiser la réoxydation des protéines au cours de l'électrophorèse.

2.4.4. 2ème dimension : SDS-PAGE

Les bandelettes sont placées sur un gel de polyacrylamide à 12%, puis recouvertes d'une solution d'agarose à 1%. La migration des protéines s'effectue en tampon Tris 25 mM, glycine 192 mM et SDS 0,1%. La migration se déroule en 3 étapes : un ampérage de 10 mA est appliqué par gel pendant 30 minutes, suivi d'une étape de 20 mA par gel pendant 30 minutes, afin de permettre l'élution des protéines à partir de la bandelette, puis à 42 mA jusqu'à la fin de la migration.

2.4.5. Coloration des protéines

Les gels sont rincés à l'eau 2 fois 5 minutes, puis les protéines sont fixées dans une solution d'éthanol 40% et acide acétique 7% deux fois pendant 30 minutes. Ensuite les gels sont rincés pendant 10 minutes (2 fois) à l'eau.

Dans un premier temps, les protéines sont révélées par le fluorophore Sypro Ruby (Invitrogen) et visualisées directement en utilisant un scanner Typhon ™9400 imageur (Amersham Biosciences) en mode fluorescence. Ensuite, les gels sont colorés au bleu de Coomassie (Sigma) afin d'analyser les spots d'intérêt par spectrométrie de masse.

2.5. Identification des protéines par spectrométrie de masse

Les spots d'intérêt sont excisés des gels en utilisant un appareillage Ettan™ Spot Picker (Amersham Biosciences). Les spots excisés sont conservés à -20 °C avant analyse.

2.5.1. Digestion des protéines et extraction des peptides

Les morceaux de gel sont lavés deux fois avec de l'eau bi-distillée, une fois dans du bicarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3) 100 mM et trois fois dans 100 µl d'acétronitrile (ACN) 100% en agitation jusqu'à la disparition totale de la coloration.

Les échantillons sont alors réduits par incubation à 56°C pendant 45 minutes dans une solution de NH_4HCO_3 50 mM contenant du DTT 10 mM, puis alkylés par incubation dans

une solution de NH_4HCO_3 50 mM contenant 55 mM d'iodoacétamide pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. Les gels sont lavés dans une solution contenant 50 % de NH_4HCO_3 50 mM et 50 % d'ACN pendant 5 minutes, suivi par un lavage avec de l'ACN. Après élimination des surnageants, les morceaux de gels sont séchés.

Après séchage, les protéines sont digérées par une solution de trypsine 25 ng/µl dans du tampon NH_4HCO_3 25 mM à 37°C pendant la nuit. L'extraction de peptides est réalisée par l'ajout d'une solution contenant de l'acide formique 0,1 % et d'ACN 100 %. L'échantillon est concentré sur Speed Vac et remis en suspension dans une solution aqueuse contenant 2% d'ACN et 0,5% d'acide formique.

2.5.2. Analyse des échantillons par spectrométrie de masse

L'analyse des peptides extraits se fait par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser desorption Ionisation – Time Of Flight), sur un appareil Perceptive Biosystems/applied Biosystems/ABI Voyager DE-STR MALDI-TOF. Dans cette technique, les échantillons à analyser sont mélangés et co-cristallisés à une quantité importante de matrice (acide α-cyano-4- hydroxycinnamique). L'ensemble est bombardé par un rayon laser, et la matrice qui se trouve en excès absorbe la longueur d'onde du laser utilisé, ce qui a pour effet de favoriser la séparation des molécules en réduisant les forces intermoléculaires. L'énergie du laser est absorbée et permet l'évaporation de la matrice, entraînant avec elle l'échantillon en phase gazeuse. La grande quantité d'énergie concentrée sur une surface très faible permet le transfert d'un proton des molécules ionisées de la matrice vers les peptides de l'échantillon, donnant ainsi des ions préférentiellement monochargés ($[M+H]^+$). Une fois que les ions sont formés dans la source, ils sont accélérés par un champ électrique uniforme qui les dirige jusqu'au détecteur selon une vitesse inversement proportionnelle à leur rapport masse sur charge (m/z). L'arrivée des ions à l'extrémité du tube de vol est détectée par un multiplicateur d'électrons. L'analyse par MALDI-TOF permet ainsi d'obtenir une liste de masse des différents peptides obtenus après digestion à la trypsine.

2.5.3. Identification des protéines par recherche dans les bases de données

Les spectres de masse récupérés sont analysés en comparant les valeurs des masses mesurées avec les valeurs calculées contenues dans les bases de données. Pour cela, les résultats de ces analyses sont soumis à une interrogation sur internet (NCBI et/ou SwissProt) à l'aide essentiellement de la base de données Mascot (http://www.matrixscience.com/). Les résultats obtenus permettent ainsi d'identifier les protéines présentes initialement dans le spot.

2.6. Quantification des gènes codant des facteurs de virulence par RT-PCR

L'analyse de l'expression de certains gènes codant des facteurs de virulence présents à la surface de *C. difficile* a été réalisée à partir de 3 cultures indépendantes de 15 h, chaque réplicat biologique faisant l'objet d'un réplicat technique.

2.6.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits par la technique du FastPrep® (QBiogene), selon les indications du fournisseur. Les ARN sont précipités à l'éthanol et remis en solution en eau milliQ. Afin d'éliminer le risque de contamination de l'ARN par l'ADN, un traitement par la DNAse (Ambion) est réalisé.

2.6.2. Synthèse des ADNc

La synthèse des ADN complémentaires (ADNc) est réalisée à partir de 5 µg d'ARN par la DNA polymerase SuperScript™ III (Invitrogen) dans un volume final de 20 µL. Les amorces aléatoires et les désoxynucléotides (dNTPs) sont ajoutés à une concentration finale de 300 ng/µL et 0,5 mM respectivement. L'échantillon est alors dénaturé à 65°C pendant 5 minutes, puis refroidi immédiatement. Ensuite, 7 µL d'un mix contenant 4 µL de tampon 5X First-Strand, 10 mM de DTT, 200 U d'enzyme SuperScript III et 40 U/µL de RNase (RNase Out, Invitrogen) qui dégrade le brin d'ARN au niveau des hétéroduplex ARN/ADN sont incubés à

Gène	Sequence (5'→ 3')	Taille de l'amplicon (pb)	Tm (°C)
polIII	F- TCCATCTATTGCAGGGTGGT R- CCCAACTCTTCGCTAAGCAC	151	61 60
slpA	F-AATGATAAAGCATTTGTAGTTGGTG R- TATTGGAGTAGCATCTCCATC	126	59 60
fbp68	F- AGTTCGTCAAGTTTTACCTGGTC R- GGTCCTTCCAATTCCTCTAGG T	120	59 60
cwp66	F- TGGGAAACAGCAATAAAAATAAGTC R- TTAGCAAATGGAGTAGCTGATAAAG	110	60 59
groEL	F- GAAAAGGAATACAAAAAGCAGTAACA R- CATCACCAGCAGATATAGAAGCAA	114	59 60
fliC	F- AACACAATTAAAAGATGAGATTGAAAGA R- CATTAGTTCCATAACTTGCTCCAAC	122	60 60

Tableau 4 Amorces utilisées pour quantification de l'expression des gènes des facteurs de colonisation, lors de l'étape de PCR en temps réel. La taille de l'amplicon est indiquée en paire de bases.

25 °C pendant 5 minutes, puis à 50 °C pendant 1 h. La réaction est inactivée en chauffant à 70 °C pendant 15 minutes. Les ADNc ainsi synthétisés sont conservés à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

2.6.3. Quantification de l'expression des gènes en RT-PCR

La RT-PCR en temps réel a été effectuée sur l'appareil CFX96™ Real-Time PCR Detection System (BioRad). Les amorces utilisées pour les gènes *fbp68, cwp66, groEl, fliC* et le gène de normalisation *polIII* ont été choisies à l'aide du logiciel Primer 3 (disponible à l'URL http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www_slow.cgi), tandis que les amorces de s*lpA* ont été décrites précédemment (77). Les amorces de tous les gènes cibles sont présentées dans le tableau 4.

Pour chaque échantillon, les PCR sont réalisées en doublon dans un volume final de 10 µL, contenant 10 ng d'ADNc, 2 µL du mélange SYBR Green PCR Master Mix (Roche) et 500 nM d'amorces spécifiques de chaque gène. Le programme inclut une dénaturation initiale à 95 °C pendant 10 minutes, suivi par 40 cycles d'amplification comprenant une dénaturation de 10 secondes à 95 °C, une phase d'hybridation de 10 secondes à 60 °C et une phase d'élongation à 72 °C pendant 10 secondes. L'amplification est suivie d'une étape de fusion, permettant de vérifier que l'amplification est unique et spécifique.

Les données ont été analysées par la méthode de ΔΔCt (Cycle threshold, ou cycle seuil), et les résultats exprimés en valeur de Ct, qui correspond au nombre de cycles d'amplification nécessaires pour que la fluorescence dépasse le seuil de détection du fluorimètre. Les résultats que nous avons obtenus sont exprimés en expression relative, avec normalisation sur le gène de référence *polIII*.

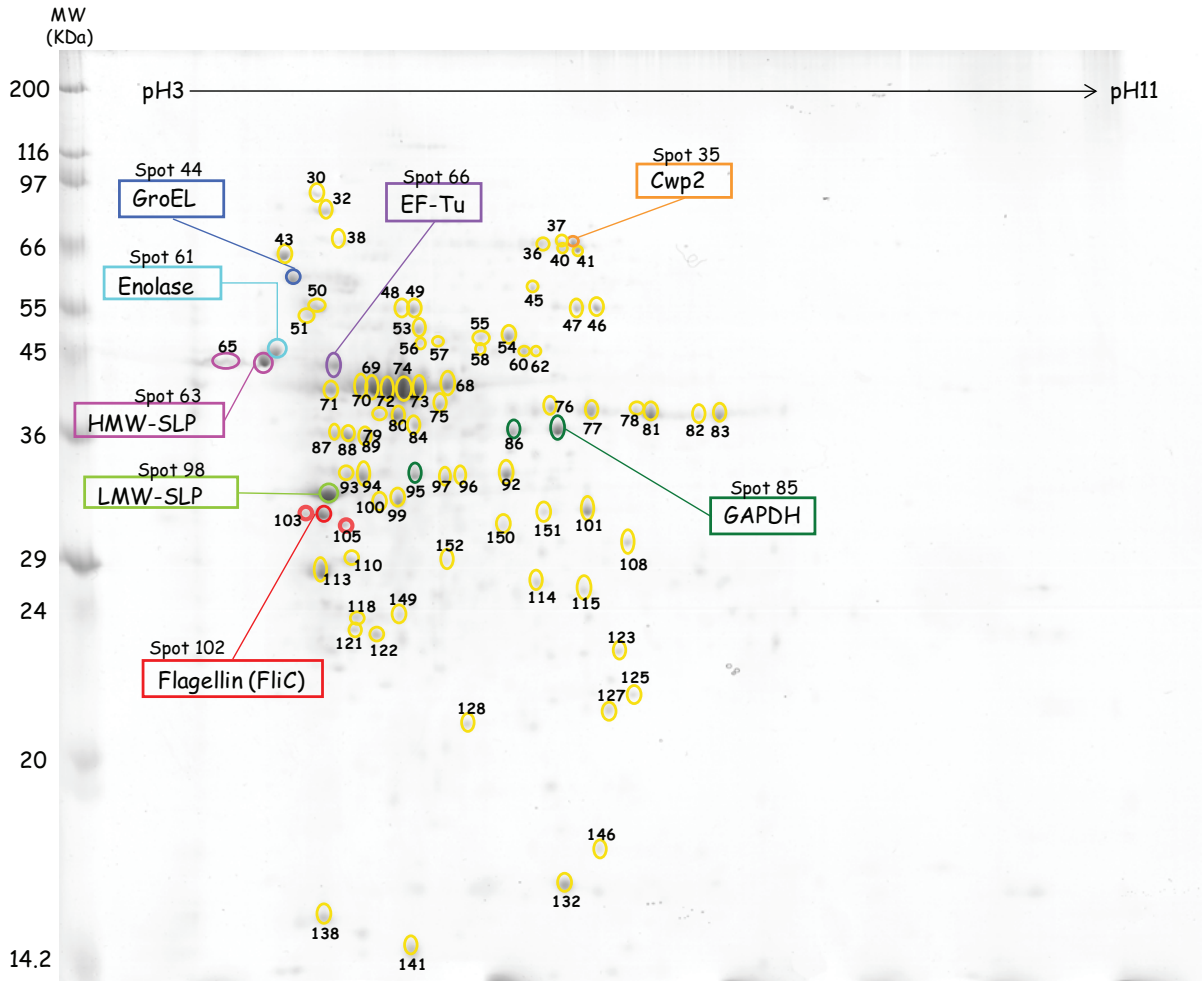


Figure 27. Cartographie de l'extrait de protéines de surface de *C. difficile* de la souche 630 en TGY. Cent µg de protéines extraites d'une culture de 15 heures en TGY ont été analysées par électrophorèse 2-D. La première dimension a été réalisée sur des bandelettes IPG 3-11, la seconde dimension sur un gel SDS-PAGE 12 %. Les gels ont été colorés au bleu de Coomassie. Les protéines de surface précédemment caractérisées comme facteurs de virulence (HMW-SLP, LMW-SLP, FliC et GroEL), la protéine Cwp2, ainsi que d'autres protéines pouvant jouer un rôle dans la virulence (Enolase, GAPDH et EF-Tu) sont indiquées, et les informations correspondantes sont récapitulées dans le tableau 5. Les spots numérotés correspondent aux autres protéines identifiées (Tableau 6).

3. Résultats et discussion

3.1. Cartographie de l'extrait des protéines de surface en TGY

Cette première partie de l'étude a pour objectif d'établir une cartographie de protéines de surface de la souche 630 de *C. difficile* après culture en milieu TGY à pH variable, grâce à l'utilisation de l'électrophorèse 2-D et l'identification des protéines par spectrométrie de masse.

Une analyse précédente avait comparé le profil des protéines de surface de la souche 630 de *C. difficile* cultivée 24 heures en BHI, extraites soit par la glycine acide, soit par une technique au lysozyme (325). Cette étude avait mis en évidence que la composition des extraits protéiques dépend étroitement de la technique sélectionnée pour l'extraction. Nous avons travaillé à partir de cultures de 15 heures (phase stationnaire de croissance) en TGY, et mis au point une technique associant une dégradation enzymatique (mutanolysine) et physique (vortex) de la paroi bactérienne afin d'extraire les protéines associées à la surface.

Les gels obtenus après séparation de l'extrait des protéines de surface par électrophorèse 2-D (Figure 27) sont soumis à une analyse exhaustive des protéines contenues dans cette fraction, en identifiant par spectrométrie de masse MALDI-TOF toutes les spots visibles par coloration au bleu de Coomassie. Cette carte a été obtenue grâce à des bandelettes couvrant une large gamme de pH de 3 à 11, mais nous observons que la plupart des spots protéiques sont concentrés entre le pH 3 et le pH 8.

3.1.1. Identification des protéines par spectrométrie de masse MALDI-TOF

L'analyse de l'extrait de protéines de surface par 2-D révèle près de 84 spots, dont la plupart ont pu être identifiés. Parmi eux, 7 spots correspondent à 4 protéines de surface précédemment caractérisées : les deux protéines de la couche S (connues pour être majoritaires à la surface de la bactérie) HMW-SLP et LMW-SLP, la flagelline FliC et GroEL.

Spot	Génome	Nom de la protéine	Masse théorique (Da)	Score Mascot	Nb de peptides identifiés	Couverture de séquence
35	CD2791	Cwp2	66405	833	15	25%
44	CD0194	GroEL	57735	80	6	18%
63	CD2793	HMW-SLP	76087	83	8	12%
65	CD2793	HMW-SLP	76101	560	10	12%
98	CD2793	LMW-SLP	76087	130	12	23%
102	CD0239	FliC	30775	60	5	31%
103	CD0239	FliC	30775	155	2	7%
105	CD0239	FliC	30973	144	3	9%

Tableau 5. Protéines de surface identifiées dans un extrait des protéines de surface de la souche 630 en TGY à partir d'une culture de 15 heures.

Une autre protéine Cwp a également été identifiée ; il s'agit de la protéine Cwp2, codée par le gène CD2791, et localisée sur le locus *cwp*. Dans une autre souche de *C. difficile*, il avait été montré par Northern-blot que les gènes CD2791 et *cwp66* étaient co-transcrits (270). Cependant, dans notre étude, la protéine Cwp66 n'a pas été identifiée sur le gel, ce qui pourrait s'expliquer soit par une organisation génétique différente (absence d'opéron) dans la souche 630, soit par une dégradation plus rapide de l'ARNm de *cwp66* ou de la protéine elle-même. Dans nos conditions expérimentales, les autres protéines Cwp ne semblent pas exprimées, ou le sont peut-être à des niveaux trop faibles pour être détectées par la technique de coloration employée. L'ensemble des protéines de surface certaines identifiées sont présentées dans le tableau 5.

L'analyse par spectrométrie a permis d'identifier des protéines appartenant à différents métabolismes :

- Des protéines du métabolisme du glucose : l'énolase (CD3170, spot 61), la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (CD3174, spots 85, 86 et 95), la pyruvate kinase (CD3394, spot 38), la glucose-6-phosphate isomérase (CD3285, spot 58), la phosphoglycérate kinase (CD3173, spot 70) et une putative fructose-1,6-bisphosphate aldolase (CD0403, spots 99 et 100).

- Des protéines impliquées dans les processus de traduction comme le facteur d'élongation EF-Tu (CD0058, spot 66) et la protéine ribosomale 50S (CD0063, spot 127.

- Des protéines du métabolisme des acides aminés et particulièrement de la leucine, comme les gènes CD0394 (spots 93 et 94), CD0395 (spots 115 et 123), CD0396 (spot 108), CD0397 (spot 71), CD0399 (spots 77, 78, 81, 82 et 83), CD0400 (spot 113) et CD0401 (spots 87, 88, 118 et 128).

- Des protéines impliquées dans les processus de protéolyse comme le gène CD0708 correspondant à une dipeptidase potentielle (spot 50).

