

Figure 1. Algorithme de traitement de la colite à *Clostridium difficile* chez l'adulte proposé par l'INESS du Québec.

Le métronidazole (Flagyl^{MC}) représente le traitement de première intention pour la majorité des infections initiales légères à modérées. La vancomycine est indiquée durant la grossesse, durant l'allaitement et pour les cas graves. Lorsque la voie orale n'est pas possible à cause d'un iléus paralytique, d'une obstruction intestinale ou d'une diverticulite, le métronidazole par voie intraveineuse (IV) est recommandé. La vancomycine par voie IV est inefficace et ne devrait pas être utilisée pour cette indication. Chez les patients pour lesquels on n'a pas accès à la voie orale, on peut administrer la formulation de la vancomycine IV par voie nasogastrique ou rectale.

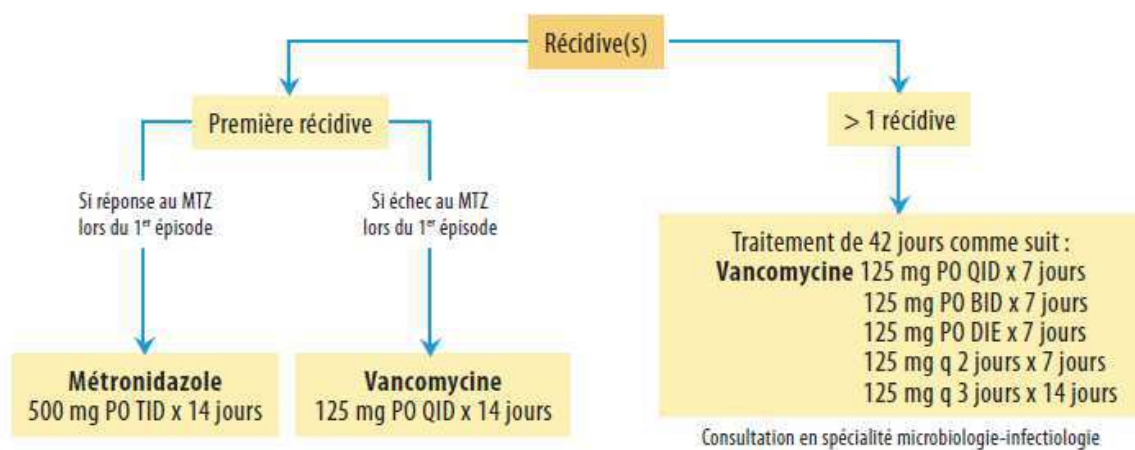


Figure 2. Traitement des infections à *C. difficile* en cas de rechutes, d'après l'INESS du Québec.

Figure 3. Modèle de pathogenèse des infections à *C. difficile*, d'après Deneve et coll. [6]

Figure 4. Schéma d'organisation des protéines de surface de *C. difficile*, d'après Fagan et coll. [116]

Les deux protéines Stps sont assemblées sur toute la surface bactérienne au dessus du peptidoglycane : la HMW-SLP (en gris clair) disposée du côté de la paroi et la LMH-SLP (en gris foncé) exposée vers le milieu extracellulaire. D'autres protéines de surface sont également associées aux protéines Stps. Elles présentent la même structure en deux domaines : la partie blanche accrochée à la paroi et l'autre partie en tiret et en pointillé est variable en fonction du type de protéine. Les barres noires indiquent la présence de polymères incorporés à la paroi bactérienne.

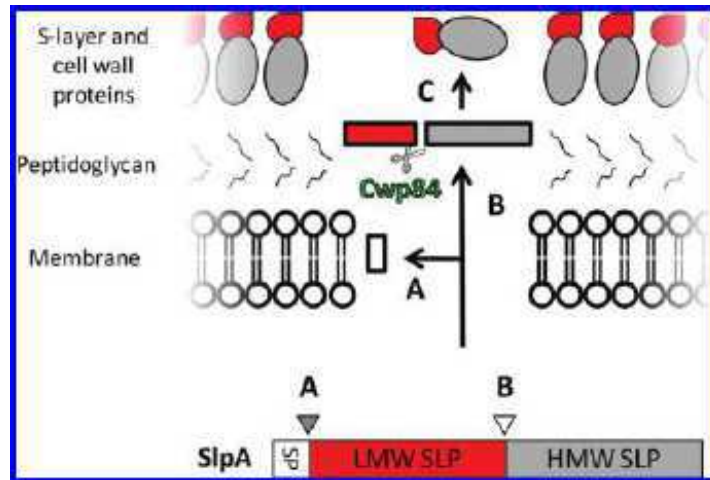


Figure 5. Etapes de maturation des protéines SlpA chez *C. difficile*, d'après Dang et coll. [119]

Le précurseur SlpA est tout d'abord clivé de son peptide signal (A). La protéine est ensuite clivée par la protéase Cwp84 pour générer les deux sous-unités HMW SLP (*High Molecular Weight SLP*) et LMW SLP (*Low Molecular Weight SLP*) (B) qui se réassocieront à la fin à la surface de la cellule bactérienne (C).