Nous avons identifié également le domaine catalytique glycosyltransférase de la toxine A (spot 68). L'ensemble de ces protéines ne possèdent pas de peptide signal, ce qui suggère que

Tableau 6. Protéines identifiées dans un extrait des protéines de surface de la souche 630 en TGY à partir d'une culture de 15 heures. Les protéines indiquées en bleu correspondent aux protéines également retrouvées dans l'extrait « lysozyme » dans l'étude de Wright *et al*. (324)

Spot	Génome	Nom de la protéine	Masse théorique (Da)	Score Mascot	Nb de peptides identifiés	Couverture de séquence
30	CD0700	Phenylalanyl-tRNA synthetase subunit beta	89691	566	12	14%
32	CD2339	4-hydroxybutyrate CoA transferase	48257	196	2	6%
36	CD2682	pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	130112	42	8	7%
37	CD2682	pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	130112	87	2	1%
38	**CD3394**	Pyruvate kinase	63470	499	9	15%
40	CD2682	pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	130112	63	10	9%
41	CD2682	pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	130112	100	11	13%
43	**CD2461**	Chaperon protein	66541	600	13	19%
45	CD0718	formate-tetrahydrofolate ligasereduc	60347	40	4	9%
46	CD2341	gamma-aminobutyrate metabolism dehydratase/isomerase	55864	76	7	20%
47	CD2341	gamma-aminobutyrate metabolism dehydratase/isomerase	55864	282	6	10%
48	CD2349	glycine/sarcosine/betaine reductase complex component C beta subunit	55464	366	11	17%
49	CD2349	glycine/sarcosine/betaine reductase complex component C beta subunit	55464	151	13	40%
50	CD0708	putative aminoacyl-histidine dipeptidase	53030	45	5	14%
51	**CD2755**	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	63282	217	7	6%
53	CD2335	inositol-5-monophosphate dehydrogenase	55085	109	10	25%
54	CD2342	succinate-semialdehyde dehydrogenase (NAD(P)+)	51163	117	9	23%
55	CD2342	Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NAD(P)+]	51163	476	9	19%
56		Pas de protéine significative				
57	CD2342	Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NAD(P)+]	51163	528	8	18%
58	CD2385	glucose-6-phosphate isomerase	50677	263	11	13%
60		Pas de protéine significative				
61	**CD3170**	Enolase	46289	101	8	24%
62	CD0528	Putative amidohydrolase	48021	327	10	15%
66	**CD0058**	Elongation Factor Tu	44226	1032	19	65%
68	CD	Toxin A	18056	43	4	36%
69	**CD3664**	putative amino acid aminotransferase	44997	86	11	29%
70	**CD3173**	phosphoglycerate kinase	43324	38	4	21%
71	CD0397	subunit of oxygen-sensitive 2-hydroxyisocaproyl-CoA dehydratase	47133	100	10	29%
72	CD0179	NAD-specific glutamate dehydrogenase	46271	72	11	35%
73	**CD1059**	acetyl-CoA acetyltransferase	41005	161	15	50%
74	CD	2-hydroxyisocaproate-CoA transferase	43360	1048	17	47%
75	CD0113	Butyrate kinase	38728	701	15	39%
76	CD1054	butyryl-CoA dehydrogenase	41390	110	9	37%
77	CD0399	acyl-CoA dehydrogenase, short-chain specific	41009	70	6	34%
78	CD0399	acyl-CoA dehydrogenase, short-chain specific	41009	67	6	16%

les bactéries ont pu subir une lyse partielle. Au total, 84 spots ont été identifiés, correspondant à 53 protéines différentes (Tableau 6).

Dans une étude précédente, l'extraction des protéines de la couche S et des protéines associées à la surface bactérienne de manière non covalente a été réalisée par une méthode « douce » utilisant la glycine acide. L'analyse par gel 2-D et par MS/MS avait identifié 50 spots, correspondant à 12 protéines différentes dont 8 protéines Cwps (LMW-SLP, HMW-SLP, CwpV, Cwp2, Cwp6, Cwp25, Cwp24 et Cwp12), la flagelline (CD0239) ainsi que 2 protéines cytoplasmiques. En revanche, l'extraction des protéines de surface par une méthode plus « agressive » se basant sur la digestion du peptidoglycane par l'association de lysozyme-mutanolysine-lysostaphine, se traduit la présence d'une centaine de spots en gel 2-D. Par MS/MS 45 protéines ont été identifiées : 7 correspondent à des protéines Cwps (LMW-SLP, HMW-SLP, CwpV, Cwp2, Cwp25, Cwp4 et Cwp84), 4 à des protéines synthétisées avec un peptide signal et 34 à des protéines vraisemblablement cytoplasmiques (325). La méthode d'extraction utilisée dans notre étude se rapproche de la méthode au lysozyme employée dans l'étude de Wright *et al*., et certaines protéines identifiées sont communes dans les deux études : HMWL-SLP, LMW-SLP, Cwp2 ainsi que la flagelline ; cependant, nous n'identifions pas la Cwp4, la CwpV, la Cwp25 et la Cwp84. Cette différence pourrait être liée aux différentes conditions de culture utilisées : 15 heures en TGY dans notre étude, et 24 heures en BHI dans l'étude de Wright *et al*., mais également, à la différence de la technique d'extraction utilisée.

Au cours de cette étude, nous avons identifié dans nos extraits un certain nombre de protéines qui pourraient être d'origine cytoplasmique. Certaines de ces protéines (21/45) ont également été retrouvées dans l'étude de Wright *et al*. Plus récemment, une étude a analysé le protéome insoluble (issu d'un lysat de bactéries totales) de la souche 630 de *C. difficile*, dans lequel 107 protéines ont été identifiées. Parmi ces protéines, 3 sont des protéines de surface : le précurseur SlpA, la protéine Cwp2 et la protéase Cwp84 ; une vingtaine possèdent un peptide signal prédit et environ 80 correspondent à des protéines cytoplasmiques (136). Si nous comparons cette étude avec la nôtre, nous retrouvons 22 protéines cytoplasmiques en commun.

De plus, parmi les protéines identifiées dans notre étude, certaines ont été caractérisées chez d'autres bactéries comme des facteurs de virulence, localisés à la surface bactérienne : c'est le

Tableau 6. Suite

Spot	Génome	Nom de la protéine	Masse théorique (Da)	Score Mascot	Nb de peptides identifiés	Couverture de séquence
79	CD2139	Elongation factor Ts	33290	445	13	26%
80	CD2139	Elongation factor Ts	33290	53	6	20%
81	CD0399	acyl-CoA dehydrogenase, short-chain specific	41009	49	5	23%
82	CD0399	acyl-CoA dehydrogenase, short-chain specific	41009	276	18	15%
83	CD0399	acyl-CoA dehydrogenase, short-chain specific	41009	70	6	34%
84	CD3237	Proline racemase	36426	162	10	18%
85	CD3174	Glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase2	36011	635	13	32%
86	CD3174	Glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase2	36239	575	12	36%
87	CD0401	Electron transfer flavoprotein alpha- subunit	37353	167	5	10%
88	CD0401	Electron transfer flavoprotein alpha- subunit1	37353	409	6	17%
89	CD1056	Electron transfer flavoprotein alpha- subunit	36221	819	16	38%
92	CD1054	Butyryl-CoA dehydrogenase	41390	88	9	33%
93	CD0394	(R)-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase	36421	155	2	7%
94	CD0394	(R)-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase	36421	327	8	21%
95	CD3174	Glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase2	36239	362	9	22%
96	CD1054	butyryl-CoA dehydrogenase	41390	83	6	22%
97	CD	2-hydroxyisocaproate-CoA transferase	44360	332	8	20%
99	CD0403	putative fructose-bisphosphate aldolase	33069	95	8	51%
100	CD0403	Putative fructose-bisphosphate aldolase	33069	272	5	11%
101	CD1058	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	30887	49	5	17%
108	CD0396	activator of 2-hydroxyisocaproyl-CoA dehydratase	28948	89	6	20%
110	CD1057	3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	28642	312	9	25%
113	CD0400	electron transfer flavoprotein beta-subunit	28767	98	6	29%
114	CD3241	Proline reductase	25672	48	2	2%
115	CD0395	Isocaprenoyl-CoA-2-hydroxyisocaproate CoA-transferase	44491	229	4	10%
118	CD0401	Electron transfer flavoprotein alpha- subunit	37353	165	5	7%
121	CD2513	Putative translation inhibitor endoribonuclease	13649	106	1	11%
122	CD3244	Proline reductase subunit proprotein	67862	57	1	2%
123	CD0395	isocaprenoyl-CoA:2-hydroxyisocaproate CoA-transferase	44491	44	5	14%
125	CD2683	Putative propanediol utilization protein	20109	259	6	27%
127	CD0063	50S ribosomal protein L10	18592	152	5	15%
128	CD0401	electron transfer flavoprotein beta-subunit	28767	173	6	18%
132	CD1693	putative dinitrogenase iron-molybdenum cofactor	13200	46	3	43%
138	CD2513	putative translation inhibitor endoribonuclease	13649	100	1	11%
141		Pas de protein significative				
146	CD2446	Putative tRNA binding protein	17063	231	6	26%
149	CD2354	glycine reductase complex component B alpha and beta subunits	46436	335	10	18%
150	CD1536	Ferredoxin-NADP(+) reductase subunit alpha	33553	471	12	35%
151	CD	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	30887	274	4	23%
152	CD1011	Gucosamine-6-phosphate deaminase	27686	259	5	18%

cas en particulier de l'énolase (CD3170), la GAPDH (CD3174) et du facteur d'élongation EF-Tu (CD0058), dont nous parlerons plus tard dans le chapitre « Identification de facteurs de virulence potentiels ».

3.2. Comparaison des profils des protéines de surface après culture en TGY et en TY

3.2.1. Analyse des protéines de surface par électrophorèse 2D

Nous avons entrepris une comparaison par électrophorèse 2-D des extraits de protéines de surface après culture de la bactérie dans un milieu TY par rapport à un milieu TGY, en phase stationnaire (Figure 28).

Parmi l'ensemble des spots d'intérêt identifiés dans notre premier gel (Figure 27), nous nous sommes intéressés tout particulièrement à ceux correspondant aux facteurs de colonisation connus. Nous observons que la protéine GroEL semble être plus exprimée dans le milieu TYG qu'en TY. Cette surexpression est vraisemblablement liée à la diminution du pH en TGY, puisque la quantité résiduelle de glucose est très faible (*cf.* article 2, partie 1), et ce résultat correspond aux résultats précédemment trouvés par Emerson *et al.* (96), où le gène *groEL* était surexprimé après un choc acide à pH 4.8.

L'ensemble des spots correspondant potentiellement aux protéines de surface ont été excisés des gels et analysés par spectrométrie de masse dans les deux milieux, et nous identifions les protéines de surface : HMW-SLP, LMW-SLP, Cwp2, FliC et GroEL dans les deux conditions de culture.

Précédemment, nous avons mis en évidence un effet du pH acide lié au métabolisme du glucose sur l'expression et le processus protéolytique de Cwp84. Afin de déterminer si cette condition environnementale pouvait également jouer un rôle dans l'expression d'autres facteurs de virulence de *C. difficile*, nos avons comparé de manière quantitative l'expression de certaines protéines de surface et des gènes correspondants.

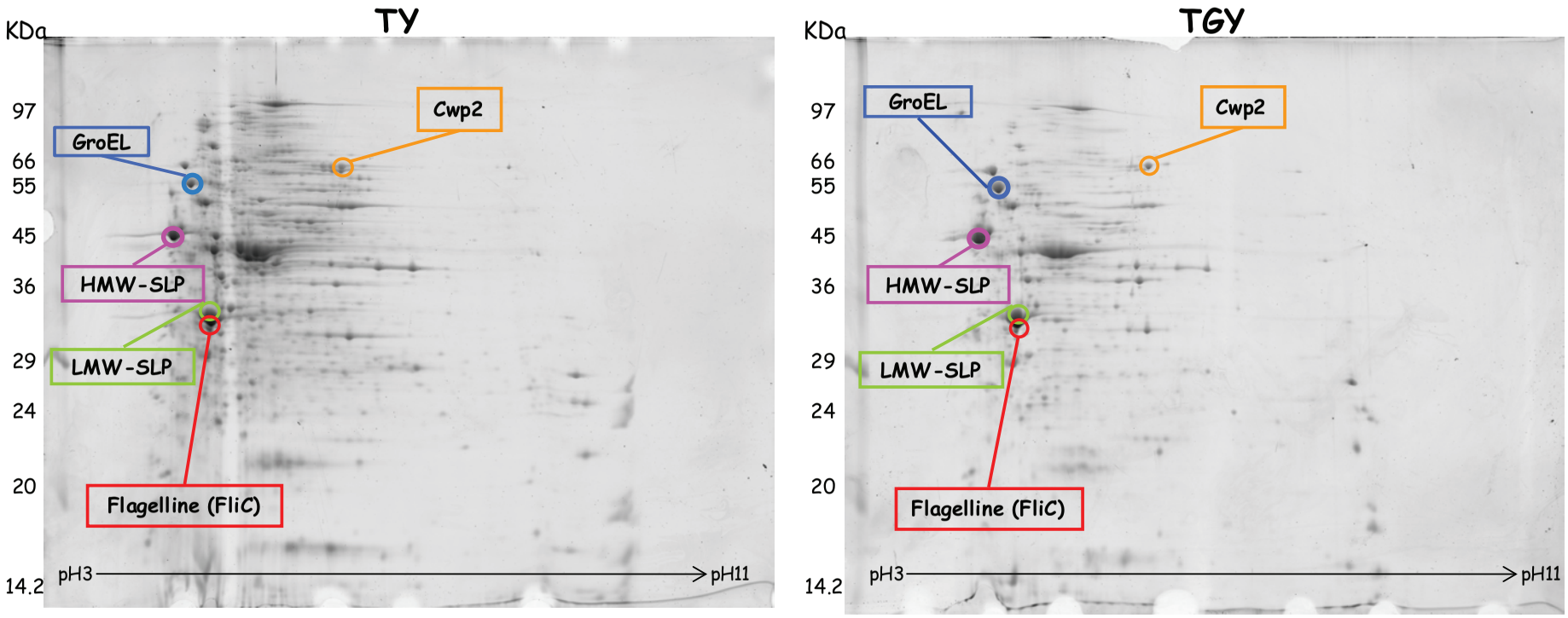


Figure 28. Cartographie des extraits de protéines de surface de *C. difficile* (souche 630) après culture en TY et TGY. Cent µg de protéines extraites de cultures de 15 heures ont été analysés par électrophorèse 2-D. Les protéines de surface HMW-SLP, LMW-SLP, FliC, GroEL et la protéine Cwp2, ont été identifiées dans les deux milieux.

3.2.2. Analyse des protéines de surface par immunoblot

Nous avons ainsi analysé l'expression des protéines HMW-SLP et FliC, identifiées sur les gels en 2-D ainsi que l'expression de l'adhésine Cwp66.

Comme le montre la figure 29, les extraits de protéines de surface issus des bactéries cultivées dans un milieu avec glucose à pH variable après 15 heures de culture, contiennent une quantité plus importante de protéines HMW-SLP, FliC et Cwp66 par rapport aux extraits obtenus après culture bactérienne dans les milieux sans glucose. Ce résultat suggère que la diminution du pH liée à la fermentation de ce sucre rapidement métabolisable pourrait réguler de manière positive l'expression de ces protéines de surface impliquées dans le processus de colonisation de *C. difficile.*

3.2.3. Analyse transcriptionnelle

Nous avons par la suite analysé la transcription des gènes *slpA*, *fliC* et *cwp66* ainsi que l'expression d'autres gènes, *fbp68* et *groEL,* par RT-PCR en temps réel. Les ARN totaux ont été extraits en phase stationnaire de croissance (15 h) après culture en milieu TY et TGY. Les résultats montrent que l'expression des gènes *slpA*, *fliC* et *cwp66* est corrélée avec les résultats au niveau des protéines ; en effet, nous retrouvons une surexpression modérée en TGY de ces trois gènes : x 3,3 pour *slpA*, x 2,3 pour *fliC* et x 5,0 pour *cwp66.* Nous retrouvons aussi une surexpression plus importante pour le gène *groEL* (x 11 par rapport au milieu TY). En revanche, nous ne trouvons pas de différence dans l'expression de *fbp68* (Figure 30). Toutefois, des expériences supplémentaires doivent être réalisées, afin de vérifier que ces différences sont statistiquement significatives.

4. Conclusion et perspectives

La cartographie globale d'un extrait des protéines de surface de *C. difficile* nous a permis de retrouver un certain nombre de protéines de surface précédemment caractérisées. Toutefois, le nombre de ces protéines n'est pas très important et certaines protéines associées à la surface bactérienne n'ont pas été identifiées dans cette étude. Cela pourrait s'expliquer par les

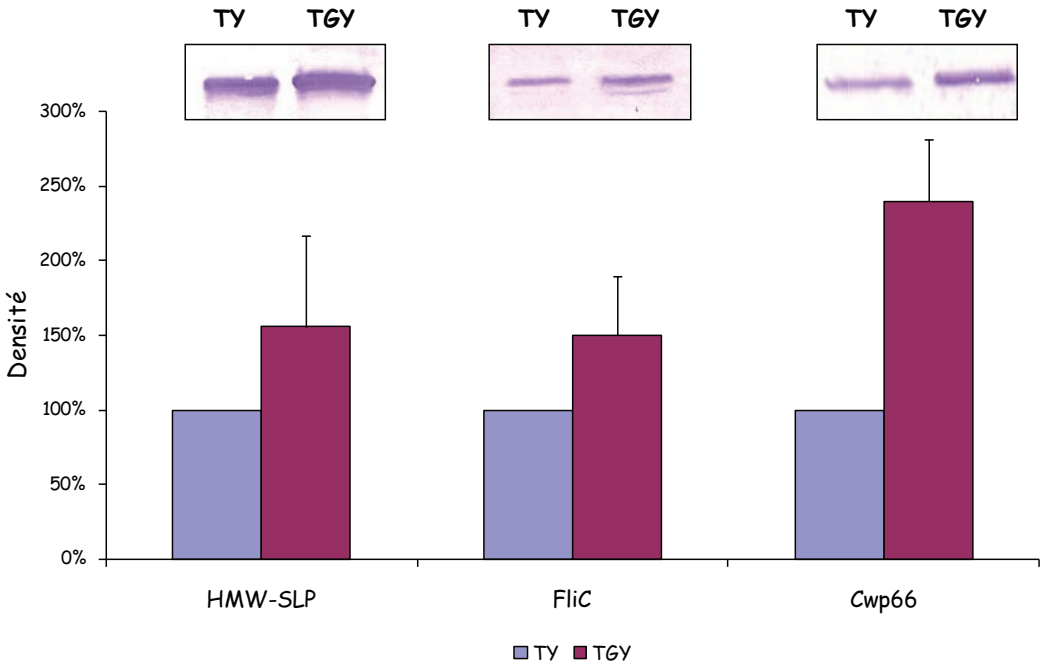


Figure 29. Comparaison de l'expression de HMW-SLP, FliC et Cwp66 après culture dans un milieu avec (TGY) ou sans (TY) glucose. L'expression des protéines HMW-SLP, FliC et surtout Cwp66 est plus importante à la surface de *C. difficile* après 15h de culture en TGY qu'en TY. Ce phénomène est vraisemblablement lié à la diminution du pH résultant de la fermentation du glucose par la bactérie. Les histogrammes sont réalisés à partir de 2 immunoblot différents, un blot représentatif étant présenté pour chacun d'entre eux.

conditions de culture choisies, la méthode d'extraction utilisée, mais aussi par la technique de détection utilisée ; en effet, il est possible que des protéines exprimées faiblement ne soient pas détectées par l'électrophorèse 2-D.