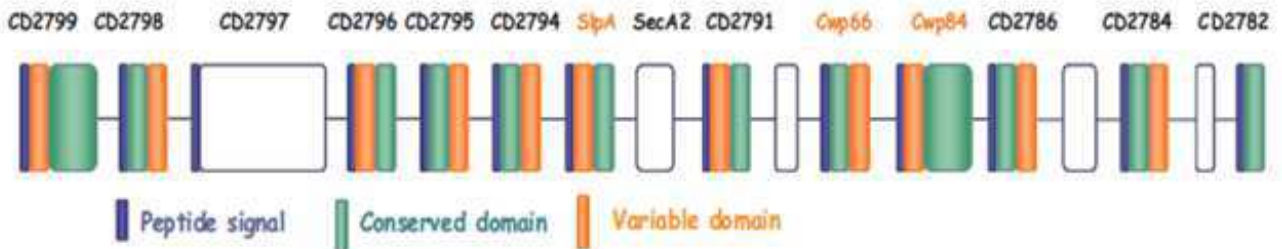


Figure 6. Organisation génétique du cluster de gènes codant des protéines de surface Cwp de *C. difficile*, d'après Deneve et coll. [6]

Le locus comprend les gènes de SlpA, Cwp66, Cwp84 et de 11 paralogues de SlpA. Il comprend en plus un gène codant le système de sécrétion SecA2. Les protéines Cwps sont toutes organisées en trois domaines avec un peptide signal (en bleu), un domaine d'ancrage conservé (en vert) et un domaine variable fonctionnel (en orange).

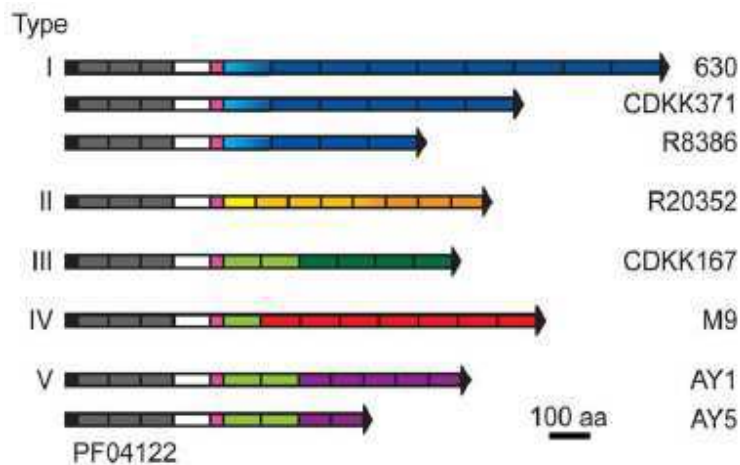


Figure 7. Représentation des différentes configurations de la protéine CwpV, d'après Reynolds et coll. [129]

Les protéines CwpV sont organisées en peptide signal (en noir), un domaine d'ancrage avec des motifs PF04122 (en gris), un domaine à fonction inconnue (en blanc), une région riche en Serine/Glycine (en rose) et d'un domaine C-terminal variable.

Les protéines CwpV sont classées en fonction du type des régions répétées du domaine C-terminal : type I coloré en bleu, type II en orange, type III en vert, type IV en rouge et type V en violet. Les différentes nuances d'une même couleur représentent des variations de séquence au niveau des domaines répétés d'un même type.

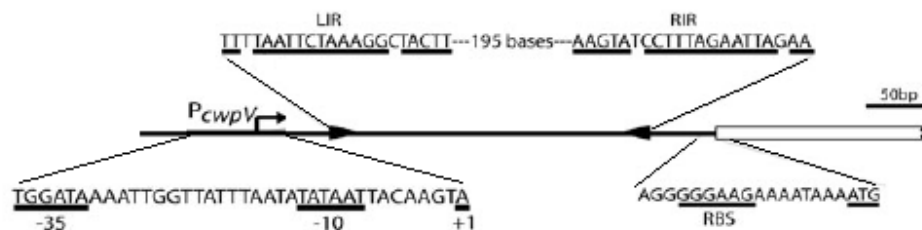


Figure 8. Représentation de la région en amont du gène *cwpV* dans la souche 630 de *C. difficile*, modifié de Emerson et coll. [128]

Représentation des deux séquences répétées inversées (RIR et LIR) localisées à 57 pb en amont du gène *cwpV*. Elles sont séparées par une séquence de 195 pb où se produit l'inversion de l'ADN en cas de variation de phase. Le promoteur (P_{cwpV}) est, lui, situé à 36-37 pb en amont de la séquence inversée. Des séquences RBS et ATG ont été identifiées juste avant le gène *cwpV*.

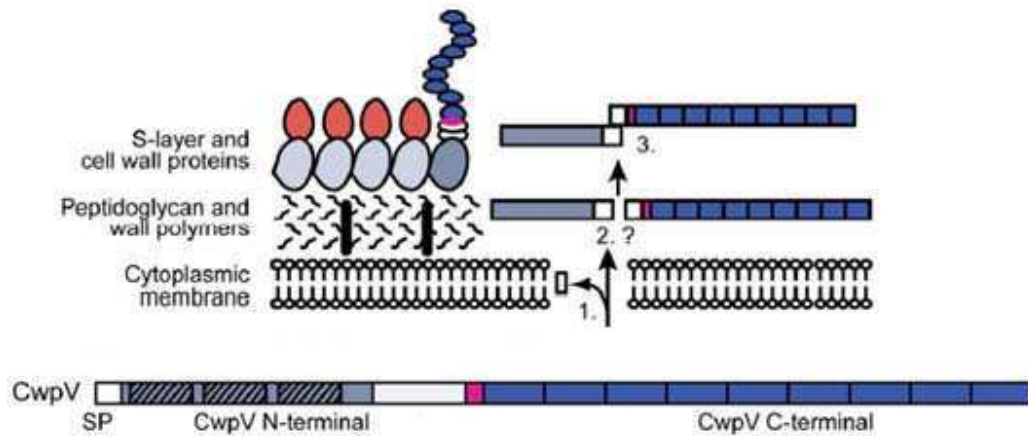


Figure 9. Processus de maturation de CwpV, illustrée d'après Reynolds et coll. [129]

Les différentes étapes décrivant le processus de maturation de CwpV sont:

1. Clivage du peptide signal (SP) et transport au travers de la membrane cellulaire.
2. Deuxième clivage auto-protéolytique générant deux sous-unités de 40 et 120 kDa.
3. Réassociation des deux sous-unités par formation d'un complexe associé à la surface bactérienne par liaison à la partie N-terminale de la protéine.