Au cours de cette étude, nous avons identifié dans nos extraits un certain nombre des protéines qui pourraient être d'origine cytoplasmique. L'identification de ces protéines dans des extraits de protéines de surface n'est pas inhabituelle. Chez *Streptococcus oralis*, dans une étude analysant le protéome de surface, de nombreuses enzymes de la glycolyse, ainsi que des protéines ribosomales ont également été repérées. Toutefois, l'extraction de la fraction cytoplasmique réalisée en parallèle au cours de cette étude a montré que les protéines majoritaires du cytoplasme n'étaient pas retrouvées dans l'extrait de protéines de surface ; les auteurs en ont déduit que la bactérie n'était pas lysée pendant les expériences et donc que les protéines identifiées dans l'extrait de surface étaient réellement présentes à la surface de la bactérie (321).

Chez certaines bactéries, la régulation des facteurs de virulence par des facteurs environnementaux, leur conférant ainsi la faculté de s'adapter rapidement aux changements de milieu a été mise en évidence. *C. difficile* est capable de s'adapter et de survivre dans des environnements hostiles comme le tractus intestinal. Pendant le processus infectieux, cette bactérie est soumise à des nombreux stress physiologiques, y compris la présence de sucres et l'exposition à un pH modérément acide le long du côlon (de l'ordre de 6). Des travaux sur la régulation des facteurs de virulence ont montré que l'adhésion et l'expression de certains facteurs de virulence sont régulées par plusieurs facteurs environnementaux tels la température, le pH ou certaines conditions nutritionnelles (96, 159-161, 312). Des études menées précédemment au laboratoire ont également montré que des concentrations subinhibitrices de certains antibiotiques excerçaient une régulation positive sur l'expression de différents facteurs de colonisation (*cwp84*, *cwp66* et *slpA*) (77).

Au cours de nos travaux, nous avons travaillé avec des bactéries en phase stationnaire dans des milieux avec et sans glucose. Nous observons donc que, outre la protéase Cwp84, différents facteurs impliqués dans la colonisation sont régulés par les conditions environnementales, ici vraisemblablement par l'acidification du milieu résultant du métabolisme du glucose que par un effet direct du glucose lui-même, puisque la concentration résiduelle de ce sucre est très faible en milieu TGY après 15 h de culture.

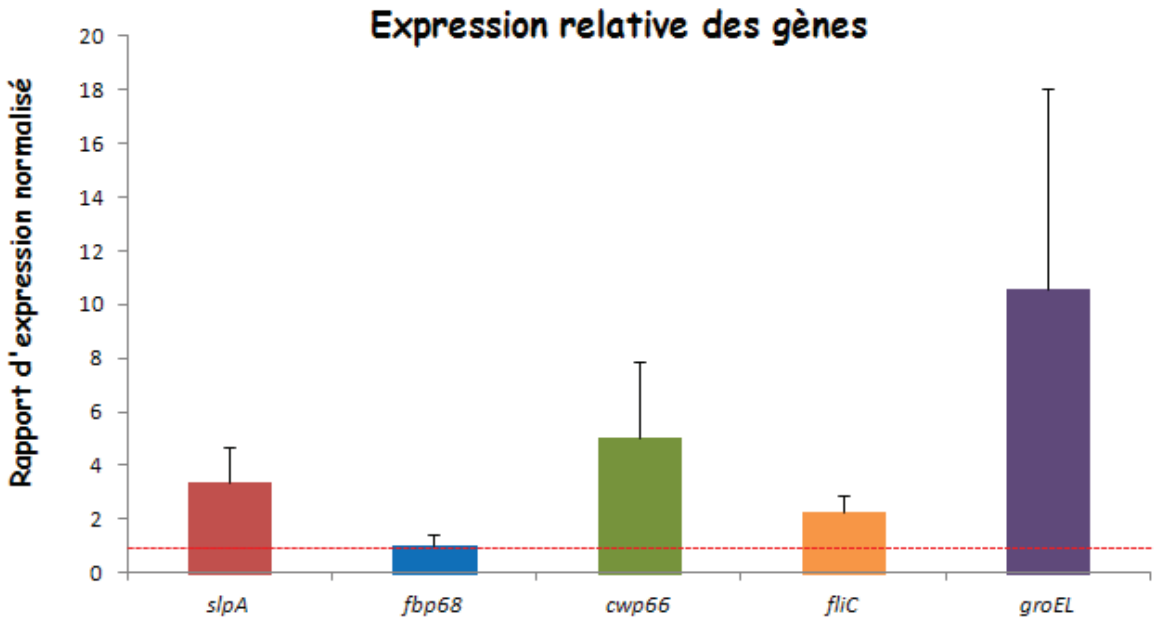


Figure 30. Expression relative de gènes codant pour des facteurs de virulence en milieu TGY *vs.* TY. En milieu TGY, nous observons une augmentation de l'expression de *slpA*, *cwp66*, *fliC* et *groEL*, par rapport à la condition contrôle TY (matérialisée sur ce graphe par une ligne rouge horizontale). Les barres d'erreur des histogrammes représentent l'écart type de la moyenne pour trois réplicats biologiques (duplicat technique réalisé pour chaque échantillon).

Nos résultats sont donc en faveur de l'hypothèse de Waligora *et al.*, selon laquelle une augmentation de l'expression d'adhésines de *C. difficile* aurait lieu dans un environnement à pH acide. En effet, une adhérence plus importante *in vitro* aux cellules Vero, des bactéries incubées préalablement à pH 4,0, par rapport à pH 7,0 a été observée (312). Ainsi la régulation de l'expression des facteurs de virulence de *C. difficile* par un pH acide lié au métabolisme du glucose pourrait favoriser la colonisation de l'hôte par *C. difficile*. La caractérisation de la réponse de la bactérie à un environnement modérément acide a un intérêt dans la compréhension de la pathogénèse de *C. difficile* pendant l'infection. Toutefois, des expériences supplémentaires devront être menées afin de confirmer et valider nos résultats, en particulier l'analyse de l'expression des facteurs de virulence dans un milieu glucosé maintenu à pH constant.

Identification de facteurs de virulence potentiels

1. Introduction et objectifs de l'étude

La colonisation de *C. difficile* étant un processus multifactoriel, nous nous sommes intéressés à l'identification de nouveaux facteurs de virulence pouvant jouer un rôle dans ce processus. Nous avons donc exploité les résultats obtenus lors de l'étude par électrophorèse bidimensionnelle des protéines de surface de la souche 630 (Figure 24) et repéré ainsi de nouveaux facteurs de colonisation potentiels.

2. Matériel et méthodes

2.1. Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches bactériennes utilisées sont les souches *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen), *E. coli* HB101 RP4, qui héberge le système de transfert hétérogamique RP4, intégré au sein du chromosome bactérien, ainsi que les souches 630 et 630Δ*erm* de *C. difficile*. Les souches de *E. coli* ont été cultivées en milieu Luria Bertani (LB) contenant 50 µg/ml de kanamycine et 40 µg/ml de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) pour la souche TOP 10, et 25 µg/ml de chloramphénicol et 100 µg/ml d'ampicilline pour la souche HB101 RP4. La souche de *C. difficile* 630Δ*erm* a été cultivée en BHI à 37°C pendant 15 h, tandis que la souche 630 a été cultivée en TY.

2.2. Test d'adhésion de *C. difficile* au plasminogène immobilisé

La quantité de bactéries adhérant au plasminogène est évaluée par une technique ELISA. Du plasminogène humain (Calbiochem) est immobilisé sur plaque 96 puits (Nunc) par incubation 1 h à 37°C, puis la nuit à 4°C, de 100 µl par puits d'une solution à 10 µg/ml de plasminogène en tampon carbonate de sodium 0,05 M, pH 9,6. Ensuite, les puits sont lavés 3 fois avec du PBS (pH 7,2) contenant 0,1% de Tween 20, puis saturés avec 200 µl de tampon de blocage (1 % de BSA en PBS pH 7,2) et l'incubation se poursuit 2 h à 37°C**.** Avant de déposer les bactéries, les puits sont lavés 3 fois avec du PBS. En parallèle, une suspension bactérienne de la souche 630 en phase stationnaire est préparée, afin de réaliser une gamme avec 10^9, $5x10^8$,

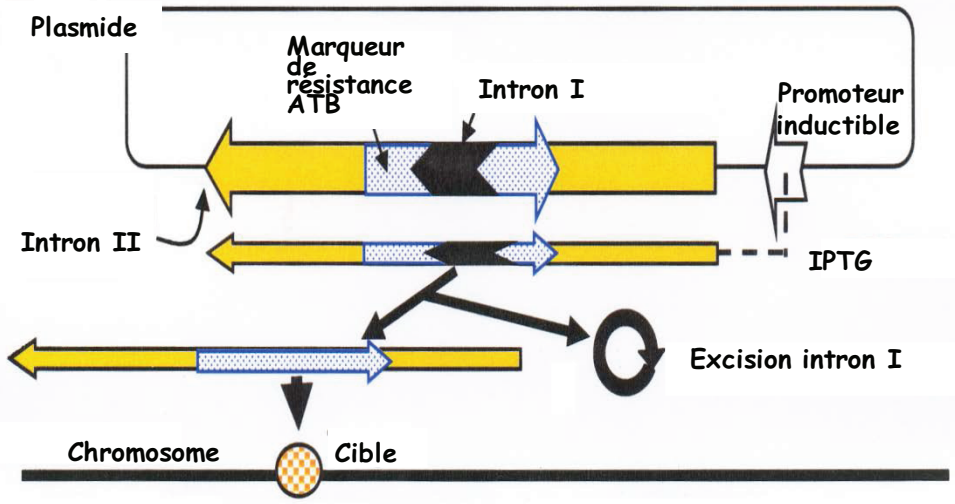


Figure 31. Technique du Clostron. Le plasmide pMTL007 porte un intron de type II. À l'intérieur de cet intron, se trouve un gène de résistance à un antibiotique (érythromycine), interrompu par un intron de type I qui est capable de s'exciser après insertion de l'intron II au niveau du site de mutation. La résistance à l'antibiotique est exprimée, permettant ainsi la sélection des bactéries mutées.

10^8, $5x10^7$, 10^7, $5x10^6$, 10^6 et $5x10^5$ bactéries / ml. Cent microlitres de chacune de ces dilutions bactériennes sont rajoutés dans les puits et la plaque est incubée 30 minutes à 37°C. Les puits sont alors lavés 5 fois par du PBS afin d'éliminer les bactéries non adhérentes. Le premier anticorps (anti-*C. difficile* total de lapin dilué au 1/2 500e en tampon de blocage) est ajouté et incubé 30 minutes à 37°C. Le deuxième anticorps (anti-lapin) couplé à la phosphatase alcaline est dilué au 1/2 500e et l'incubation se poursuit 30 minutes à 37°C. Après lavage, le substrat de l'enzyme (p-nitrophenyl phosphate 1 mg/ml dilué en tampon carbonate 0,1 M pH 9,6 contenant 1 mM de $MgCl_2$) est ajouté et incubé 15 à 20 minutes à température ambiante à l'obscurité. La réaction est arrêtée par ajout de NaOH 3 M, et l'absorbance mesuré à 405 nm avec un lecteur de plaques ELISA. Afin de vérifier que *C. difficile* adhère bien au plasminogène immobilisé sur plaque ELISA, et non à la plaque elle-même, nous avons utilisé un contrôle négatif sans plasminogène.

2.3. Mutagenèse par le système du ClosTron

Le ClosTron est le premier outil génétique « simple » permettant l'inactivation stable de gènes chez *C. difficile* par insertion mutationnelle. Cette technique a été développée par des chercheurs de l'université de Nottingham en 2007 (125). Nous avons sélectionné un gène codant une protéine présente probablement à la surface bactérienne, et qui pourrait être impliqué dans l'étape de colonisation de *C. difficile*.

2.3.1. Principe de la technique

La technique du ClosTron a été développée en utilisant la capacité des introns de groupe II à cibler une séquence spécifique dans les gènes d'intérêt à inactiver. La fréquence d'intégration de l'intron II varie d'un site à l'autre. Un gène de résistance à l'érythromycine est présent dans l'intron II, lui-même interrompu par un intron de groupe I capable de s'auto-exciser (330). L'insertion de l'intron de groupe II au sein du gène cible induira l'excision de l'intron I et l'expression de la résistance à l'érythromycine, facilitant ainsi la sélection de bactéries mutantes (Figure 31).

Site ciblé	Amorce	Séquence (5'→ 3')
676/677a	IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTACAGCTCTTGTTAGTGCGCCCAGATAGGGTG
	EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCTTGTTATATAACTTACCTTTCTTTGT
	EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTCGGTTAGCTGTCGATAGAGGAAAGTGTCT
1086/1087s	IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGCAGGCTATACTGTGCGCCCAGATAGGGTG
	EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCTATACTGCTAACTTACCTTTCTTTGT
	EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTCGATTCCTGCTCGATAGAGGAAAGTGTCT
	EBSu	CGAAATTAGAAACTTGCGTTCAGTAAAC

Tableau 7. **Amorces générées par le logiciel Targetron sur deux sites différents du gène cible *eno* : 676/677 et 1086/1087.**

Cette technique utilise le plasmide conjugatif pMTL007 qui porte donc l'intron de type II, ainsi que le gène *cat* conférant une résistance au chloramphénicol et au thiamphénicol. Dans une première étape, l'intron est re-ciblé par un SOE-PCR (Splicing by Overlap Extension), permettant de modifier la spécificité de la séquence cible en fonction du gène d'intérêt. L'intron re-ciblé de 350 pb est ensuite introduit dans le plasmide conjugatif pMTL007. Une conjugaison permet le transfert du plasmide dans la souche 630Δ*erm* de *C. difficile*. Le repiquage des clones issus de la conjugaison sur un milieu contenant de l'érythromycine favorise l'insertion de l'intron II dans la séquence cible et l'excision de l'intron I.

2.3.2. Choix des sites de mutation sur les gènes d'intérêt

Les groupes d'amorces utilisés ont été choisis grâce au logiciel Targetron® (Sigma, http://www.sigma-genosys.com/targetron/) afin de re-cibler le gène d'intérêt : *eno*, codant l'énolase. Les amorces générées par le logiciel Targetron : IBS, EBS1d et EBS2 sont présentées sur le tableau 7.

2.3.3. Construction du plasmide pMTL007

Dans une première étape, l'intron est re-ciblé. La SOE-PCR est réalisée à l'aide des amorces IBS (100 µM), EBS1d (100 µM) et EBS2 (20 µM), qui sont mélangées avec l'amorce universelle EBSu (20 µM) (Tableau 7). La PCR est réalisée à partir de l'intron matrice fourni dans le Kit Targetron® (Sigma), avec le mélange réactionnel fourni dans le même kit, et le mélange d'amorces citées ci-dessus.

La taille des fragments amplifiés (350 pb) est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %. Ensuite, les inserts de la bonne taille sont purifiés à l'aide du High Pure PCR Product Purification kit (Roche), et clonés dans le plasmide pCR2.1 (ToPo Cloning®, Invitrogen). La ligature se fait avec la T4 DNA ligase (Biolabs), 10 minutes à température ambiante. Le produit de ligature est cloné dans une souche de *E. coli* TOP10 par électroporation, et les bactéries transformées sont ensemencées sur un milieu LB contenant 50 µg/mL de kanamycine et 40 µg/mL de X-gal, ce qui permet de sélectionner aisément par le système blanc/bleu les bactéries ayant reçu l'insert.

Une extraction plasmidique (kit Quiagen®) est réalisée sur une dizaine de colonies blanches, afin de vérifier par séquençage l'absence de mutation dans l'intron re-ciblé. Le plasmide sélectionné est digéré par les enzymes de restriction *Hind*III et *Brs*GI (New England Biolabs®) afin de récupérer l'insert, et le plasmide pMTL007 est digéré en parallèle par les mêmes enzymes. La ligature de l'intron re-ciblé avec le plasmide pMTL007 est réalisée avec la T4 DNA ligase à 16 °C pendant la nuit, et le produit de ligature est cloné chez *E. coli* TOP10 (par éléctroporation), afin d'obtenir une meilleure réplication du plasmide conjugatif contenant l'intron re-ciblé.

2.3.4. Transformation et conjugaison avec *C. difficile*

La souche de *E. coli* HB101 RP4 est transformée avec le plasmide pMTL007 contenant l'intron re-ciblé. Après transformation, les bactéries sont sélectionnées sur LB contenant 25 µg/ml de chloramphénicol et 100 µg/ml d'ampicilline. Le système de conjugaison RP4, présent dans la souche de *E. coli* HB101 utilisée, est capable de mobiliser le plasmide pMLT007 dans un processus de conjugaison de *E. coli* vers *C. difficile*.

La conjugaison est réalisée entre bactéries en phase stationnaire (1/5 vol/vol souche réceptrice/souche donatrice) sur filtre, en boîte BHI, et incubée en anaérobiose à 37°C pendant 8 heures.

Le tapis de bactéries ayant poussé sur le filtre est récupéré dans 1 mL de BHI et la totalité de la suspension est étalée sur BHI enrichi à 4% de sang de cheval (Biomerieux, France), et contenant 25 µg/mL de cefoxitine afin d'éliminer les colonies de *E. coli*, et 15 µg/mL de thiamphenicol afin de maintenir les clones de *C. difficile* ayant intégré le plasmide pMTL007. L'intron re-ciblé présent sur le plasmide pMTL007 peut alors s'insérer dans le génome de *C. difficile* au niveau du site visé sur le gène *eno*. Ensuite, les colonies sont repiquées sur BHI contenant 25 µg/mL de cefoxitine et 5 µg/mL d'érythromycine (sélection des mutants résistants dans lesquels l'intron I a été excisé). En parallèle, les clones sont ensemencés sur un milieu contenant du thiamphenicol afin de vérifier la perte du plasmide pMTL007. Les clones érythromycine résistants et thiamphenicol sensibles sont analysés.

Gène	Sequence (5'→ 3')	Amplicon (pb) Sans insert	Amplicon Avec insert
eno	F- AGGTGACGAAGGTGGATTTG R- CAACCATTTCAGCAGCAGTT	525	2374
RAM	F- ACGCGTTATATTGATAAAAATAATAATAGTGGG R- ACGCGTGCGACTCATAGAATTATTTCCTCCCG	209	2058

Tableau 8. **Amorces utilisées pour les PCR de vérification des mutants obtenus par la technique du ClosTron.** La taille de l'amplicon est indiquée en paire de bases.

2.3.5. Analyse des clones

Les clones sont analysés par PCR afin de vérifier l'insertion de l'intron dans la séquence cible. Le criblage des clones est effectué avec les oligonucleotides RAM-R et RAM-F (Tableau 8) afin de vérifier l'excision de l'intron I et nous assurer ainsi qu'il s'agit de clones d'intérêt et non de mutants spontanés à l'érythromycine. Avant l'insertion de l'intron de type II, sa taille est de 1300 pb ; lors de l'insertion au niveau du gène cible, l'intron de type I de 400 pb est excisé. Les clones ont également été criblés par PCR avec les oligonucléotides enoR et enoF afin de vérifier que l'intégration de l'intron ré-ciblé a bien eu lieu dans le gène cible désiré.