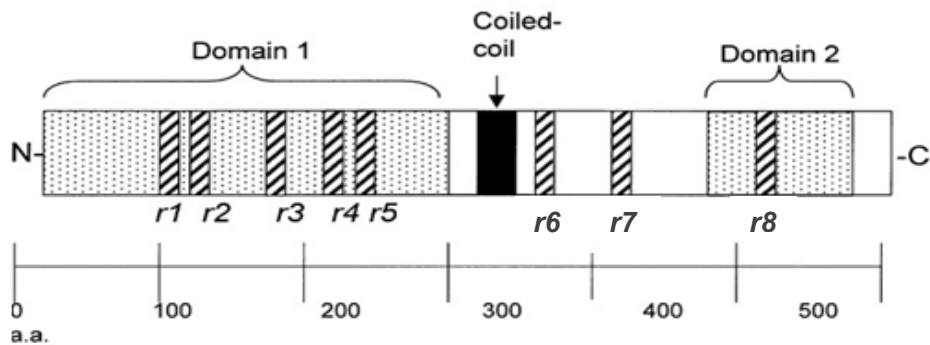


Figure 10. Organisation de la protéine de liaison à la fibronectine Fbp68 de *C. difficile*, d'après Hennequin et coll. [134]

La protéine de liaison à la fibronectine Fbp68 est constituée de deux domaines N- et C-terminaux compris respectivement entre les acides aminés 1–300 et 480–570 et d'une région intermédiaire en hélice α . La protéine comprend également huit régions répétées dégénérées (r1 - r8).

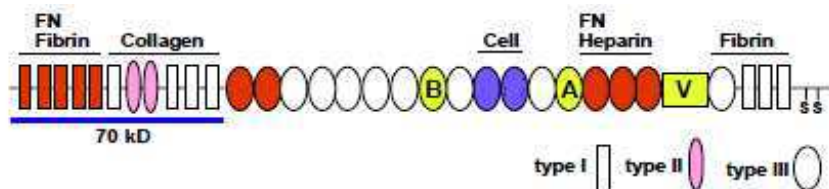


Figure 11. Structure modulaire de la fibronectine (FN), d'après Mao et coll. [136]

La fibronectine est constituée de 12 modules de type I (en rectangle), de 2 modules de type II (forme ovale rose) et de 15-17 modules de type III (forme ovale blanche). Les domaines de liaison à la fibrine, au collagène et à l'héparine sont indiqués. Les domaines de liaison aux cellules sont colorés en violet. Les sites d'interaction FN-FN sont colorés en rouge. Le fragment N-terminal de 70 kDa est indiqué par un trait bleu. Les domaines d'épissage de la fibronectine sont représentés en jaune. Le dimère de fibronectine se forme à l'extrémité C-terminale au niveau des ponts SS.



Figure 12. Processus de clivage de la protéase Cwp84, d'après ChapetonMontes et coll. [166]

La protéase Cwp84 est une protéine de 803 acides aminés composée d'un peptide signal (indiqué en gris), d'un domaine catalytique (représenté en blanc) et d'un domaine d'ancrage (parties raillées) avec ses 3 motifs Pfam04122. Le clivage de Cwp84 a lieu au niveau de la Lysine 518 et puis au niveau de la Sérine 92 générant une protéine mature de 47 kDa.

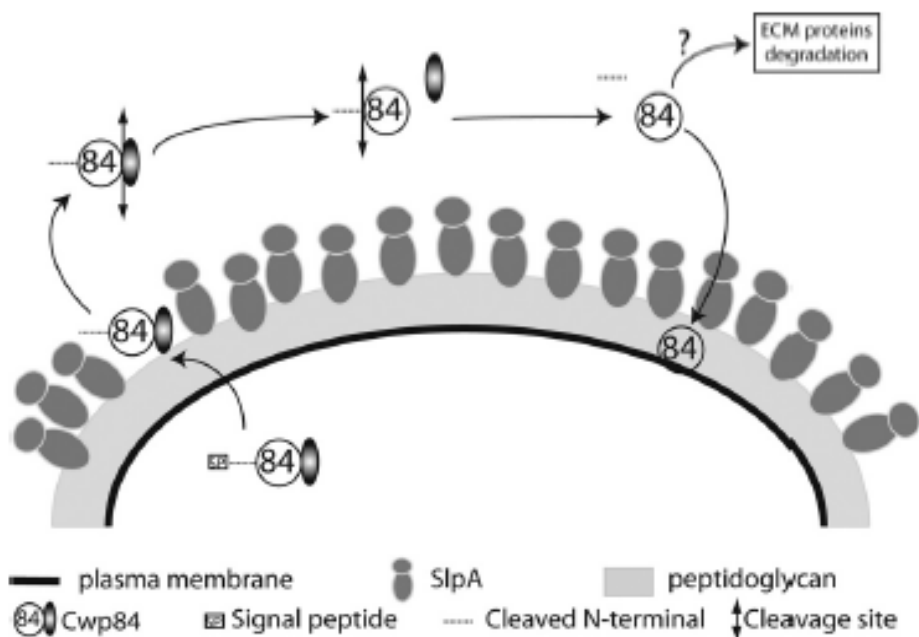


Figure 13. Processus de maturation de Cwp84 selon ChapetonMontes et coll. [166]

La protéase Cwp84 est synthétisée dans le cytoplasme sous forme inactive, puis elle est adressée à la membrane cytoplasmique où le peptide signal est libéré. Au niveau de la couche S, le pro-peptide situé au niveau de la partie N-terminale est clivé. La protéine générée (de 77 kDa) participerait à la maturation des protéines de la couche S. Quand cette protéine est relarguée dans le milieu extracellulaire, celle-ci est initialement clivée au niveau de sa partie C-terminale et puis au niveau de sa partie N-terminale. La protéine mature de 47 kDa peut par la suite se réassocier à la paroi cellulaire. Il se peut que cette forme active soit impliquée dans la dégradation des composés de la matrice extracellulaire tant qu'elle n'est pas associée à la paroi.