3. Résultats et discussion

3.1. Repérage de facteurs de virulence potentiels

Parmi les protéines présentes dans les extraits de surface analysés (*cf.* partie 2), nous avons identifié 3 protéines d'intérêt : l'énolase, la GAPDH et le facteur d'élongation EF-Tu. Aucune de ces trois protéines ne possède de peptide signal, ni de motif LPXTG de liaison au peptidoglycane qui pourrait expliquer leur localisation à la surface. Néanmoins, leur localisation à la surface à été précédemment mise en évidence chez de nombreuses bactéries à Gram positif, même si le mécanisme d'ancrage n'a pas encore été élucidé, et leur rôle dans la virulence de certains microorganismes pathogènes a également été décrit.

3.1.1. L'énolase

L'énolase est une enzyme qui participe à la glycolyse en catalysant de façon réversible l'interconversion du 2-phosphoglycérate (2PG) en phosphoénolpyruvate (PEP). L'énolase cytoplasmique extraite d'une souche non toxinogène a fait l'objet d'une étude ancienne : il s'agit d'une protéine dont le poids moléculaire a été évalué sur gel SDS-PAGE à 47 kDa, avec une activité énolase optimale à pH 7,6. De plus, l'énolase de *C. difficile* serait thermostable avec une activité conservée de 100% à 55°C et de 93% à 90°C (121).

Par ailleurs, le rôle de l'énolase dans des fonctions qui diffèrent de son activité classique a été montré dans plusieurs études. Chez *Streptococcus pneumoniae*, l'énolase a été identifiée comme une protéine ubiquitaire de 47 kDa capable de se lier au plasminogène. Par immunomicroscopie électronique, sa localisation dans le cytoplasme ainsi qu'à la surface de la bactérie a été mise en évidence (31). Bien que présente en faible quantité par rapport aux autres protéines de surface, l'énolase pourrait lier le plasminogène et doter ainsi la bactérie d'une activité protéolytique à sa surface, par l'activation de plasminogène en plasmine (168). Chez *Streptococcus mutans* et *Lactobacillus crispatus*, la présence d'une fraction de l'énolase localisée à la surface bactérienne et capable de se lier au plasminogène a été également décrite (108, 131). La localisation de l'énolase de *L. crispatus* dépendrait des facteurs environnementaux : ainsi l'énolase est localisée à la surface de la bactérie à un pH acide (pH 5,0), alors qu'elle est retrouvée dans la fraction extracellulaire à pH alcalin (pH 8,0).

Chez la plupart des microorganismes cités, l'énolase serait, dans un premier temps, sécrétée dans le milieu extérieur, puis réassociée à la surface de la bactérie, soit au peptidoglycane, soit aux acides lipotéichoïques (6). Il faut noter que l'énolase a aussi été mise en cause dans la liaison au plasminogène chez le parasite *Leishmania mexicana* (307).

Outre ce rôle dans la liaison au plasminogène, les énolases bactériennes présentes à la surface des bactéries peuvent également intervenir dans la liaison aux protéines de la matrice extracellulaire. L'énolase de surface de *Staphylococcus aureus* est capable de se lier à la laminine, (49), alors que chez *Lactobacillus plantarum*, l'énolase interagit avec une autre protéine de la matrice extracellulaire, la fibronectine (54).

3.1.2. La GAPDH

La GAPDH est également une enzyme de la glycolyse ; elle catalyse la phosphorylation oxydative réversible du glycéraldéhyde-3-phosphate en 1,3-diphosphoglycérate en utilisant le $NADP^+$ (nicotinamide adénine dinucléotide) et en produisant une molécule de NADH. Outre cette fonction métabolique, la GAPDH est parfois présente à la surface bactérienne, et a été, le cas échéant, impliquée dans la virulence de plusieurs microorganismes pathogènes.

Chez *Streptoccocus agalactiae*, la protéine GAPDH est capable d'interférer avec le système immunitaire de l'hôte en augmentant le niveau de production de l'interleukine-10, ce qui a

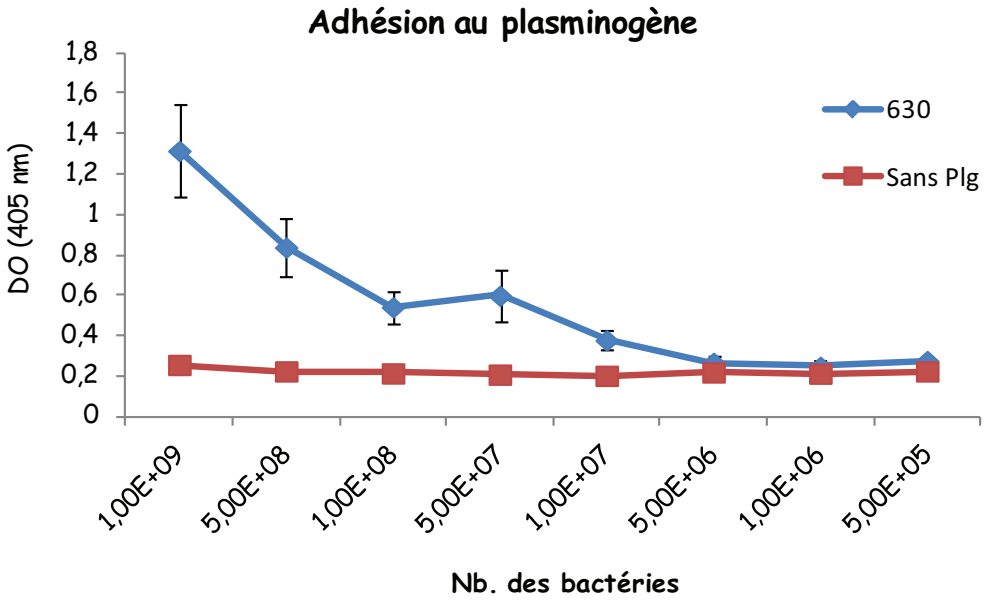


Figure 32. Adhésion au plasminogène humain. Des analyses par test ELISA montrent que la souche 630 de *C. difficile* est capable de lier le plasminogène (Plg).

.

pour conséquence de diminuer les défenses immunitaires et de faciliter ainsi la persistance bactérienne (195). En outre, un rôle dans l'adhésion aux protéines de la matrice extracellulaire à été décrite pour des procaryotes et des eucaryotes. Chez *Streptococcus pyogenes*, la GAPDH est capable de se lier au plasminogène, et sa localisation à la surface de la bactérie est indispensable à la virulence de celle-ci (143). Chez *L. crispatus*, une GAPDH localisée à la surface et capable de lier le plasminogène a également été mise en évidence (131). Un rôle dans la liaison à la fibronectine et au plasminogène a été observé pour la GAPDH localisée à la surface chez *Trichomonas vaginalis* (177).

3.1.3. Le facteur d'élongation EF-Tu

Le facteur d'élongation EF-Tu intervient dans la formation de la liaison peptidique au cours de la synthèse des protéines, mais possède également un rôle dans la virulence. Chez *Lactobacillus johnsonni,* le facteur EF-Tu associé de façon non covalente à la paroi bactérienne est capable d'adhérer aux mucines et aux cellules épithéliales intestinales, l'interaction étant spécifique à pH acide (pH 5,0). En outre, des essais *in vitro* avec l'EF-Tu recombinante sur les cellules épithéliales de la lignée HT29 ont permis de montrer une augmentation de la réponse pro-inflammatoire (119).

Chez *C. difficile*, ces protéines, qui semblent présentes à la surface de la bactérie, pourraient également jouer un rôle dans la virulence de la bactérie. Nous avons choisi de nous intéresser tout particulièrement à l'énolase.

3.2. Liaison au plasminogène de la bactérie entière

Comme nous venons de le voir pour certaines bactéries pathogènes, l'énolase et la GAPDH sont capables, lorsqu'elles sont présentes à la surface bactérienne, de lier le plasminogène en le clivant afin d'acquérir une activité protéolytique de surface. Cette activité enzymatique pourrait faciliter la colonisation et la dissémination de la bactérie dans l'hôte infecté.

Avant d'entreprendre la caractérisation de l'énolase de surface de *C. difficile*, nous avons vérifié la capacité de la souche 630 de *C. difficile* à lier le plasminogène humain. Les résultats

des tests ELISA réalisés montrent que *C. difficile* est effectivement capable de lier le plasminogène. Cette liaison est spécifique, comme le montre la courbe contrôle, et dépendante de la quantité de bactéries (Figure 32).

3.3. Inactivation du gène *eno*

Nous avons ensuite tenté d'inactiver le gène de l'énolase par la technique du Clostron. Le logiciel Targetron propose différents groupes d'amorces dotés d'un score et d'un sens d'insertion (sens ou anti-sens) dans chaque brin d'ADN. Les sites de mutation retenus pour l'inactivation du gène *eno* correspondent aux nucléotides 676 d'une part, et 1086 d'autre part (Tableau 7). Le site 1086 a été retenu car il s'agit du site pour lequel le score est le plus élevé. Le site 676 a été retenu pour son score suffisamment élevé et le sens d'intégration en anti-sens.

La construction du plasmide pMTL0007 n'a cependant pu être réalisée qu'avec l'intron re-ciblé pour le site 676. Nous avons donc continué nos expériences avec cette construction. Les différentes étapes de re-ciblage de l'intron et de sous-clonage ont été réalisées avec succès jusqu'à l'étape de conjugaison entre la souche de *E. coli* BH104 RP4ΩpMTL007$_{eno676}$ et la souche 630*Δerm* de *C. difficile*. Malheureusement, malgré de nombreuses tentatives de conjugaison, les quelques clones récupérés ne correspondaient pas à des mutants du gène *eno*. La taille des amplicons obtenus avec les oligonucléotides RAM-R et RAM-F pour les différents clones analysés était de 900 pb, traduisant l'insertion de l'intron II dans le chromosome et l'excision consécutive de l'intron de type I. En revanche, les fragments amplifiés avec les oligonucléotides enoR et enoF faisaient tous 209pb, ce qui correspond au gène *eno* non interrompu. Ces résultats montrent que l'insertion a eu lieu mais pas au niveau du gène cible, le gène *eno* n'est pas donc interrompu.

L'impossibilité de muter le gène *eno* pourrait s'expliquer par le fait que ce gène est essentiel pour *C. difficile*. Chez *S. pneumoniae*, une tentative d'inactivation du gène de l'énolase a échoué malgré une efficacité de transformation élevée du plasmide contrôle, ce qui suggère que le gène *eno* est essentiel pour cette bactérie (31). L'inactivation d'une énolase (*enoA1*) a cependant été décrite chez *L. plantarum* ; toutefois, il faut noter que cette bactérie possède un deuxième gène *enoA2*, codant potentiellement une autre énolase (54).

4. Conclusions et perspectives

De nombreuses bactéries pathogènes à Gram positif possèdent des protéines de surface qui interviennent dans l'adhésion aux tissus de l'hôte, et qui jouent ainsi un rôle dans la colonisation et la dissémination des bactéries. Chez *C. difficile*, plusieurs adhésines ont été identifiées, il s'agit de protéines de surface : Cwp66, Fbp68, HMW-SLP, FliC, FliD et GroEL. Au cours de cette thèse, d'autres protéines dont le rôle dans l'adhésion à différents tissus hôtes a été démontré pour d'autres bactéries pathogènes ont été identifiés : l'énolase, la GAPDH et le facteur d'élongation EF-Tu.

Les trois protéines identifiées au cours de ce travail ne présentent ni peptide signal en N-terminal permettant l'exportation au travers de la membrane plasmique, ni motif d'ancrage permettant leur fixation covalente à la paroi bactérienne. Elles pourraient appartenir à une nouvelle classe de protéines, dénommées « anchorless proteins », sécrétées puis réassociées de façon non covalente à la surface des bactéries et présentant des capacités d'adhésion à différents tissus ou protéines de l'hôte (62). La forme de 47 kDa de Cwp84 réassociée à la paroi de *C. difficile* semble également partager ce mode de liaison.

Des essais préliminaires nous ont permis de mettre en évidence l'existence d'une liaison de la souche 630 de *C. difficile* au plasminogène, et nous souhaitions poursuivre par l'identification de la protéine responsable de cette liaison. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à inactiver le gène *eno,* ce qui ne nous a pas permis de définir l'implication de l'énolase dans la liaison au plasminogène. L'énolase est une enzyme essentielle de la glycolyse, et qui pourrait être essentielle pour la viabilité de la bactérie.

Cependant, l'énolase nous semble un candidat « facteur de colonisation » intéressant et les perspectives de ces travaux préliminaires sont nombreuses :

- Dans un premier temps, nous envisageons de purifier l'énolase sous forme recombinante, cette technique étant très utilisée au laboratoire, mais nous pourrons également tenter de la purifier sous forme native, à partir de la bactérie.
- L'obtention d'une protéine purifiée nous permettra de produire des anticorps spécifiques anti-énolase, et par la suite de confirmer la localisation de l'énolase à la surface de *C. difficile*, par immunofluorescence ou immunoblot sur différents fractions

protéiques bactériennes (cytoplasmique, extrait de protéines de surface) ; une mesure de l'activité glycolytique de l'énolase de surface peut également être envisagée.

- Des analyses de l'interaction de l'énolase purifiée avec le plasminogène seront réalisées. Cependant, le plasminogène n'est pas la seule cible avec laquelle l'énolase de *C. difficile* est susceptible d'interagir, car la protéine pourrait également lier des constituants de la matrice extracellulaire, comme cela a été décrit chez S. *aureus* et *L. plantarum*. Des tests de liaison à différentes protéines de la matrice extracellulaire pourront donc également être réalisés.

Dans une perspective à plus long terme, les mêmes analyses pourraient être envisagées pour la caractérisation de la GAPDH et du facteur EF-Tu.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La colonisation du tractus digestif par *Clostridium difficile* est un processus qui dépend à la fois de l'altération du microbiote de l'hôte et de la production par la bactérie de protéines favorisant sa persistance et/ou son adhésion aux cellules coliques. Certaines de ces protéines ont été précédemment caractérisées mais aucune adhésine indispensable pour l'étape de colonisation n'a été formellement identifiée, ce qui suggère que ce processus est largement multifactoriel. La régulation par les conditions environnementales de l'expression de facteurs de colonisation connus et d'autres protéines de surface qui pourraient jouer un rôle dans cette étape est sans doute un élément important du processus infectieux.

La contamination de l'hôte par une souche de *C. difficile* se fait majoritairement par des spores, capables de résister au passage de l'estomac, et qui vont progressivement germer suite à l'exposition aux sels biliaires présents dans l'intestin. Les cellules végétatives ainsi formées vont percevoir différents signaux de présence chez l'hôte, comme la température, la carence en fer, mais également la diminution progressive du pH entre l'intestin et le colon où va s'implanter *C. difficile*. In vitro, nous avons montré que l'exposition de cette bactérie à un pH faiblement acide résultant de la fermentation du glucose, se traduit par une augmentation de l'expression de certains facteurs impliqués dans la colonisation, en particulier la protéase Cwp84, les adhésines Cwp66 et GroEL et la protéine de surface majoritaire HMW-SLP. Cette régulation positive pourrait donc favoriser l'implantation de *C. difficile*. L'exposition de cette bactérie à un pH acide se traduit également par des modifications dans la répartition cellulaire de la protéase, Cwp84. En effet, cette cystéine protéase existe sous deux formes à la surface bactérienne, une forme de 77 kDa vraisemblablement à l'origine de la maturation des protéines de la couche S (largement majoritaires à la surface de la bactérie) et une forme de poids moléculaire plus faible, résultant de la maturation complète de la protéase par un mécanisme majoritairement auto-protéolytique, retrouvée uniquement en conditions de pH acide en présence de glucose. Cette forme de la protéase, que nous définissons comme sa forme mature, est également retrouvée dans la fraction extracellulaire et pourrait être responsable de la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire. En présence d'un pH acide, la protéase serait sécrétée sous sa forme mature dans le milieu extérieur, où sa capacité à dégrader certaines protéines de la matrice extracellulaire pourrait favoriser sa dissémination au sein des tissus de l'hôte. Le rôle du pH dans la régulation de l'expression des facteurs de colonisation semble donc être important pour la bactérie et une analyse des mécanismes pourrait être entreprise.

Enfin, nos travaux soulignent l'importance, chez *C. difficile*, des "anchorless proteins", ces protéines sécrétées dans le milieu extérieur et capables de se réassocier à la surface de la bactérie par des mécanismes de liaison inconnus à ce jour. Plusieurs protéines de ce type existent à la surface de *C. difficile*, dont certaines ont été caractérisées au cours de ce travail : la forme mature de la protéase Cwp84, mais également l'énolase ou la GAPDH. Il faut noter que le mécanisme de réassociation de ces protéines à la surface de la bactérie pourrait également dépendre du pH, comme cela a été démontré chez d'autres bactéries, faisant de cette condition environnementale un élément majeur dans la régulation de la colonisation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Aas, J., C. E. Gessert, and J. S. Bakken.** 2003. Recurrent *Clostridium difficile* colitis: case series involving 18 patients treated with donor stool administered via a nasogastric tube. Clin Infect Dis **36:**580-585.

2. **Abougergi, M. S., A. Broor, W. Cui, and B. G. Jaar.** 2010. Intravenous immunoglobulin for the treatment of severe *Clostridium difficile* colitis: an observational study and review of the literature. J Hosp Med **5:**E1-9.

3. **Acambis.** 2007. Acambis concludes *C. difficile* vaccine formulation work on schedule and will commence proof-of-concept trial in 2008. http://www.bionity.com/en/news/75972/?WT.mc_id=ca0068.

4. **Akerlund, T., I. Persson, M. Unemo, T. Noren, B. Svenungsson, M. Wullt, and L. G. Burman.** 2008. Increased sporulation rate of epidemic *Clostridium difficile* Type 027/NAP1. J Clin Microbiol **46:**1530-1533.

5. **Albrich, W. C., and D. Rimland.** 2007. *Clostridium difficile*: association with thrombocytosis and leukocytosis. South Med J **100:**149-151.

6. **Antikainen, J., V. Kuparinen, K. Lahteenmaki, and T. K. Korhonen.** 2007. pH-dependent association of enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Lactobacillus crispatus* with the cell wall and lipoteichoic acids. J Bacteriol **189:**4539-4543.

7. **Antunes, A., I. Martin-Verstraete, and B. Dupuy.** 2011. CcpA-mediated repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression. Mol Microbiol **79:**882-899.

8. **Arora, S. K., B. W. Ritchings, E. C. Almira, S. Lory, and R. Ramphal.** 1996. Cloning and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* fliF, necessary for flagellar assembly and bacterial adherence to mucin. Infect Immun **64:**2130-2136.

9. **Aslam, S., R. J. Hamill, and D. M. Musher.** 2005. Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapies and new strategies. Lancet Infect Dis **5:**549-557.

10. **Bakken, J. S.** 2009. Fecal bacteriotherapy for recurrent *Clostridium difficile* infection. Anaerobe **15:**285-289.