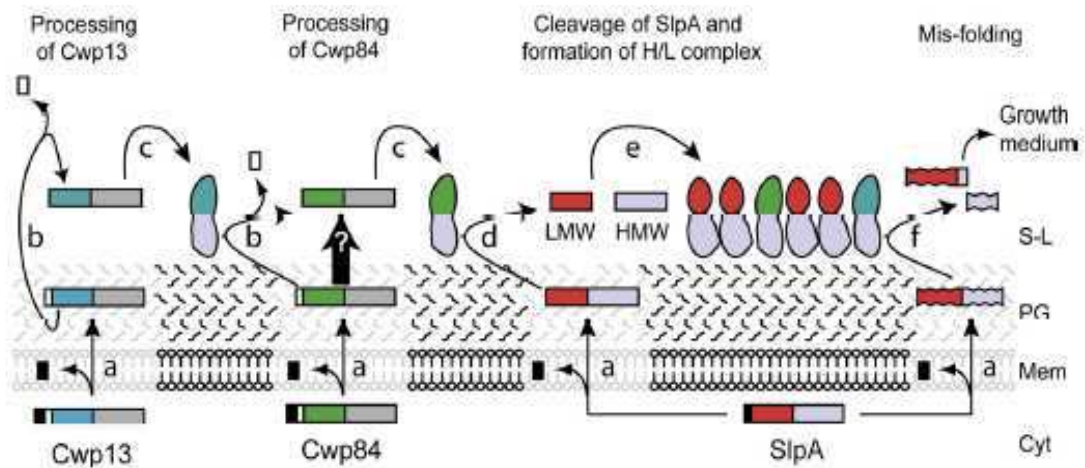


Figure 14. Processus de maturation et d'activité des protéases Cwp13 et Cwp84, d'après de la Riva et coll. [165]

Le processus de maturation débute par la libération du peptide signal au moment de sa sécrétion par le système Sec (étape a). Les propeptides sont par la suite éliminés par auto-catalyse (étape b). Cwp13 intervient néanmoins dans la libération du propeptide de Cwp84. La protéine Cwp13 active est enfin incorporée dans la couche S (étape c). La protéine Cwp84 est également incorporée dans la couche S, mais des doutes subsistent quant à sa forme mature active (subit-elle ou pas d'autres clivages la menant à maturité ?). La protéine Cwp84 mature intervient en tout cas dans le clivage du précurseur SlpA (étape d) dont les deux sous-unités générées se réassocient pour former un complexe H/L (étape e). Les protéines mal repliées sont, quant à elles, clivées par la protéase Cwp13 au niveau de leurs domaines de liaison à la couche S (étape f).

S-L, couche S ; PG, peptidoglycane ; Mem, membrane cytoplasmique ; Cyt, cytoplasme.

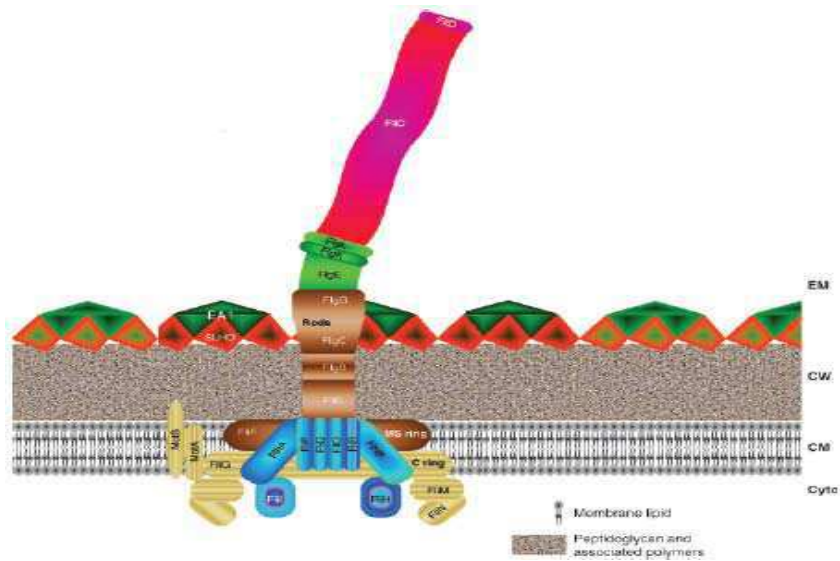


Figure 15. Structure du flagella basée sur le modèle de *B. subtilis*, d'après Desvaux et coll. [167]

Le flagelle est composé de l'appareil d'export flagellaire (bleu) qui permet la translocation et l'assemblage des autres composants flagellaires, du moteur flagellaire impliqué dans la mobilité du flagelle (jaune), du corps basal (marron) comprenant, contrairement à celui des bactéries Gram négatifs, deux anneaux : un externe lié au peptidoglycane (MS) et un interne lié à la paroi plasmique (C), un crochet (jaune) transmettant le mouvement du corps basal au filament et enfin un long filament (rose) de flagellines (FliC) assemblées à l'extrémité distale par une coiffe (FliD).

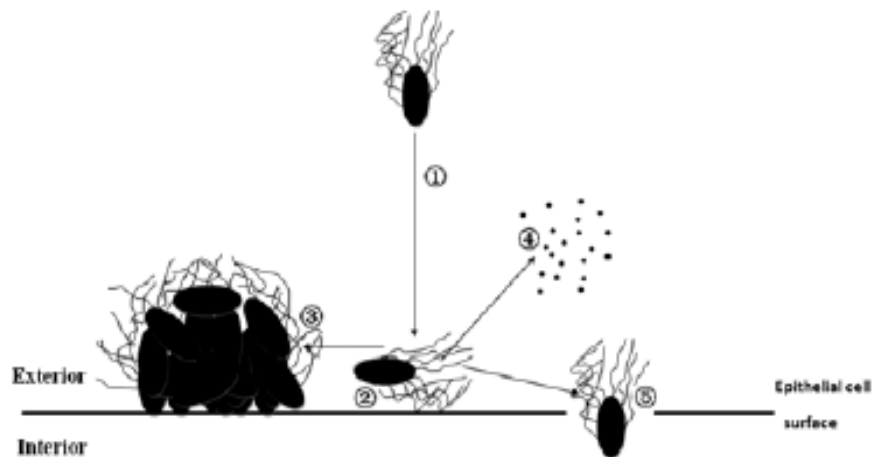


Figure 16. Rôle des flagelles dans la pathogenèse bactérienne, d'après Duan et coll. [168]

(1) Le mouvement des bactéries vers les cellules hôtes est facilité par les flagelles ; (2) La mobilité flagellaire permet l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales ; (3) la formation des biofilms est médiée par les flagelles ; (4) après la colonisation bactérienne, le système de sécrétion flagellaire exporte certains facteurs de virulence (points noirs) ; (5) les flagelles participent à l'invasion cellulaire.

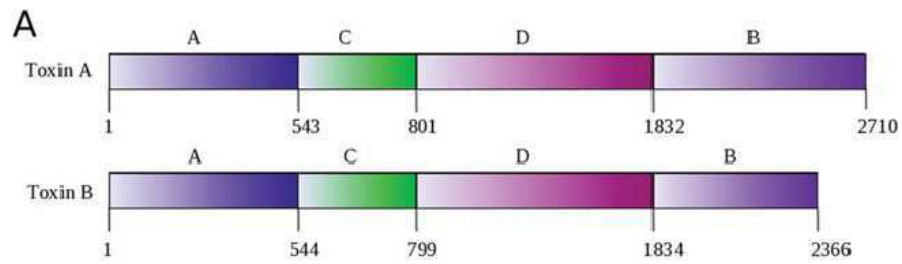


Figure 17. Structure des deux toxines TcdA et TcdB de *C. difficile*, d'après Davies et coll. [198]

Les toxines TcdA et TcdB sont composées de 4 domaines : le domaine enzymatique A (en bleu), le domaine autocatalytique C (en vert), le domaine de translocation D (en rose) et le domaine de liaison aux récepteurs cellulaires B (en violet).

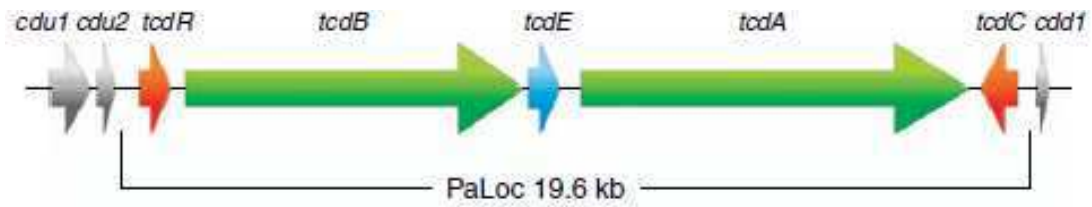


Figure 18. Organisation génétique du locus de pathogénicité PaLoc de *C. difficile*, d'après Carter et coll. [208]

Les cadres ouverts de lecture sont représentés en boîtes avec des flèches indiquant le sens de la transcription. Les gènes de toxines sont colorés en vert, les gènes régulateurs sont en rouge, le gène *tcdE* est en bleu et les gènes en dehors du locus PaLoc sont en gris.