11. **Barbut, F., D. Decré, V. Lalande, B. Burghoffer, L. Noussair, A. Gigandon, F. Espinasse, L. Raskine, J. Robert, A. Mangeol, C. Branger, and J. C. Petit.** 2005. Clinical features of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase)-producing strains. J Med Microbiol **54:**181-185.

12. **Barbut, F., B. Gariazzo, L. Bonne, V. Lalande, B. Burghoffer, R. Luiuz, and J. C. Petit.** 2007. Clinical features of *Clostridium difficile*-associated infections and molecular characterization of strains: results of a retrospective study, 2000-2004. Infect Control Hosp Epidemiol **28:**131-139.

13. **Barbut, F., V. Lalande, B. Burghoffer, H. V. Thien, E. Grimprel, and J. C. Petit.** 2002. Prevalence and genetic characterization of toxin A variant strains of *Clostridium difficile* among adults and children with diarrhea in France. J Clin Microbiol **40:**2079-2083.

14. **Barbut, F., V. Lalande, and J. C. Petit.** 2004. Épidémiologie et prévention des infections digestives à *Clostridium difficile*. Rev Franç Lab **368:**27-34.

15. **Barbut, F., A. Richard, K. Hamadi, V. Chomette, B. Burghoffer, and J. C. Petit.** 2000. Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. J Clin Microbiol **38:**2386-2388.

16. **Barc, M. C., C. Depitre, G. Corthier, A. Collignon, W. J. Su, and P. Bourlioux.** 1992. Effects of antibiotics and other drugs on toxin production in *Clostridium difficile in vitro* and *in vivo*. Antimicrob Agents Chemother **36:**1332-1335.

17. **Barketi-Klai, A., S. Hoys, S. Lambert-Bordes, A. Collignon, and I. Kansau.** 2011. Role of fibronectin-binding protein A in *Clostridium difficile* intestinal colonization. J Med Microbiol **60:**1155-1161.

18. **Barrett, A. J., and N. D. Rawlings.** 2001. Evolutionary lines of cysteine peptidases. Biol Chem **382:**727-733.

19. **Barth, H., G. Pfeifer, F. Hofmann, E. Maier, R. Benz, and K. Aktories.** 2001. Low pH-induced formation of ion channels by *Clostridium difficile* toxin B in target cells. J Biol Chem **276:**10670-10676.

20. **Bartlett, J. G.** 2010. *Clostridium difficile*: progress and challenges. Ann N Y Acad Sci **1213:**62-69.

21. **Bartlett, J. G.** 1996. Management of *Clostridium difficile* infection and other antibiotic-associated diarrhoeas. Eur J Gastroenterol Hepatol **8:**1054-1061.

22. **Bartlett, J. G., T. Chang, M. Gurwith, S. Gorbach, and A. Onderdonk.** 1978. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing Clostridia. N Eng J Med **298:**531-534.

23. **Bartlett, J. G., A. B. Onderdonk, R. L. Cisneros, and D. L. Kasper.** 1977. Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters. J Infect Dis **136:**701-705.

24. **Bartlett, J. G., N. S. Taylor, T. Chang, and J. Dzink.** 1980. Clinical and laboratory observations in *Clostridium difficile* colitis. Am J Clin Nutr **33:**2521-2526.

25. **Bauer, M. P., E. J. Kuijper, and J. T. van Dissel.** 2009. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI). Clin Microbiol Infect **15:**1067-1079.

26. **Bauer, M. P., D. W. Notermans, B. H. van Benthem, J. S. Brazier, M. H. Wilcox, M. Rupnik, D. L. Monnet, J. T. van Dissel, and E. J. Kuijper.** 2010. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. Lancet **377:**63-73.

27. **Beaugerie, L., A. Flahault, F. Barbut, P. Atlan, V. Lalande, P. Cousin, M. Cadilhac, and J. C. Petit.** 2003. Antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* in the community. Aliment Pharmacol Ther **17:**905-912.

28. **Beier, D., and R. Gross.** 2006. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. Curr Opin Microbiol **9:**143-152.

29. **Belanger, S. D., M. Boissinot, N. Clairoux, F. J. Picard, and M. G. Bergeron.** 2003. Rapid detection of *Clostridium difficile* in feces by real-time PCR. J Clin Microbiol **41:**730-734.

30. **Berge, A., and L. Bjorck.** 1995. Streptococcal cysteine proteinase releases biologically active fragments of streptococcal surface proteins. J Biol Chem **270:**9862-9867.

31. **Bergmann, S., M. Rohde, G. S. Chhatwal, and S. Hammerschmidt.** 2001. alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. Mol Microbiol **40:**1273-1287.

32. **Beveridge, T. J., and L. L. Graham.** 1991. Surface layers of bacteria. Microbiol Rev **55:**684-705.

33. **Bianco, M., G. Fedele, A. Quattrini, P. Spigaglia, F. Barbanti, P. Mastrantonio, and C. M. Ausiello.** 2011. Immunomodulatory activities of surface-layer proteins obtained from epidemic and hypervirulent *Clostridium difficile* strains. J Med Microbiol **60:**1162-1167.

34. **Bignardi, G. E.** 1998. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. J Hosp Infect **40:**1-15.

35. **Blot, E., M. C. Escande, D. Besson, F. Barbut, C. Granpeix, B. Asselain, M. C. Falcou, and P. Pouillart.** 2003. Outbreak of *Clostridium difficile*-related diarrhoea in an adult oncology unit: risk factors and microbiological characteristics. J Hosp Infect **53:**187-192.

36. **Bongaerts, G. P., and D. M. Lyerly.** 1994. Role of toxins A and B in the pathogenesis of *Clostridium difficile* disease. Microb Pathog **17:**1-12.

37. **Bonnefoy, A., and M. R. Popoff.** 1992. Prévalence des diarrhées à *Clostridium difficile* dans un groupe de sujets VIH-séropositifs. Méd Mal Infect **22:**9-13.

38. **Borriello, S. P., A. R. Welch, F. E. Barclay, and H. A. Davies.** 1988. Mucosal association by *Clostridium difficile* in the hamster gastrointestinal tract. J Med Microbiol **25:**191-196.

39. **Bouttier, S., M. C. Barc, B. Felix, S. Lambert, A. Collignon, and F. Barbut.** 2010. *Clostridium difficile* in ground meat, France. Emerg Infect Dis **16:**733-735.

40. **Bromme, D., F. S. Nallaseth, and B. Turk.** 2004. Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. Methods **32:**199-206.

41. **Bruggemann, H.** 2005. Genomics of clostridial pathogens: implication of extrachromosomal elements in pathogenicity. Curr Opin Microbiol **8:**601-605.

42. **Burns, D. A., D. Heeg, S. T. Cartman, and N. P. Minton.** 2011. Reconsidering the sporulation characteristics of hypervirulent *Clostridium difficile* BI/NAP1/027. PLoS One **6:**e24894.

43. **Burns, E. H., Jr., A. M. Marciel, and J. M. Musser.** 1996. Activation of a 66-kilodalton human endothelial cell matrix metalloprotease by *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease. Infect Immun **64:**4744-4750.

44. **Calabi, E., F. Calabi, A. D. Phillips, and N. F. Fairweather.** 2002. Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. Infect Immun **70:**5770-5778.

45. **Calabi, E., and N. Fairweather.** 2002. Patterns of sequence conservation in the S-Layer proteins and related sequences in *Clostridium difficile*. J Bacteriol **184:**3886-3897.

46. **Calabi, E., S. Ward, B. Wren, T. Paxton, M. Panico, H. Morris, A. Dell, G. Dougan, and N. Fairweather.** 2001. Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*. Mol Microbiol **40:**1187-1199.

47. **Candela, T., and A. Fouet.** 2005. *Bacillus anthracis* CapD, belonging to the gamma-glutamyltranspeptidase family, is required for the covalent anchoring of capsule to peptidoglycan. Molecular microbiology **57:**717-726.

48. **Carlisle, M. D., R. N. Srikantha, and K. A. Brogden.** 2009. Degradation of human alpha- and beta-defensins by culture supernatants of *Porphyromonas gingivalis* strain 381. J Innate Immun **1:**118-122.

49. **Carneiro, C. R., E. Postol, R. Nomizo, L. F. Reis, and R. R. Brentani.** 2004. Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of *Staphylococcus aureus*. Microbes Infect **6:**604-608.

50. **Carter, G. P., D. Lyras, D. L. Allen, K. E. Mackin, P. M. Howarth, J. R. O'Connor, and J. I. Rood.** 2007. Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. J Bacteriol **189:**7290-7301.

51. **Carter, G. P., D. Purdy, P. Williams, and N. P. Minton.** 2005. Quorum sensing in *Clostridium difficile*: analysis of a *luxS*-type signalling system. J Med Microbiol **54:**119-127.

52. **Carter, G. P., J. I. Rood, and D. Lyras.** 2010. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile*-associated disease: Past and present perspectives. Gut Microbes **1:**58-64.

53. **Cartman, S. T., J. T. Heap, S. A. Kuehne, A. Cockayne, and N. P. Minton.** 2010. The emergence of 'hypervirulence' in *Clostridium difficile*. Int J Med Microbiol **300:**387-395.

54. **Castaldo, C., V. Vastano, R. A. Siciliano, M. Candela, M. Vici, L. Muscariello, R. Marasco, and M. Sacco.** 2009. Surface displaced alfa-enolase of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein. Microb Cell Fact **8:**14.

55. **Cerquetti, M., A. Molinari, A. Sebastianelli, M. Diociaiuti, R. Petruzzelli, C. Capo, and P. Mastrantonio.** 2000. Characterization of surface layer proteins from different *Clostridium difficile* clinical isolates. Microb Pathog **28:**363-372.

56. **Cerquetti, M., A. Serafino, A. Sebastianelli, and P. Mastrantonio.** 2002. Binding of *Clostridium difficile* to Caco-2 epithelial cell line and to extracellular matrix proteins. FEMS Immunol Med Microbiol **32:**211-218.

57. **Chabriere, E.**, posting date. Protéases. [Online.]

58. **Chang, A. K., H. Y. Kim, J. E. Park, P. Acharya, I. S. Park, S. M. Yoon, H. J. You, K. S. Hahm, J. K. Park, and J. S. Lee.** 2005. *Vibrio vulnificus* secretes a broad-specificity metalloprotease capable of interfering with blood homeostasis through prothrombin activation and fibrinolysis. J Bacteriol **187:**6909-6916.

59. **Chang, S. C., P. C. Chang, and Y. H. Lee.** 1994. The roles of propeptide in maturation and secretion of Npr protease from *Streptomyces*. J Biol Chem **269:**3548-3554.

60. **Chapeton Montes, D., T. Candela, A. Collignon, and C. Janoir.** 2011. Localization of the *Clostridium difficile* Cysteine Protease Cwp84 and Insights into Its Maturation Process. J Bacteriol **193:**5314-5321.

61. **Chen, C. Y., S. C. Luo, C. F. Kuo, Y. S. Lin, J. J. Wu, M. T. Lin, C. C. Liu, W. Y. Jeng, and W. J. Chuang.** 2003. Maturation processing and characterization of streptopain. J Biol Chem **278:**17336-17343.

62. **Chhatwal, G. S.** 2002. Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors. Trends in microbiology **10:**205-208.

63. **Cloud, J., and C. P. Kelly.** 2007. Update on *Clostridium difficile* associated disease. Curr Opin Gastroenterol **23:**4-9.

64. **Cohen, S. H., Y. J. Tang, and J. Silva, Jr.** 2000. Analysis of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile* strains. J Infect Dis **181:**659-663.

65. **Coignard, B., F. Barbut, K. Blanckaert, J. Thiolet, A. Carbonne, I. Poujol, V. Lalande, L. Lemée, F. Mory, H. Marchandin, P. Boquet, N. Marty, J. Carlier, and J. Desenclos.** 2007. Actualité des infections digestives à *Clostridium difficile*, France, 2007. Rev Franç Lab **396:**41-48.

66. **Collin, M., and A. Olsen.** 2001. Effect of SpeB and EndoS from *Streptococcus pyogenes* on human immunoglobulins. Infect Immun **69:**7187-7189.

67. **Coutte, L., E. Willery, R. Antoine, H. Drobecq, C. Locht, and F. Jacob-Dubuisson.** 2003. Surface anchoring of bacterial subtilisin important for maturation function. Molecular microbiology **49:**529-539.

68. **Crobach, M. J., O. M. Dekkers, M. H. Wilcox, and E. J. Kuijper.** 2009. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). Clin Microbiol Infect **15:**1053-1066.

69. **Curry, S. R., J. W. Marsh, C. A. Muto, M. M. O'Leary, A. W. Pasculle, and L. H. Harrison.** 2007. tcdC genotypes associated with severe TcdC truncation in an epidemic clone and other strains of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol **45:**215-221.

70. **Dang, T. H., L. de la Riva, R. P. Fagan, E. M. Storck, W. P. Heal, C. Janoir, N. F. Fairweather, and E. W. Tate.** 2010. Chemical probes of surface layer biogenesis in *Clostridium difficile*. ACS Chem Biol **5:**279-285.

71. **Datta, A. R., and M. H. Kothary.** 1993. Effects of glucose, growth temperature, and pH on listeriolysin O production in *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol **59:**3495-3497.

72. **Dautin, N., T. J. Barnard, D. E. Anderson, and H. D. Bernstein.** 2007. Cleavage of a bacterial autotransporter by an evolutionarily convergent autocatalytic mechanism. The EMBO journal **26:**1942-1952.

73. **de la Riva, L., S. E. Willing, E. W. Tate, and N. F. Fairweather.** 2011. Roles of cysteine proteases Cwp84 and Cwp13 in biogenesis of the cell wall of *Clostridium difficile*. J Bacteriol **193:**3276-3285.

74. **Decré, D., J. Tankovic, F. Barbut, and J. C. Petit.** 2004. Sensibilité de *Clostridium difficile* aux antibiotiques et traitement des infections. Rev. Franç. Lab **368:**65-71.

75. **Del Papa, M. F., L. E. Hancock, V. C. Thomas, and M. Perego.** 2007. Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage. J Bacteriol **189:**8835-8843.

76. **Deneve, C., S. Bouttier, B. Dupuy, F. Barbut, A. Collignon, and C. Janoir.** 2009. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on colonization factor expression by moxifloxacin-susceptible and moxifloxacin-resistant *Clostridium difficile* strains. Antimicrob Agents Chemother **53:**5155-5162.

77. **Deneve, C., C. Delomenie, M. C. Barc, A. Collignon, and C. Janoir.** 2008. Antibiotics involved in *Clostridium difficile*-associated disease increase colonization factor gene expression. J Med Microbiol **57:**732-738.

78. **Deneve, C., C. Janoir, I. Poilane, C. Fantinato, and A. Collignon.** 2009. New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. Int J Antimicrob Agents **33 Suppl 1:**S24-28.

79. **Depardieu, F., I. Podglajen, R. Leclercq, E. Collatz, and P. Courvalin.** 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. Clin Microbiol Rev **20:**79-114.

80. **Dhalluin, A., I. Bourgeois, M. Pestel-Caron, E. Camiade, G. Raux, P. Courtin, M. P. Chapot-Chartier, and J. L. Pons.** 2005. Acd, a peptidoglycan hydrolase of *Clostridium difficile* with N-acetylglucosaminidase activity. Microbiology **151:**2343-2351.

81. **Dial, S., J. A. Delaney, A. N. Barkun, and S. Suissa.** 2005. Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease. JAMA **294:**2989-2995.

82. **Dillon, S. T., E. J. Rubin, M. Yakubovich, C. Pothoulakis, J. T. LaMont, L. A. Feig, and R. J. Gilbert.** 1995. Involvement of Ras-related Rho proteins in the mechanisms of action of *Clostridium difficile* toxin A and toxin B. Infect Immun **63:**1421-1426.

83. **Dineen, S. S., S. M. McBride, and A. L. Sonenshein.** 2010. Integration of metabolism and virulence by *Clostridium difficile* CodY. J Bacteriol **192:**5350-5362.

84. **Dineen, S. S., A. C. Villapakkam, J. T. Nordman, and A. L. Sonenshein.** 2007. Repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression by CodY. Mol Microbiol **66:**206-219.

85. **Dingle, T. C., G. L. Mulvey, and G. D. Armstrong.** 2011. Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters. Infect Immun.

86. **Doran, J. D., M. Nomizu, S. Takebe, R. Menard, D. Griffith, and E. Ziomek.** 1999. Autocatalytic processing of the streptococcal cysteine protease zymogen: processing mechanism and characterization of the autoproteolytic cleavage sites. Eur J Biochem **263:**145-151.

87. **Dos Santos, A. L.** 2011. Protease expression by microorganisms and its relevance to crucial physiological/pathological events. World J Biol Chem **2:**48-58.

88. **Drudy, D., D. P. O'Donoghue, A. Baird, L. Fenelon, and C. O'Farrelly.** 2001. Flow cytometric analysis of *Clostridium difficile* adherence to human intestinal epithelial cells. J Med Microbiol **50:**526-534.

89. **Dupuy, B., R. Govind, A. Antunes, and S. Matamouros.** 2008. *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. J Med Microbiol **57:**685-689.

90. **Dupuy, B., and A. L. Sonenshein.** 1998. Regulated transcription of *Clostridium difficile* toxin genes. Mol Microbiol **27:**107-120.

91. **Eaton, K. A., S. Suerbaum, C. Josenhans, and S. Krakowka.** 1996. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. Infect Immun **64:**2445-2448.

92. **Egerer, M., T. Giesemann, T. Jank, K. J. Satchell, and K. Aktories.** 2007. Auto-catalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxins A and B depends on cysteine protease activity. J Biol Chem **282:**25314-25321.

93. **Egesten, A., A. I. Olin, H. M. Linge, M. Yadav, M. Morgelin, A. Karlsson, and M. Collin.** 2009. SpeB of *Streptococcus pyogenes* differentially modulates antibacterial and receptor activating properties of human chemokines. PLoS One **4:**e4769.

94. **Eiseman, B., W. Silen, G. S. Bascom, and A. J. Kauvar.** 1958. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. Surgery **44:**854-859.

95. **Emerson, J. E., C. B. Reynolds, R. P. Fagan, H. A. Shaw, D. Goulding, and N. F. Fairweather.** 2009. A novel genetic switch controls phase variable expression of CwpV, a *Clostridium difficile* cell wall protein. Mol Microbiol **74:**541-556.

96. **Emerson, J. E., R. A. Stabler, B. W. Wren, and N. F. Fairweather.** 2008. Microarray analysis of the transcriptional responses of *Clostridium difficile* to environmental and antibiotic stress. J Med Microbiol **57:**757-764.

97. **Eveillard, M., V. Fourel, M. C. Barc, S. Kernéis, M. H. Coconnier, T. Karjalainen, P. Bourlioux, and A. L. Servin.** 1993. Identification and characterization of adhesive factors of *Clostridium difficile* involved in adhesion to human colonic enterocyte-like Caco-2 and mucus-secreting HT29 cells in culture. Mol Microbiol **7:**371-381.

98. **Fagan, R. P., D. Albesa-Jove, O. Qazi, D. I. Svergun, K. A. Brown, and N. F. Fairweather.** 2009. Structural insights into the molecular organization of the S-layer from *Clostridium difficile*. Mol Microbiol **71:**1308-1322.

99. **Fagan, R. P., C. Janoir, A. Collignon, P. Mastrantonio, I. R. Poxton, and N. F. Fairweather.** 2011. A proposed nomenclature for cell wall proteins of *Clostridium difficile*. J Med Microbiol.

100. **Fallingborg, J., L. A. Christensen, M. Ingeman-Nielsen, B. A. Jacobsen, K. Abildgaard, H. H. Rasmussen, and S. N. Rasmussen.** 1990. Measurement of gastrointestinal pH and regional transit times in normal children. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition **11:**211-214.

101. **Fiorentini, C., A. Fabbri, L. Falzano, A. Fattorossi, P. Matarrese, R. Rivabene, and G. Donelli.** 1998. *Clostridium difficile* toxin B induces apoptosis in intestinal cultured cells. Infect Immun **66:**2660-2665.

102. **Forgacs, I., and A. Loganayagam.** 2008. Overprescribing proton pump inhibitors. Bmj **336:**2-3.

103. **Frey, P. A., and A. D. Hegeman.** 2007. Enzymatic reaction Mechanisms.

104. **Frisch, C., R. Gerhard, K. Aktories, F. Hofmann, and I. Just.** 2003. The complete receptor-binding domain of *Clostridium difficile* toxin A is required for endocytosis. Biochem Biophys Res Commun **300:**706-711.

105. **Ganeshapillai, J., E. Vinogradov, J. Rousseau, J. S. Weese, and M. A. Monteiro.** 2008. *Clostridium difficile* cell-surface polysaccharides composed of pentaglycosyl and hexaglycosyl phosphate repeating units. Carbohydr Res **343:**703-710.

106. **Gardiner, D. F., T. Rosenberg, J. Zaharatos, D. Franco, and D. D. Ho.** 2009. A DNA vaccine targeting the receptor-binding domain of *Clostridium difficile* toxin A. Vaccine **27:**3598-3604.

107. **Garey, K. W., Z. D. Jiang, S. Ghantoji, V. H. Tam, V. Arora, and H. L. Dupont.** 2010. A common polymorphism in the interleukin-8 gene promoter is associated with an increased risk for recurrent *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis **51:**1406-1410.

108. **Ge, J., D. M. Catt, and R. L. Gregory.** 2004. *Streptococcus mutans* surface alpha-enolase binds salivary mucin MG2 and human plasminogen. Infect Immun **72:**6748-6752.

109. **Genisyuerek, S., P. Papatheodorou, G. Guttenberg, R. Schubert, R. Benz, and K. Aktories.** 2011. Structural determinants for membrane insertion, pore formation and translocation of *Clostridium difficile* toxin B. Mol Microbiol **79:**1643-1654.

110. **Gerber, M., C. Walch, B. Loffler, K. Tischendorf, U. Reischl, and G. Ackermann.** 2008. Effect of sub-MIC concentrations of metronidazole, vancomycin, clindamycin and linezolid on toxin gene transcription and production in *Clostridium difficile*. J Med Microbiol **57:**776-783.

111. **Gerhard, R., S. Nottrott, J. Schoentaube, H. Tatge, A. Olling, and I. Just.** 2008. Glucosylation of Rho GTPases by *Clostridium difficile* toxin A triggers apoptosis in intestinal epithelial cells. J Med Microbiol **57:**765-770.

112. **Geric, B., R. J. Carman, M. Rupnik, C. W. Genheimer, S. P. Sambol, D. M. Lyerly, D. N. Gerding, and S. Johnson.** 2006. Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters. J Infect Dis **193:**1143-1150.

113. **Giel, J. L., J. A. Sorg, A. L. Sonenshein, and J. Zhu.** 2010. Metabolism of bile salts in mice influences spore germination in *Clostridium difficile*. PLoS One **5:**e8740.

114. **Giesemann, T., T. Jank, R. Gerhard, E. Maier, I. Just, R. Benz, and K. Aktories.** 2006. Cholesterol-dependent pore formation of *Clostridium difficile* toxin A. J Biol Chem **281:**10808-10815.

115. **Goldenberg, S. D., T. Dieringer, and G. L. French.** 2010. Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in diarrheal stools by rapid real-time polymerase chain reaction. Diagn Microbiol Infect Dis **67:**304-307.

116. **Goorhuis, A., D. Bakker, J. Corver, S. B. Debast, C. Harmanus, D. W. Notermans, A. A. Bergwerff, F. W. Dekker, and E. J. Kuijper.** 2008. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. Clin Infect Dis **47:**1162-1170.

117. **Gorke, B., and J. Stulke.** 2008. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. Nat Rev Microbiol **6:**613-624.

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

119. **Granato, D., G. E. Bergonzelli, R. D. Pridmore, L. Marvin, M. Rouvet, and I. E. Corthesy-Theulaz.** 2004. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. Infect Immun **72:**2160-2169.

120. **Gravel, D., M. Miller, A. Simor, G. Taylor, M. Gardam, A. McGeer, J. Hutchinson, D. Moore, S. Kelly, D. Boyd, and M. Mulvey.** 2009. Health care-associated *Clostridium difficile* infection in adults admitted to acute care hospitals in Canada: a Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program Study. Clin Infect Dis **48:**568-576.

121. **Green, G. A., R. Girardot, O. Baldacini, M. Ledig, and H. Monteil.** 1993. Characterization of enolase from *Clostridium difficile*. Current Microbiology **26:**53-56.

122. **Hall, I., and E. O'Toole.** 1935. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. Am. J. Dis. Child **49:**390.

123. **Hammond, G. A., and J. L. Johnson.** 1995. The toxigenic element of *Clostridium difficile* strain VPI 10463. Microb Pathog **19:**203-213.

124. **He, D., S. Sougioultzis, S. Hagen, J. Liu, S. Keates, A. C. Keates, C. Pothoulakis, and J. T. Lamont.** 2002. *Clostridium difficile* toxin A triggers human colonocyte IL-8 release via mitochondrial oxygen radical generation. Gastroenterology **122:**1048-1057.

125. **Heap, J. T., O. J. Pennington, S. T. Cartman, G. P. Carter, and N. P. Minton.** 2007. The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus Clostridium. J Microbiol Methods **70:**452-464.

126. **Hennequin, C., A. Collignon, and T. Karjalainen.** 2001. Analysis of expression of GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* in response to stress. Microb Pathog **31:**255-260.

127. **Hennequin, C., C. Janoir, M. C. Barc, A. Collignon, and T. Karjalainen.** 2003. Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. Microbiology **149:**2779-2787.

128. **Hennequin, C., F. Porcheray, A. Waligora-Dupriet, A. Collignon, M. Barc, P. Bourlioux, and T. Karjalainen.** 2001. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. Microbiology **147:**87-96.

129. **Herwald, H., and A. Egesten.** 2009. Bacterial proteases disarming host defense. J Innate Immun **1:**69.

130. **Hickson, M., A. L. D'Souza, N. Muthu, T. R. Rogers, S. Want, C. Rajkumar, and C. J. Bulpitt.** 2007. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. Bmj **335:**80.

131. **Hurmalainen, V., S. Edelman, J. Antikainen, M. Baumann, K. Lahteenmaki, and T. K. Korhonen.** 2007. Extracellular proteins of *Lactobacillus crispatus* enhance activation of human plasminogen. Microbiology **153:**1112-1122.

132. **Hytonen, J., S. Haataja, D. Gerlach, A. Podbielski, and J. Finne.** 2001. The SpeB virulence factor of *Streptococcus pyogenes*, a multifunctional secreted and cell surface molecule with strepadhesin, laminin-binding and cysteine protease activity. Mol Microbiol **39:**512-519.

133. **InVS** 2009, posting date. Infections à *Clostridium difficile* : situation épidémiologique, France, janvier 2009 - juin 2009 Bilan au 30 juin 2009. http://www.invs.sante.fr/surveillance/icd/bilan_national_2009/index.htm. [Online.]

134. **InVS.** 2010. Infections à *Clostridium difficile* : situation épidémiologique, France, juillet 2009 - juin 2010 Bilan au 30 août 2010. http://www.invs.sante.fr/surveillance/icd/bilan_national_2010/index.htm.

135. **Jain, S., C. Graham, R. L. Graham, G. McMullan, and N. G. Ternan.** 2011. Quantitative proteomic analysis of the heat stress response in *Clostridium difficile* strain 630. J Proteome Res **10:**3880-3890.

136. **Jain, S., R. L. Graham, G. McMullan, and N. G. Ternan.** 2010. Proteomic analysis of the insoluble subproteome of *Clostridium difficile* strain 630. FEMS microbiology letters **312:**151-159.

137. **Jangi, S., and J. T. Lamont.** 2010. Asymptomatic colonization by *Clostridium difficile* in infants: implications for disease in later life. J Pediatr Gastroenterol Nutr **51:**2-7.

138. **Janoir, C., J. Grenery, M. P. Savariau-Lacomme, and A. Collignon.** 2004. Characterization of an extracellular protease from *Clostridium difficile*. Pathol Biol (Paris) **52:**444-449.

139. **Janoir, C., S. Péchiné, C. Grosdidier, and A. Collignon.** 2007. Cwp84, a surface-associated protein of *Clostridium difficile*, is a cysteine protease with degrading activity on extracellular matrix proteins. J Bacteriol **189:**7174-7180.

140. **Jensen, K., P. R. Ostergaard, R. Wilting, and S. F. Lassen.** 2010. Identification and characterization of a bacterial glutamic peptidase. BMC Biochem **11:**47.

141. **Jiang, Z. D., K. W. Garey, M. Price, G. Graham, P. Okhuysen, T. Dao-Tran, M. LaRocco, and H. L. DuPont.** 2007. Association of interleukin-8 polymorphism and immunoglobulin G anti-toxin A in patients with *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Clin Gastroenterol Hepatol **5:**964-968.

142. **Jiang, Z. D., P. C. Okhuysen, D. C. Guo, R. He, T. M. King, H. L. DuPont, and D. M. Milewicz.** 2003. Genetic susceptibility to enteroaggregative *Escherichia coli* diarrhea: polymorphism in the interleukin-8 promotor region. J Infect Dis **188:**506-511.

143. **Jin, H., S. Agarwal, S. Agarwal, and V. Pancholi.** 2011. Surface export of GAPDH/SDH, a glycolytic enzyme, is essential for *Streptococcus pyogenes* virulence. MBio **2**.

144. **Johnson, A. P.** 2010. New antibiotics for selective treatment of gastrointestinal infection caused by *Clostridium difficile*. Expert Opin Ther Pat **20:**1389-1399.

145. **Johnson, S., S. R. Homann, K. M. Bettin, J. N. Quick, C. R. Clabots, L. R. Peterson, and D. N. Gerding.** 1992. Treatment of asymptomatic *Clostridium difficile* carriers (fecal excretors) with vancomycin or metronidazole. A randomized, placebo-controlled trial. Ann Intern Med **117:**297-302.

146. **Johnson, S., C. Schriever, U. Patel, T. Patel, D. W. Hecht, and D. N. Gerding.** 2009. Rifaximin Redux: treatment of recurrent *Clostridium difficile* infections with rifaximin immediately post-vancomycin treatment. Anaerobe **15:**290-291.

147. **Juang, P., S. J. Skledar, N. K. Zgheib, D. L. Paterson, E. N. Vergis, W. D. Shannon, N. T. Ansani, and R. A. Branch.** 2007. Clinical outcomes of intravenous immune globulin in severe *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Am J Infect Control **35:**131-137.

148. **Juillard, V., H. Laan, E. R. Kunji, C. M. Jeronimus-Stratingh, A. P. Bruins, and W. N. Konings.** 1995. The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes beta-casein into more than one hundred different oligopeptides. J Bacteriol **177:**3472-3478.

149. **Just, I., and R. Gerhard.** 2004. Large clostridial cytotoxins. Rev Physiol Biochem Pharmacol **152:**23-47.

150. **Just, I., J. Selzer, M. Wilm, C. von Eichel-Streiber, M. Mann, and K. Aktories.** 1995. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. Nature **375:**500-503.

151. **Kadowaki, T., K. Nakayama, K. Okamoto, N. Abe, A. Baba, Y. Shi, D. B. Ratnayake, and K. Yamamoto.** 2000. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence determinants in progression of periodontal diseases. J Biochem **128:**153-159.

152. **Kadowaki, T., K. Nakayama, F. Yoshimura, K. Okamoto, N. Abe, and K. Yamamoto.** 1998. Arg-gingipain acts as a major processing enzyme for various cell surface proteins in *Porphyromonas gingivalis*. J Biol Chem **273:**29072-29076.

153. **Kamp, H. D., and D. E. Higgins.** 2011. A protein thermometer controls temperature-dependent transcription of flagellar motility genes in *Listeria monocytogenes*. PLoS Pathog **7:**e1002153.

154. **Kapur, V., M. W. Majesky, L. L. Li, R. A. Black, and J. M. Musser.** 1993. Cleavage of interleukin 1 beta (IL-1 beta) precursor to produce active IL-1 beta by a conserved extracellular cysteine protease from *Streptococcus pyogenes*. Proc Natl Acad Sci U S A **90:**7676-7680.

155. **Kapur, V., S. Topouzis, M. W. Majesky, L. L. Li, M. R. Hamrick, R. J. Hamill, J. M. Patti, and J. M. Musser.** 1993. A conserved *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. Microb Pathog **15:**327-346.

156. **Karjalainen, T., M. C. Barc, A. Collignon, S. Trolle, H. Boureau, J. Cotte-Laffitte, and P. Bourlioux.** 1994. Cloning of a genetic determinant from *Clostridium difficile* involved in adherence to tissue culture cells and mucus. Infect Immun **62:**4347-4355.

157. **Karjalainen, T., A. J. Waligora-Dupriet, M. Cerquetti, P. Spigaglia, A. Maggioni, P. Mauri, and P. Mastrantonio.** 2001. Molecular and genomic analysis of genes encoding surface-anchored proteins from *Clostridium difficile*. Infect Immun **69:**3442-3446.

158. **Karlsson, A., P. Saravia-Otten, K. Tegmark, E. Morfeldt, and S. Arvidson.** 2001. Decreased amounts of cell wall-associated protein A and fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* sarA mutants due to up-regulation of extracellular proteases. Infect Immun **69:**4742-4748.

159. **Karlsson, S., L. G. Burman, and T. Akerlund.** 2008. Induction of toxins in *Clostridium difficile* is associated with dramatic changes of its metabolism. Microbiology **154:**3430-3436.

160. **Karlsson, S., L. G. Burman, and T. Akerlund.** 1999. Suppression of toxin production in *Clostridium difficile* VPI 10463 by amino acids. Microbiology **145 (Pt 7):**1683-1693.

161. **Karlsson, S., B. Dupuy, K. Mukherjee, E. Norin, L. G. Burman, and T. Akerlund.** 2003. Expression of *Clostridium difficile* toxins A and B and their sigma factor TcdD is controlled by temperature. Infect Immun **71:**1784-1793.

162. **Karlstrom, O., B. Fryklund, K. Tullus, and L. G. Burman.** 1998. A prospective nationwide study of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in Sweden. The Swedish *C. difficile* study group. Clin Infect Dis **26:**141-145.

163. **Khan, R., and J. Cheesbrough.** 2003. Impact of changes in antibiotic policy on *Clostridium difficile*-associated diarrhoea (CDAD) over a five-year period in a district general hospital. J Hosp Infect **54:**104-108.

164. **Kietzman, C. C., and M. G. Caparon.** 2011. Distinct time-resolved roles for two catabolite-sensing pathways during *Streptococcus pyogenes* infection. Infect Immun **79:**812-821.

165. **Kirby, J. M., H. Ahern, A. K. Roberts, V. Kumar, Z. Freeman, K. R. Acharya, and C. C. Shone.** 2009. Cwp84, a surface-associated cysteine protease, plays a role in the maturation of the surface layer of *Clostridium difficile*. J Biol Chem **284:**34666-34673.

166. **Kirby, J. M., N. Thiyagarajan, A. K. Roberts, C. C. Shone, and K. R. Acharya.** 2011. Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of a putative *Clostridium difficile* surface protein Cwp19. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun **67:**762-767.

167. **Klinkert, B., and F. Narberhaus.** 2009. Microbial thermosensors. Cell Mol Life Sci **66:**2661-2676.

168. **Kolberg, J., A. Aase, S. Bergmann, T. K. Herstad, G. Rodal, R. Frank, M. Rohde, and S. Hammerschmidt.** 2006. *Streptococcus pneumoniae* enolase is important for plasminogen binding despite low abundance of enolase protein on the bacterial cell surface. Microbiology **152:**1307-1317.

169. **Komatsu, M., H. Kato, M. Aihara, K. Shimakawa, M. Iwasaki, Y. Nagasaka, S. Fukuda, S. Matsuo, Y. Arakawa, M. Watanabe, and Y. Iwatani.** 2003. High frequency of antibiotic-associated diarrhea due to toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* in a hospital in Japan and risk factors for infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **22:**525-529.

170. **Kotrba, P., M. Inui, and H. Yukawa.** 2001. Bacterial phosphotransferase system (PTS) in carbohydrate uptake and control of carbon metabolism. J Biosci Bioeng **92:**502-517.

171. **Krivan, H. C., G. F. Clark, D. F. Smith, and T. D. Wilkins.** 1986. Cell surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin: evidence for a glycoconjugate containing the sequence Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc. Infect Immun **53:**573-581.

172. **Kuehne, S. A., S. T. Cartman, J. T. Heap, M. L. Kelly, A. Cockayne, and N. P. Minton.** 2010. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. Nature **467:**711-713.

173. **Kuijper, E. J., B. Coignard, and P. Tull.** 2006. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. Clin Microbiol Infect **12 Suppl 6:**2-18.

174. **Kutty, P. K., C. W. Woods, A. C. Sena, S. R. Benoit, S. Naggie, J. Frederick, S. Evans, J. Engel, and L. C. McDonald.** 2010. Risk factors for and estimated incidence of community-associated *Clostridium difficile* infection, North Carolina, USA. Emerg Infect Dis **16:**197-204.

175. **Kyne, L., M. Warny, A. Qamar, and C. P. Kelly.** 2001. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. Lancet **357:**189-193.

176. **Lalande, V., F. Barbut, and J. C. Petit.** 2004. Diagnostic bactériologique des infections liées à *Clostridium difficile*. Rev Franç Lab **368:**27-34.

177. **Lama, A., A. Kucknoor, V. Mundodi, and J. F. Alderete.** 2009. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*. Infect Immun **77:**2703-2711.

178. **Lambert, P. J., M. Dyck, L. H. Thompson, and G. W. Hammond.** 2009. Population-based surveillance of *Clostridium difficile* infection in Manitoba, Canada, by using interim surveillance definitions. Infect Control Hosp Epidemiol **30:**945-951.

179. **Larson, H. E., A. B. Price, P. Honour, and S. P. Borriello.** 1978. *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. Lancet **1:**1063-1066.