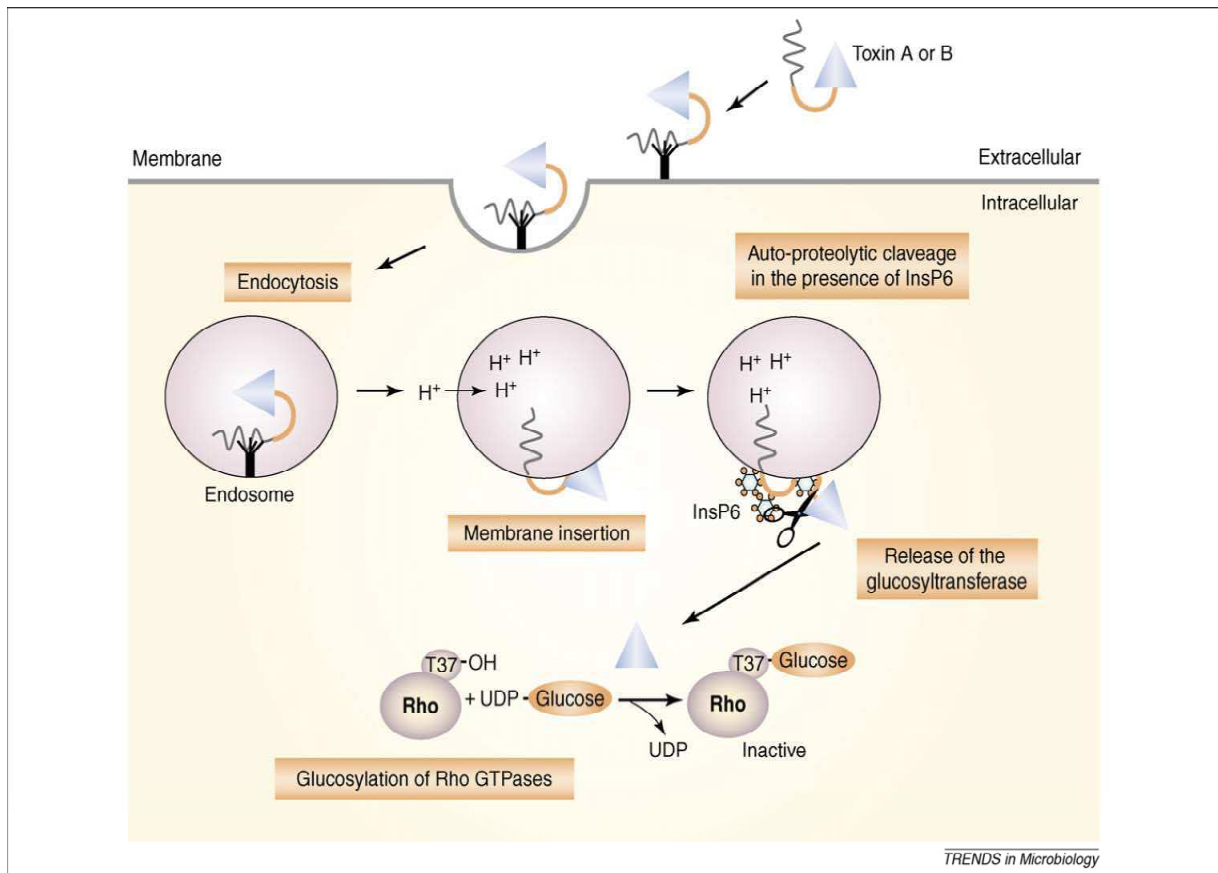


Figure 19. Mécanisme d'action des deux toxines TcdA et TcdB de *C. difficile*, d'après d'après Jank et coll. [197]

Le mécanisme d'action des toxines TcdA et TcdB peut se résumer en 4 étapes. Une première étape qui consiste à la liaison des toxines, via leur domaine (B), aux récepteurs cellulaires, suivie d'une internalisation des toxines par endocytose. Dans un second temps, il se produit une diminution de pH dans le compartiment endosomal qui va induire des changements conformationnels des toxines et la formation de pore, par le domaine (D), permettant ainsi la translocation ultérieure des toxines vers le cytosol. En 3^{ème} étape, les toxines subissent une auto-protéolyse, probablement grâce à l'activité cystéine protéase du domaine (C), permettant le relargage du domaine catalytique (A) dans le cytosol. Finalement, les toxines, au moyen de leur domaine (A), réussissent à inactiver par glucosylation la fonction des petites GTPases appartenant à la superfamille Rho. L'inactivation de ces protéines impliquées dans plusieurs voies de signalisation et dans la régulation du cytosquelette d'actine aboutit à la mort cellulaire.

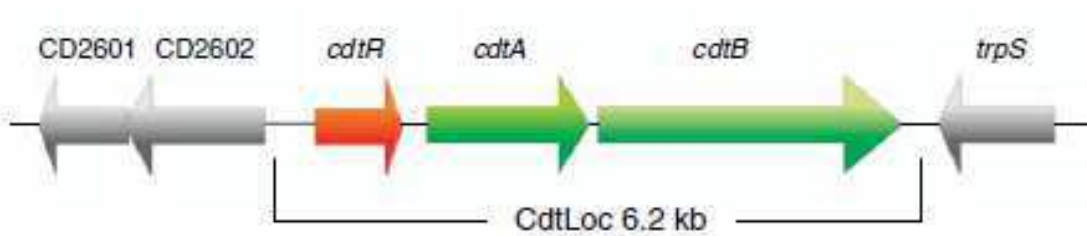


Figure 20. Organisation du locus CdtLoc (locus de la toxine binaire) de *C. difficile*, d'après Carter et coll. [208]

Les cadres ouverts de lecture sont représentés par des flèches indiquant le sens de la transcription. Les gènes de toxines et de régulation sont colorés respectivement en vert et en rouge. Les gènes en dehors du locus CdtLoc sont en gris. A noter que les annotations des gènes CD2601 et CD2602 sont relatifs au génome de la souche 630 et qu'ils peuvent être différents chez d'autres souches.

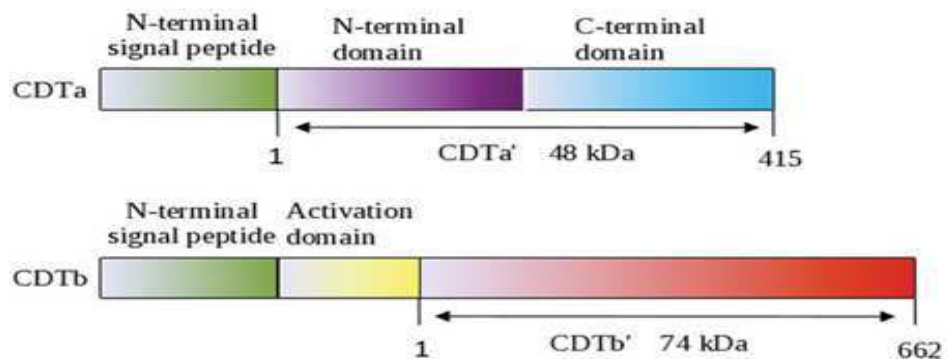


Figure 21. Structure des 2 éléments CDTa et CDTb de la toxine binaire de *C. difficile*, d'après Davies et coll. [198]

Le peptide signal N-terminal est coloré en vert pour les 2 éléments. La partie active CDTa' comprend la partie N-terminale (violette) et la partie C-terminale (bleue). CDTb comprend un domaine d'activation (jaune) qui sera clivé et donnera le domaine CDTb' activé (rouge).