180. **Lee, A. S., and K. P. Song.** 2005. LuxS/autoinducer-2 quorum sensing molecule regulates transcriptional virulence gene expression in *Clostridium difficile*. Biochem Biophys Res Commun **335:**659-666.

181. **Leimeister-Wachter, M., E. Domann, and T. Chakraborty.** 1992. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. J Bacteriol **174:**947-952.

182. **Lemée, L., I. Bourgeois, E. Ruffin, A. Collignon, J. F. Lemeland, and J. L. Pons.** 2005. Multilocus sequence analysis and comparative evolution of virulence-associated genes and housekeeping genes of *Clostridium difficile*. Microbiology **151:**3171-3180.

183. **Limaye, A. P., D. K. Turgeon, B. T. Cookson, and T. R. Fritsche.** 2000. Pseudomembranous colitis caused by a toxin A(-) B(+) strain of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol **38:**1696-1697.

184. **Limbago, B. M., C. M. Long, A. D. Thompson, G. E. Killgore, G. E. Hannett, N. L. Havill, S. Mickelson, S. Lathrop, T. F. Jones, M. M. Park, K. H. Harriman, L. H. Gould, L. C. McDonald, and F. J. Angulo.** 2009. *Clostridium difficile* strains from community-associated infections. J Clin Microbiol **47:**3004-3007.

185. **Lin, Y. P., C. J. Kuo, X. Koleci, S. P. McDonough, and Y. F. Chang.** 2011. Manganese binds to *Clostridium difficile* Fbp68 and is essential for fibronectin binding. J Biol Chem **286:**3957-3969.

186. **Linsky, A., K. Gupta, E. V. Lawler, J. R. Fonda, and J. A. Hermos.** 2010. Proton pump inhibitors and risk for recurrent *Clostridium difficile* infection. Arch Intern Med **170:**772-778.

187. **Litwin, C. M., and S. B. Calderwood.** 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. Clin Microbiol Rev **6:**137-149.

188. **Loo, V. G., L. Poirier, M. A. Miller, M. Oughton, M. D. Libman, S. Michaud, A. M. Bourgault, T. Nguyen, C. Frenette, M. Kelly, A. Vibien, P. Brassard, S. Fenn, K. Dewar,**

T. J. Hudson, R. Horn, P. René, Y. Monczak, and A. Dascal. 2005. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. N Engl J Med **353:**2442-2449.

189. **Louie, T. J., and J. Meddings.** 2004. *Clostridium difficile* infection in hospitals: risk factors and responses. CMAJ **171:**45-46.

190. **Louie, T. J., M. A. Miller, K. M. Mullane, K. Weiss, A. Lentnek, Y. Golan, S. Gorbach, P. Sears, and Y. K. Shue.** 2011. Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med **364:**422-431.

191. **Lowy, I., D. C. Molrine, B. A. Leav, B. M. Blair, R. Baxter, D. N. Gerding, G. Nichol, W. D. Thomas, Jr., M. Leney, S. Sloan, C. A. Hay, and D. M. Ambrosino.** 2010. Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins. N Engl J Med **362:**197-205.

192. **Lyras, D., J. R. O'Connor, P. M. Howarth, S. P. Sambol, G. P. Carter, T. Phumoonna, R. Poon, V. Adams, G. Vedantam, S. Johnson, D. N. Gerding, and J. I. Rood.** 2009. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. Nature **458:**1176-1179.

193. **MacCannell, D. R., T. J. Louie, D. B. Gregson, M. Laverdiere, A. C. Labbe, F. Laing, and S. Henwick.** 2006. Molecular analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 isolates from Eastern and Western Canada. J Clin Microbiol **44:**2147-2152.

194. **Madewell, B. R., J. K. Bea, S. A. Kraegel, M. Winthrop, Y. J. Tang, and J. Silva, Jr.** 1999. *Clostridium difficile*: a survey of fecal carriage in cats in a veterinary medical teaching hospital. J Vet Diagn Invest **11:**50-54.

195. **Madureira, P., M. Baptista, M. Vieira, V. Magalhaes, A. Camelo, L. Oliveira, A. Ribeiro, D. Tavares, P. Trieu-Cuot, M. Vilanova, and P. Ferreira.** 2007. *Streptococcus agalactiae* GAPDH is a virulence-associated immunomodulatory protein. J Immunol **178:**1379-1387.

196. **Mahida, Y. R., S. Makh, S. Hyde, T. Gray, and S. P. Borriello.** 1996. Effect of *Clostridium difficile* toxin A on human intestinal epithelial cells: induction of interleukin 8 production and apoptosis after cell detachment. Gut **38:**337-347.

197. **Makino, S., and R. Moriyama.** 2002. Hydrolysis of cortex peptidoglycan during bacterial spore germination. Med Sci Monit **8:**RA119-127.

198. **Manetti, A. G., T. Koller, M. Becherelli, S. Buccato, B. Kreikemeyer, A. Podbielski, G. Grandi, and I. Margarit.** 2010. Environmental acidification drives *S. pyogenes* pilus expression and microcolony formation on epithelial cells in a FCT-dependent manner. PLoS One **5:**e13864.

199. **Mani, N., and B. Dupuy.** 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.

200. **Mani, N., D. Lyras, L. Barroso, P. Howarth, T. Wilkins, J. I. Rood, A. L. Sonenshein, and B. Dupuy.** 2002. Environmental response and autoregulation of *Clostridium difficile* TxeR, a sigma factor for toxin gene expression. J Bacteriol **184:**5971-5978.

201. **Massimi, I., E. Park, K. Rice, W. Muller-Esterl, D. Sauder, and M. J. McGavin.** 2002. Identification of a novel maturation mechanism and restricted substrate specificity for the SspB cysteine protease of *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem **277:**41770-41777.

202. **Matamouros, S., P. England, and B. Dupuy.** 2007. *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. Mol Microbiol **64:**1274-1288.

203. **Matsushita, O., and A. Okabe.** 2001. Clostridial hydrolytic enzymes degrading extracellular components. Toxicon **39:**1769-1780.

204. **McAleese, F. M., E. J. Walsh, M. Sieprawska, J. Potempa, and T. J. Foster.** 2001. Loss of clumping factor B fibrinogen binding activity by *Staphylococcus aureus* involves cessation of transcription, shedding and cleavage by metalloprotease. J Biol Chem **276:**29969-29978.

205. **McDonald, L. C., G. E. Killgore, A. Thompson, R. C. Owens, Jr., S. V. Kazakova, S. P. Sambol, S. Johnson, and D. N. Gerding.** 2005. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. N Engl J Med **353:**2433-2441.

206. **McFarland, L. V.** 2006. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. Am J Gastroenterol **101:**812-822.

207. **Mekalanos, J. J.** 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. J Bacteriol **174:**1-7.

208. **Metcalf, D. S., and J. S. Weese.** 2011. Binary toxin locus analysis in *Clostridium difficile*. J Med Microbiol **60:**1137-1145.

209. **Mikkelsen, H., M. Sivaneson, and A. Filloux.** 2011. Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. Environ Microbiol **13:**1666-1681.

210. **Miller, M.** Fidaxomicin (OPT-80) for the treatment of *Clostridium difficile* infection. Expert Opin Pharmacother **11:**1569-1578.

211. **Miller, M. A., M. Hyland, M. Ofner-Agostini, M. Gourdeau, and M. Ishak.** 2002. Morbidity, mortality, and healthcare burden of nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhea in Canadian hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol **23:**137-140.

212. **Milohanic, E., R. Jonquieres, P. Cossart, P. Berche, and J. L. Gaillard.** 2001. The autolysin Ami contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells via its cell wall anchor. Mol Microbiol **39:**1212-1224.

213. **Moncrief, J. S., L. A. Barroso, and T. D. Wilkins.** 1997. Positive regulation of *Clostridium difficile* toxins. Infect Immun **65:**1105-1108.

214. **Murray, R., D. Boyd, P. N. Levett, M. R. Mulvey, and M. J. Alfa.** 2009. Truncation in the tcdC region of the *Clostridium difficile* PathLoc of clinical isolates does not predict increased biological activity of Toxin B or Toxin A. BMC Infect Dis **9:**103.

215. **Musher, D. M., N. Logan, A. M. Bressler, D. P. Johnson, and J. F. Rossignol.** 2009. Nitazoxanide versus vancomycin in *Clostridium difficile* infection: a randomized, double-blind study. Clin Infect Dis **48:**e41-46.

216. **Muto, C. A.** 2007. Asymptomatic *Clostridium difficile* colonization: is this the tip of another iceberg? Clin Infect Dis **45:**999-1000.

217. **Muto, C. A., M. Pokrywka, K. Shutt, A. B. Mendelsohn, K. Nouri, K. Posey, T. Roberts, K. Croyle, S. Krystofiak, S. Patel-Brown, A. W. Pasculle, D. L. Paterson, M. Saul, and L.**

H. Harrison. 2005. A large outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use. Infect Control Hosp Epidemiol **26:**273-280.

218. **Na, X., H. Kim, M. P. Moyer, C. Pothoulakis, and J. T. LaMont.** 2008. gp96 is a human colonocyte plasma membrane binding protein for *Clostridium difficile* toxin A. Infect Immun **76:**2862-2871.

219. **Nakamura, S., M. Mikawa, N. Tanabe, K. Yamakawa, and S. Nishida.** 1982. Effect of clindamycin on cytotoxin production by *Clostridium difficile*. Microbiol Immunol **26:**985-992.

220. **Nam, H. J., J. K. Kang, S. K. Kim, K. J. Ahn, H. Seok, S. J. Park, J. S. Chang, C. Pothoulakis, J. T. Lamont, and H. Kim.** 2010. *Clostridium difficile* toxin A decreases acetylation of tubulin, leading to microtubule depolymerization through activation of histone deacetylase 6, and this mediates acute inflammation. J Biol Chem **285:**32888-32896.

221. **Ni Eidhin, D. B., J. B. O'Brien, M. S. McCabe, V. Athie-Morales, and D. P. Kelleher.** 2008. Active immunization of hamsters against *Clostridium difficile* infection using surface-layer protein. FEMS Immunol Med Microbiol **52:**207-218.

222. **Nickerson, N. N., L. Prasad, L. Jacob, L. T. Delbaere, and M. J. McGavin.** 2007. Activation of the SspA serine protease zymogen of *Staphylococcus aureus* proceeds through unique variations of a trypsinogen-like mechanism and is dependent on both autocatalytic and metalloprotease-specific processing. J Biol Chem **282:**34129-34138.

223. **Novell, M. J., and C. A. Morreale.** 2010. The relationship between inpatient fluoroquinolone use and *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Ann Pharmacother **44:**826-831.

224. **Nusrat, A., C. von Eichel-Streiber, J. R. Turner, P. Verkade, J. L. Madara, and C. A. Parkos.** 2001. *Clostridium difficile* toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins. Infect Immun **69:**1329-1336.

225. **O'Brien, J. A., B. J. Lahue, J. J. Caro, and D. M. Davidson.** 2007. The emerging infectious challenge of *Clostridium difficile*-associated disease in Massachusetts hospitals: clinical and economic consequences. Infect Control Hosp Epidemiol **28:**1219-1227.

226. **O'Brien, J. B., M. S. McCabe, V. Athie-Morales, G. S. McDonald, D. B. Ni Eidhin, and D. P. Kelleher.** 2005. Passive immunisation of hamsters against *Clostridium difficile* infection using antibodies to surface layer proteins. FEMS Microbiol Lett **246:**199-205.

227. **O'Connor, J. R., S. Johnson, and D. N. Gerding.** 2009. *Clostridium difficile* infection caused by the epidemic BI/NAP1/027 strain. Gastroenterology **136:**1913-1924.

228. **O'Donoghue, C., and L. Kyne.** 2011. Update on *Clostridium difficile* infection. Curr Opin Gastroenterol.

229. **Okamoto, K., K. Nakayama, T. Kadowaki, N. Abe, D. B. Ratnayake, and K. Yamamoto.** 1998. Involvement of a lysine-specific cysteine proteinase in hemoglobin adsorption and heme accumulation by *Porphyromonas gingivalis*. J Biol Chem **273:**21225-21231.

230. **Pant, C., P. Madonia, A. Minocha, K. Manas, P. Jordan, and P. Bass.** Laboratory markers as predictors of mortality in patients with *Clostridium difficile* infection. J Investig Med **58:**43-45.

231. **Pantosti, A., M. Cerquetti, F. Viti, G. Ortisi, and P. Mastrantonio.** 1989. Immunoblot analysis of serum immunoglobulin G response to surface proteins of *Clostridium difficile* in patients with antibiotic-associated diarrhea. J Clin Microbiol **27:**2594-2597.

232. **Papatheodorou, P., J. E. Carette, G. W. Bell, C. Schwan, G. Guttenberg, T. R. Brummelkamp, and K. Aktories.** 2011. Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) is the host receptor for the binary toxin *Clostridium difficile* transferase (CDT). Proc Natl Acad Sci U S A **108:**16422-16427.

233. **Papatheodorou, P., C. Zamboglou, S. Genisyuerek, G. Guttenberg, and K. Aktories.** 2010. Clostridial glucosylating toxins enter cells via clathrin-mediated endocytosis. PLoS One **5:**e10673.

234. **Pechine, S., C. Deneve, A. Le Monnier, S. Hoys, C. Janoir, and A. Collignon.** 2011. Immunization of hamsters against *Clostridium difficile* infection using the Cwp84 protease as an antigen. FEMS Immunol Med Microbiol.

235. **Péchiné, S., A. Gleizes, C. Janoir, R. Gorges-Kergot, M. C. Barc, M. Delmée, and A. Collignon.** 2005. Immunological properties of surface proteins of *Clostridium difficile*. J Med Microbiol **54:**193-196.

236. **Péchiné, S., C. Janoir, H. Boureau, A. Gleizes, N. Tsapis, S. Hoys, E. Fattal, and A. Collignon.** 2007. Diminished intestinal colonization by *Clostridium difficile* and immune response in mice after mucosal immunization with surface proteins of *Clostridium difficile*. Vaccine **25:**3946-3954.

237. **Péchiné, S., C. Janoir, and A. Collignon.** 2005. Variability of *Clostridium difficile* surface proteins and specific serum antibody response in patients with *Clostridium difficile*-associated disease. J Clin Microbiol **43:**5018-5025.

238. **Pépin, J., N. Saheb, M. A. Coulombe, M. E. Alary, M. P. Corriveau, S. Authier, M. Leblanc, G. Rivard, M. Bettez, V. Primeau, M. Nguyen, C. E. Jacob, and L. Lanthier.** 2005. Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. Clin Infect Dis **41:**1254-1260.

239. **Pépin, J., L. Valiquette, M. E. Alary, P. Villemure, A. Pelletier, K. Forget, K. Pépin, and D. Chouinard.** 2004. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. Cmaj **171:**466-472.

240. **Pepin, J., L. Valiquette, and B. Cossette.** 2005. Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. CMAJ **173:**1037-1042.

241. **Perelle, S., M. Gibert, P. Bourlioux, G. Corthier, and M. R. Popoff.** 1997. Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. Infect Immun **65:**1402-1407.

242. **Pfeifer, G., J. Schirmer, J. Leemhuis, C. Busch, D. K. Meyer, K. Aktories, and H. Barth.** 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.

243. **Poilane, I., T. Karjalainen, M. C. Barc, P. Bourlioux, and A. Collignon.** 1998. Protease activity of *Clostridium difficile* strains. Can J Microbiol **44:**157-161.

244. **Popoff, M. R., E. J. Rubin, D. M. Gill, and P. Boquet.** 1988. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. Infect Immun **56:**2299-2306.

245. **Potempa, J., and R. N. Pike.** 2009. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. J Innate Immun **1:**70-87.

246. **Pothoulakis, C., R. J. Gilbert, C. Cladaras, I. Castagliuolo, G. Semenza, Y. Hitti, J. S. Montcrief, J. Linevsky, C. P. Kelly, S. Nikulasson, H. P. Desai, T. D. Wilkins, and J. T. LaMont.** 1996. Rabbit sucrase-isomaltase contains a functional intestinal receptor for *Clostridium difficile* toxin A. J Clin Invest **98:**641-649.

247. **Pothoulakis, C., and J. T. Lamont.** 2001. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions II. The integrated response of the intestine to *Clostridium difficile* toxins. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **280:**G178-183.

248. **Poutanen, S. M., and A. E. Simor.** 2004. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. CMAJ **171:**51-58.

249. **Rao, M. B., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge, and V. V. Deshpande.** 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol Mol Biol Rev **62:**597-635.

250. **Rasmussen, M., and L. Bjorck.** 2002. Proteolysis and its regulation at the surface of *Streptococcus pyogenes*. Mol Microbiol **43:**537-544.

251. **Rawlings, N. D., and A. J. Barrett.** 1993. Evolutionary families of peptidases. Biochem J **290 (Pt 1):**205-218.

252. **Rawlings, N. D., and A. J. Barrett.** 1994. Families of serine peptidases. Methods Enzymol **244:**19-61.

253. **Rawlings, N. D., A. J. Barrett, and A. Bateman.** 2010. MEROPS: the peptidase database. Nucleic Acids Res **38:**D227-233.

254. **Reading, N. C., and V. Sperandio.** 2006. Quorum sensing: the many languages of bacteria. FEMS Microbiol Lett **254:**1-11.

255. **Regassa, L. B., R. P. Novick, and M. J. Betley.** 1992. Glucose and nonmaintained pH decrease expression of the accessory gene regulator (*agr)* in *Staphylococcus aureus*. Infect Immun **60:**3381-3388.

256. **Reineke, J., S. Tenzer, M. Rupnik, A. Koschinski, O. Hasselmayer, A. Schrattenholz, H. Schild, and C. von Eichel-Streiber.** 2007. Autocatalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxin B. Nature **446:**415-419.

257. **Reinholdt, J., and M. Kilian.** 1997. Comparative analysis of immunoglobulin A1 protease activity among bacteria representing different genera, species, and strains. Infect Immun **65:**4452-4459.

258. **Reynolds, C. B., J. E. Emerson, L. de la Riva, R. P. Fagan, and N. F. Fairweather.** 2011. The *Clostridium difficile* cell wall protein CwpV is antigenically variable between strains, but exhibits conserved aggregation-promoting function. PLoS Pathog **7:**e1002024.

259. **Riggs, M. M., A. K. Sethi, T. F. Zabarsky, E. C. Eckstein, R. L. Jump, and C. J. Donskey.** 2007. Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic

and nonepidemic *Clostridium difficile* strains among long-term care facility residents. Clin Infect Dis **45:**992-998.

260. **Rodriguez-Palacios, A., H. R. Staempfli, T. Duffield, and J. S. Weese.** 2007. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. Emerg Infect Dis **13:**485-487.

261. **Rossetto, O., F. Deloye, B. Poulain, R. Pellizzari, G. Schiavo, and C. Montecucco.** 1995. The metallo-proteinase activity of tetanus and botulism neurotoxins. J Physiol Paris **89:**43-50.