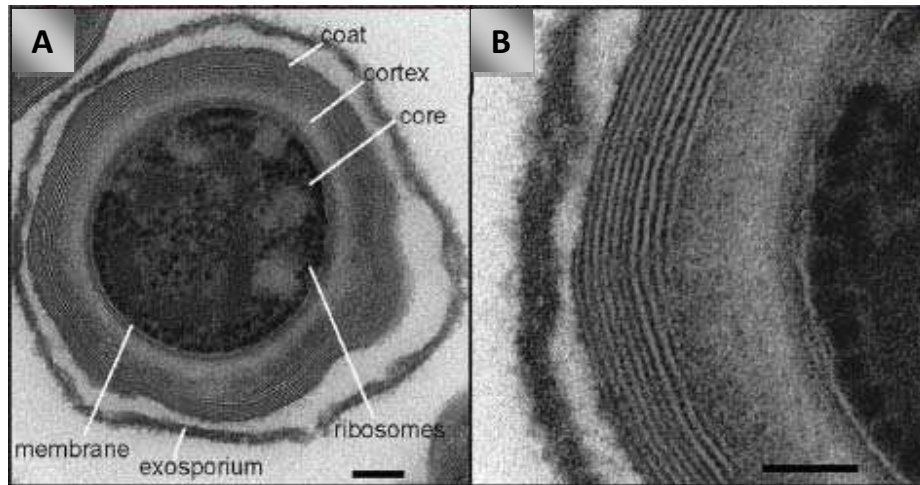


Figure 22. Ultra-structure d'une spore de *C. difficile* d'après Lawley et coll. [287]

(A) Visualisation de la spore en microscopie à transmission électronique avec son exosporium, sa paroi, son cortex, son noyau, sa membrane et ses ribosomes. Barre, 100 nm.

(B) Agrandissement d'une section de la surface extérieure de la spore. Barre, 50 nm.

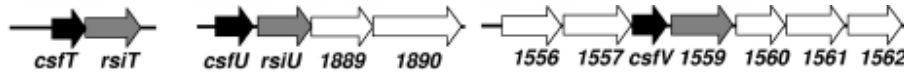


Figure 23. Organisation génétique des trois opérons des facteurs sigma ECF de *C. difficile*, d'après Ho et coll. [296]

Les facteurs sigma ECF sont organisés en trois opérons : le premier codant le facteur sigma *csfT* et son facteur anti-sigma *rsiT*, le deuxième codant le facteur sigma *csfU* et son facteur anti-sigma *rsiU* en plus de deux autres gènes (CD1889-CD1890) et le troisième opéron codant le facteur sigma *csfV* et son facteur anti-sigma *rsiV* en plus de trois autres gènes (CD1560-CD1562) dont le rôle n'est pas encore établi. Les facteurs sigma *csf* sont indiqués en noir et les facteurs anti-sigma *rsi* sont indiqués en gris.

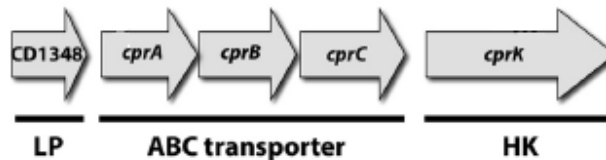


Figure 24. Organisation génétique du locus *cpr* de la souche JIR8094 de *C. difficile* d'après McBride et coll. [297]

Le locus *cpr* comprend le gène CD1348 codant une lipoprotéine (LP), les gènes *cprABC* codant la cassette d'ABC transporteurs et le gène régulateur *cprK* codant une histidine kinase HK.

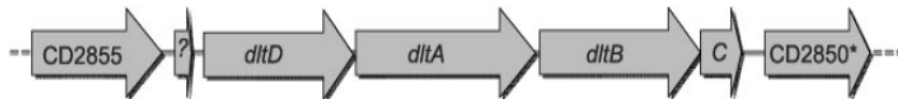


Figure 25. Organisation génétique du locus *dlt* de *C. difficile* d'après McBride et coll. [298]