262. **Rousseau, C., L. Lemee, A. Le Monnier, I. Poilane, J. L. Pons, and A. Collignon.** 2011. Prevalence and diversity of *Clostridium difficile* strains in infants. J Med Microbiol **60:**1112-1118.

263. **Rudenskaya, G. N., and D. V. Pupov.** 2008. Cysteine proteinases of microorganisms and viruses. Biochemistry (Mosc) **73:**1-13.

264. **Rupnik, M., M. H. Wilcox, and D. N. Gerding.** 2009. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. Nat Rev Microbiol **7:**526-536.

265. **Sanchez, T. H., J. T. Brooks, P. S. Sullivan, M. Juhasz, E. Mintz, M. S. Dworkin, and J. L. Jones.** 2005. Bacterial diarrhea in persons with HIV infection, United States, 1992-2002. Clin Infect Dis **41:**1621-1627.

266. **Sandolo, C., S. Pechine, A. L. Monnier, S. Hoys, C. Janoir, T. Coviello, F. Alhaique, A. Collignon, E. Fattal, and N. Tsapis.** 2011. Encapsulation of Cwp84 into pectin beads for oral vaccination against *Clostridium difficile*. Eur J Pharm Biopharm.

267. **Sara, M., and U. B. Sleytr.** 2000. S-Layer proteins. J Bacteriol **182:**859-868.

268. **Sasaki, Y., R. Hada, H. Nakajima, S. Fukuda, and A. Munakata.** 1997. Improved localizing method of radiopill in measurement of entire gastrointestinal pH profiles: colonic luminal pH in normal subjects and patients with Crohn's disease. The American journal of gastroenterology **92:**114-118.

269. **Saujet, L., M. Monot, B. Dupuy, O. Soutourina, and I. Martin-Verstraete.** 2011. The key sigma factor of transition phase, SigH, controls sporulation, metabolism, and virulence factor expression in *Clostridium difficile*. J Bacteriol **193:**3186-3196.

270. **Savariau-Lacomme, M. P., C. Lebarbier, T. Karjalainen, A. Collignon, and C. Janoir.** 2003. Transcription and analysis of polymorphism in a cluster of genes encoding surface-associated proteins of *Clostridium difficile*. J Bacteriol **185:**4461-4470.

271. **Savidge, T. C., W. H. Pan, P. Newman, M. O'Brien, P. M. Anton, and C. Pothoulakis.** 2003. *Clostridium difficile* toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. Gastroenterology **125:**413-420.

272. **Schaible, U. E., and S. H. Kaufmann.** 2004. Iron and microbial infection. Nat Rev Microbiol **2:**946-953.

273. **Sebaihia, M., B. W. Wren, P. Mullany, N. F. Fairweather, N. Minton, R. Stabler, N. R. Thomson, A. P. Roberts, A. M. Cerdeno-Tarraga, H. Wang, M. T. Holden, A. Wright, C. Churcher, M. A. Quail, S. Baker, N. Bason, K. Brooks, T. Chillingworth, A. Cronin, P. Davis, L. Dowd, A. Fraser, T. Feltwell, Z. Hance, S. Holroyd, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, C. Price, E. Rabbinowitsch, S. Sharp, M. Simmonds, K. Stevens, L. Unwin, S.

Whithead, B. Dupuy, G. Dougan, B. Barrell, and J. Parkhill. 2006. The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. Nat Genet **38:**779-786.

274. **Seddon, S. V., and S. P. Borriello.** 1992. Proteolytic activity of *Clostridium difficile*. J Med Microbiol **36:**307-311.

275. **Seddon, S. V., I. Hemingway, and S. P. Borriello.** 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.

276. **Seidl, K., M. Stucki, M. Ruegg, C. Goerke, C. Wolz, L. Harris, B. Berger-Bachi, and M. Bischoff.** 2006. *Staphylococcus aureus* CcpA affects virulence determinant production and antibiotic resistance. Antimicrob Agents Chemother **50:**1183-1194.

277. **Sharp, S. E., L. O. Ruden, J. C. Pohl, P. A. Hatcher, L. M. Jayne, and W. M. Ivie.** 2010. Evaluation of the C.Diff Quik Chek Complete Assay, a new glutamate dehydrogenase and A/B toxin combination lateral flow assay for use in rapid, simple diagnosis of *Clostridium difficile* disease. J Clin Microbiol **48:**2082-2086.

278. **Shaw, L., E. Golonka, J. Potempa, and S. J. Foster.** 2004. The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. Microbiology **150:**217-228.

279. **Shelburne, S. A., 3rd, D. Keith, N. Horstmann, P. Sumby, M. T. Davenport, E. A. Graviss, R. G. Brennan, and J. M. Musser.** 2008. A direct link between carbohydrate utilization and virulence in the major human pathogen group A Streptococcus. Proc Natl Acad Sci U S A **105:**1698-1703.

280. **Silverman, M. S., I. Davis, and D. R. Pillai.** 2010. Success of self-administered home fecal transplantation for chronic *Clostridium difficile* infection. Clin Gastroenterol Hepatol **8:**471-473.

281. **Sims, A. H., N. S. Dunn-Coleman, G. D. Robson, and S. G. Oliver.** 2004. Glutamic protease distribution is limited to filamentous fungi. FEMS Microbiol Lett **239:**95-101.

282. **Sleytr, U. B., P. Messner, D. Pum, and M. Sara.** 1993. Crystalline bacterial cell surface layers. Mol Microbiol **10:**911-916.

283. **Smagur, J., K. Guzik, L. Magiera, M. Bzowska, M. Gruca, I. B. Thogersen, J. J. Enghild, and J. Potempa.** 2009. A new pathway of staphylococcal pathogenesis: apoptosis-like death induced by Staphopain B in human neutrophils and monocytes. J Innate Immun **1:**98-108.

284. **Snydman, D. R.** 2008. The safety of probiotics. Clin Infect Dis **46 Suppl 2:**S104-111; discussion S144-151.

285. **Song, X., J. G. Bartlett, K. Speck, A. Naegeli, K. Carroll, and T. M. Perl.** 2008. Rising economic impact of C*lostridium difficile*-associated disease in adult hospitalized patient population. Infect Control Hosp Epidemiol **29:**823-828.

286. **Spigaglia, P., F. Barbanti, P. Mastrantonio, J. S. Brazier, F. Barbut, M. Delmée, E. Kuijper, and I. R. Poxton.** 2008. Fluoroquinolone resistance in *Clostridium difficile* isolates from a prospective study of *C. difficile infections* in Europe. J Med Microbiol **57:**784-789.

287. **Spigaglia, P., and P. Mastrantonio.** 2002. Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. J Clin Microbiol **40:**3470-3475.

288. **Stamper, P. D., R. Alcabasa, D. Aird, W. Babiker, J. Wehrlin, I. Ikpeama, and K. C. Carroll.** 2009. Comparison of a commercial real-time PCR assay for tcdB detection to a cell culture cytotoxicity assay and toxigenic culture for direct detection of toxin-producing *Clostridium difficile* in clinical samples. J Clin Microbiol **47:**373-378.

289. **Stevens, V., and J. E. Brown.** 2010. Comment: The relationship between inpatient fluoroquinolone use and *Clostridium difficile*-associated disease. Ann Pharmacother **44:**1855-1856.

290. **Stulke, J., and W. Hillen.** 2000. Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. Annu Rev Microbiol **54:**849-880.

291. **Sumby, P., S. Zhang, A. R. Whitney, F. Falugi, G. Grandi, E. A. Graviss, F. R. Deleo, and J. M. Musser.** 2008. A chemokine-degrading extracellular protease made by group A Streptococcus alters pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. Infect Immun **76:**978-985.

292. **Surawicz, C. M.** 2003. Probiotics, antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* diarrhoea in humans. Best Pract Res Clin Gastroenterol **17:**775-783.

293. **Tan, K. S., B. Y. Wee, and K. P. Song.** 2001. Evidence for holin function of *tcdE* gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. J Med Microbiol **50:**613-619.

294. **Tasteyre, A., M. C. Barc, A. Collignon, H. Boureau, and T. Karjalainen.** 2001. Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. Infect Immun **69:**7937-7940.

295. **Tasteyre, A., M. C. Barc, T. Karjalainen, P. Dodson, S. Hyde, P. Bourlioux, and P. Borriello.** 2000. A *Clostridium difficile* gene encoding flagellin. Microbiology **146 (Pt 4):**957-966.

296. **Tasteyre, A., T. Karjalainen, V. Avesani, M. Delmee, A. Collignon, P. Bourlioux, and M. C. Barc.** 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.

297. **Tasteyre, A., T. Karjalainen, V. Avesani, M. Delmée, A. Collignon, P. Bourlioux, and M. C. Barc.** 2000. Phenotypic and genotypic diversity of the flagellin gene (*fliC*) among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups. J Clin Microbiol **38:**3179-3186.

298. **Teixido, L., B. Carrasco, J. C. Alonso, J. Barbe, and S. Campoy.** 2011. Fur activates the expression of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by directly interacting with the hilD operator in vivo and in vitro. PLoS One **6:**e19711.

299. **Thiolet, J. M., I. Poujol, C. Bernet, A. Carbonne, A. Dumartin, I. Raclot, H. Sénéchal, L. Bouraoui, and B. Coignard.** 2008. Signalements externes des infections nosocomiales, France, 2006. Bull Epidemiol Hebd **30-31:**265-268.

300. **Titgemeyer, F., and W. Hillen.** 2002. Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution. Antonie Van Leeuwenhoek **82:**59-71.

301. **Toyokawa, M., A. Ueda, H. Tsukamoto, I. Nishi, M. Horikawa, A. Sunada, and S. Asari.** 2003. Pseudomembranous colitis caused by toxin A-negative/toxin B-positive variant strain of *Clostridium difficile*. J Infect Chemother **9:**351-354.

302. **Traber, K. E., E. Lee, S. Benson, R. Corrigan, M. Cantera, B. Shopsin, and R. P. Novick.** 2008. agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. Microbiology **154:**2265-2274.

303. **Ueda, T., C. Kaito, Y. Omae, and K. Sekimizu.** 2011. Sugar-responsive gene expression and the agr system are required for colony spreading in *Staphylococcus aureus*. Microb Pathog **51:**178-185.

304. **Underwood, S., S. Guan, V. Vijayasubhash, S. D. Baines, L. Graham, R. J. Lewis, M. H. Wilcox, and K. Stephenson.** 2009. Characterization of the sporulation initiation pathway of *Clostridium difficile* and its role in toxin production. J Bacteriol **191:**7296-7305.

305. **Urakami, K., S. Miyata, R. Moriyama, K. Sugimoto, and S. Makino.** 1999. Germination-specific cortex-lytic enzymes from *Clostridium perfringens* S40 spores: time of synthesis, precursor structure and regulation of enzymatic activity. FEMS Microbiol Lett **173:**467-473.

306. **van den Berg, R. J., E. C. Claas, D. H. Oyib, C. H. Klaassen, L. Dijkshoorn, J. S. Brazier, and E. J. Kuijper.** 2004. Characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates from outbreaks in different countries by amplified fragment length polymorphism and PCR ribotyping. J Clin Microbiol **42:**1035-1041.

307. **Vanegas, G., W. Quinones, C. Carrasco-Lopez, J. L. Concepcion, F. Albericio, and L. Avilan.** 2007. Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana.* Parasitol Res **101:**1511-1516.

308. **von Eichel-Streiber, C., P. Boquet, M. Sauerborn, and M. Thelestam.** 1996. Large clostridial cytotoxins--a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. Trends Microbiol **4:**375-382.

309. **von Eichel-Streiber, C., and M. Sauerborn.** 1990. *Clostridium difficile* toxin A carries a C-terminal repetitive structure homologous to the carbohydrate binding region of streptococcal glycosyltransferases. Gene **96:**107-113.

310. **von Eichel-Streiber, C., M. Sauerborn, and H. K. Kuramitsu.** 1992. Evidence for a modular structure of the homologous repetitive C-terminal carbohydrate-binding sites of *Clostridium difficile* toxins and *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. J Bacteriol **174:**6707-6710.

311. **Voth, D. E., and J. D. Ballard.** 2005. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. Clin Microbiol Rev **18:**247-263.

312. **Waligora, A. J., M. C. Barc, P. Bourlioux, A. Collignon, and T. Karjalainen.** 1999. *Clostridium difficile* cell attachment is modified by environmental factors. Appl Environ Microbiol **65:**4234-4238.

313. **Waligora, A. J., C. Hennequin, P. Mullany, P. Bourlioux, A. Collignon, and T. Karjalainen.** 2001. Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. Infect Immun **69:**2144-2153.

314. **Wandersman, C.** 1989. Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases. Mol Microbiol **3:**1825-1831.

315. **Warny, M., J. Pépin, A. Fang, G. Killgore, A. Thompson, J. Brazier, E. Frost, and L. C. McDonald.** 2005. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet **366:**1079-1084.

316. **Weese, J. S., B. P. Avery, J. Rousseau, and R. J. Reid-Smith.** 2009. Detection and enumeration of *Clostridium difficile* spores in retail beef and pork. Appl Environ Microbiol **75:**5009-5011.

317. **Weinrick, B., P. M. Dunman, F. McAleese, E. Murphy, S. J. Projan, Y. Fang, and R. P. Novick.** 2004. Effect of mild acid on gene expression in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol **186:**8407-8423.

318. **Wenisch, C., B. Parschalk, M. Hasenhundl, A. M. Hirschl, and W. Graninger.** 1996. Comparison of vancomycin, teicoplanin, metronidazole, and fusidic acid for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Clin Infect Dis **22:**813-818.

319. **West, A. H., and A. M. Stock.** 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. Trends Biochem Sci **26:**369-376.

320. **Wexler, H., M. E. Mulligan, and S. M. Finegold.** 1984. Polyacrylamide gel electrophoresis patterns produced by *Clostridium difficile*. Rev Infect Dis **6 Suppl 1:**S229-234.

321. **Wilkins, J. C., D. Beighton, and K. A. Homer.** 2003. Effect of acidic pH on expression of surface-associated proteins of *Streptococcus oralis*. Appl Environ Microbiol **69:**5290-5296.

322. **Wilkins, J. C., K. A. Homer, and D. Beighton.** 2002. Analysis of *Streptococcus mutans* proteins modulated by culture under acidic conditions. Appl Environ Microbiol **68:**2382-2390.

323. **Wistrom, J., S. R. Norrby, E. B. Myhre, S. Eriksson, G. Granstrom, L. Lagergren, G. Englund, C. E. Nord, and B. Svenungsson.** 2001. Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. J Antimicrob Chemother **47:**43-50.

324. **Wright, A., D. Drudy, L. Kyne, K. Brown, and N. F. Fairweather.** 2008. Immunoreactive cell wall proteins of *Clostridium difficile* identified by human sera. J Med Microbiol **57:**750-756.

325. **Wright, A., R. Wait, S. Begum, B. Crossett, J. Nagy, K. Brown, and N. Fairweather.** 2005. Proteomic analysis of cell surface proteins from *Clostridium difficile*. Proteomics **5:**2443-2452.

326. **Wysowski, D. K.** 2006. Increase in deaths related to enterocolitis due to *Clostridium difficile* in the United States, 1999-2002. Public Health Rep **121:**361-362.

327. **Yoon, S. S., and L. J. Brandt.** 2010. Treatment of refractory/recurrent *C. difficile*-associated disease by donated stool transplanted via colonoscopy: a case series of 12 patients. J Clin Gastroenterol **44:**562-566.

328. **Zar, F. A., S. R. Bakkanagari, K. M. Moorthi, and M. B. Davis.** 2007. A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity. Clin Infect Dis **45:**302-307.

329. **Zeiser, J. J., J. Klodmann, H. P. Braun, R. Gerhard, I. Just, and A. Pich.** 2011. Effects of *Clostridium difficile* Toxin A on the proteome of colonocytes studied by differential 2D electrophoresis. J Proteomics.

330. **Zhong, J., M. Karberg, and A. M. Lambowitz.** 2003. Targeted and random bacterial gene disruption using a group II intron (targetron) vector containing a retrotransposition-activated selectable marker. Nucleic Acids Res **31:**1656-1664.

Influence de l'environnement sur le protéome de surface de *Clostridium difficile* : analyse globale et caractérisation de la cystéine protéase Cwp84.

RÉSUMÉ

Clostridium difficile est une bactérie pathogène responsable de diarrhées nosocomiales et de la plupart des colites pseudomembraneuses. Le principal facteur de risque est la prise d'antibiotiques qui altère la composition du microbiote intestinal, et favorise ainsi l'implantation de la bactérie au niveau colique. Après une étape de colonisation, la bactérie produit ses principaux facteurs de virulence, les toxines A et B. La colonisation est un processus multifactoriel, qui met en jeu différentes protéines de surface dont des adhésines et une cystéine protéase Cwp84.

Dans une première partie, nous avons analysé le processus de maturation de la protéase Cwp84, ainsi que sa localisation dans la bactérie, afin de mieux comprendre son rôle dans la virulence de *C. difficile.* La protéase recombinante, purifiée sous forme de zymogène, présente un processus de maturation particulier comprenant des clivages successifs, qui aboutissent à la forme mature de 47 KDa. La protéase ainsi activée présente une activité protéolytique sur la fibronectine. Dans la bactérie, Cwp84 existe sous deux formes majoritaires, associées à la surface de la bactérie : une première forme, d'environ 80 KDa, associée aux protéines de la couche S, dont le rôle serait de cliver le précurseur des protéines de la couche S en deux protéines matures ; une deuxième forme, d'environ 50 KDa correspondant vraisemblablement à la forme mature de la protéase recombinante de 47 KDa, est retrouvée à la fois dans la fraction extracellulaire et associée à la surface de la bactérie. Nous avons montré que la protéase rélarguée est capable de se ré-associer sous sa forme mature de manière spécifique à la surface de *C. difficile*.

Dans une deuxième partie, nous avons analysé l'impact de conditions environnementales mimant celles rencontrées par la bactérie au cours de son transit dans le tractus digestif de l'hôte, sur la modulation de facteurs de colonisation, dont la protéase. Nous avons montré qu'un pH acide favorise à la fois l'expression et le processus de maturation de la protéase vers sa forme mature de 47 KDa. Des analyses protéomiques et transcriptomiques ont montré que d'autres protéines impliquées dans colonisation sont surexprimées dans un milieu avec glucose, cette régulation étant vraisemblablement liée à la diminution du pH résultant de la fermentation du glucose plutôt qu'à un effet direct de ce sucre. Cette régulation des facteurs de virulence par le pH acide est probablement un élément favorable au processus de colonisation de l'hôte. Ces différentes analyses ont également permis l'identification de facteurs de virulence potentiels, qui devront être caractérisés par la suite.

MOTS CLES

Clostridium difficile, cystéine protéase Cwp84, processus de maturation, pH, régulation, facteurs de virulence.

LABORATOIRE

Unité EA4043, « Ecosystème microbien digestif et santé »
Faculté de Pharmacie Tour E1 3ème étage
Université Paris Sud 11I
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 Châtenay-Mabry