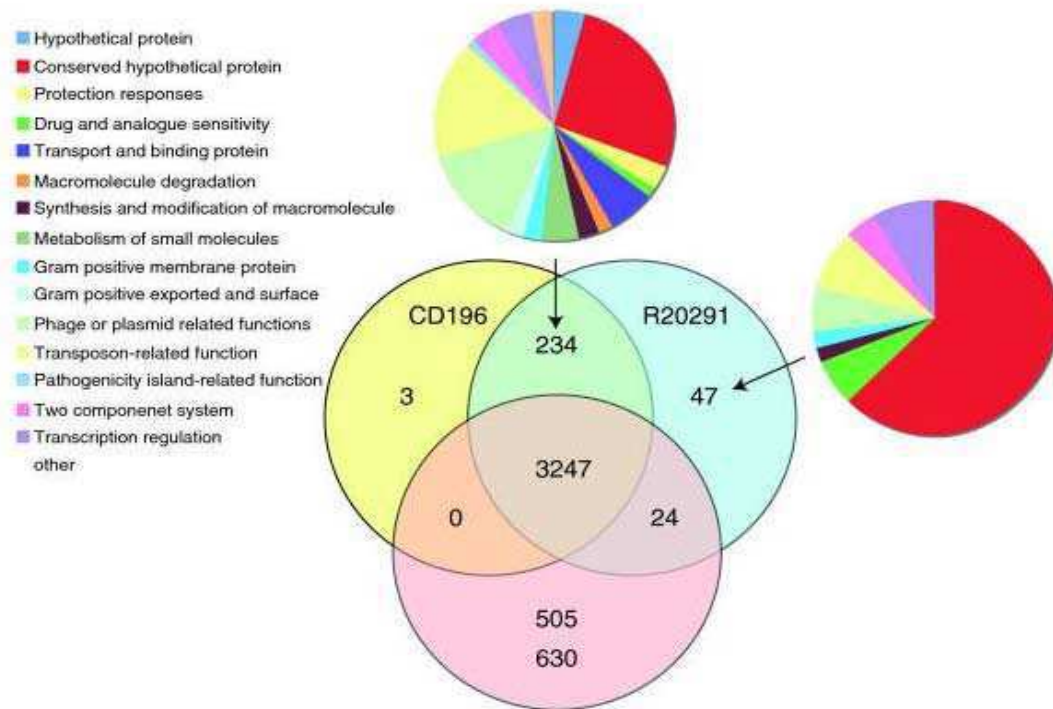


Figure 26. Distribution des gènes orthologues entre les souches 630, R20291 et CD196, d'après Stabler et coll. [254]

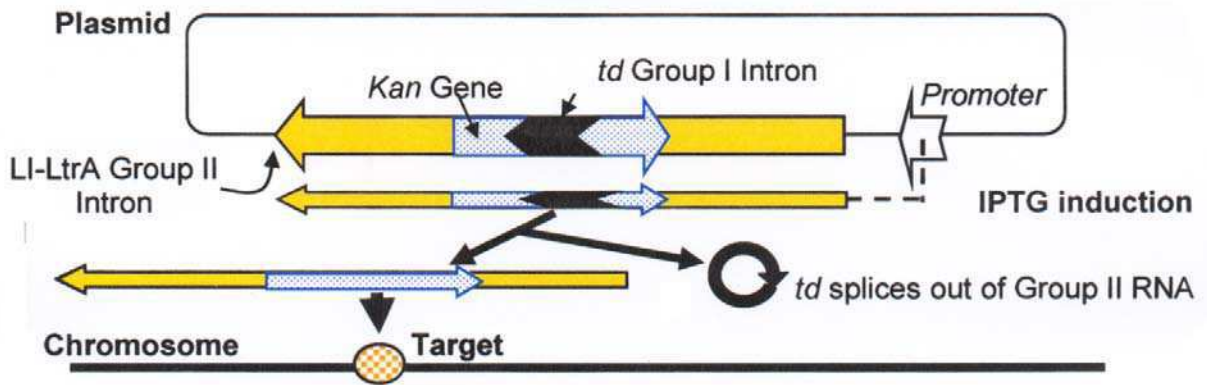


Figure 27. Principe de la technique du ClosTron.

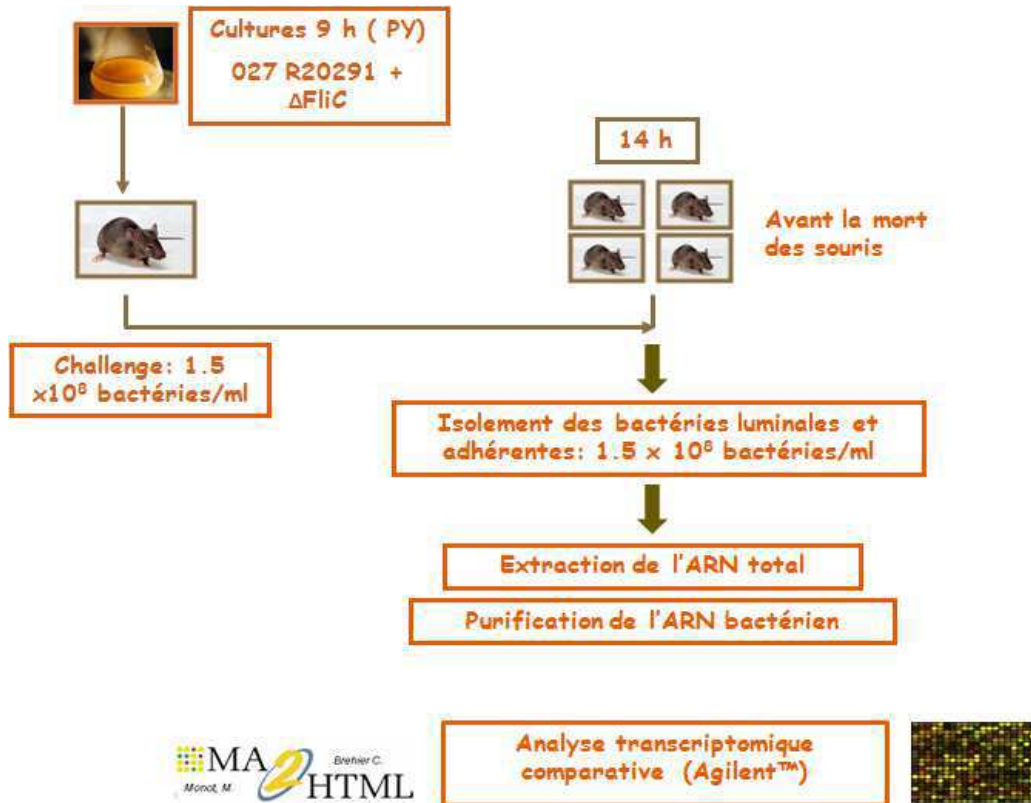


Figure 28. Protocole expérimental pour l'analyse transcriptomique comparative du mutant Δ FliC et de la souche sauvage 027 R20291 dans un modèle de souris monoxéniques.

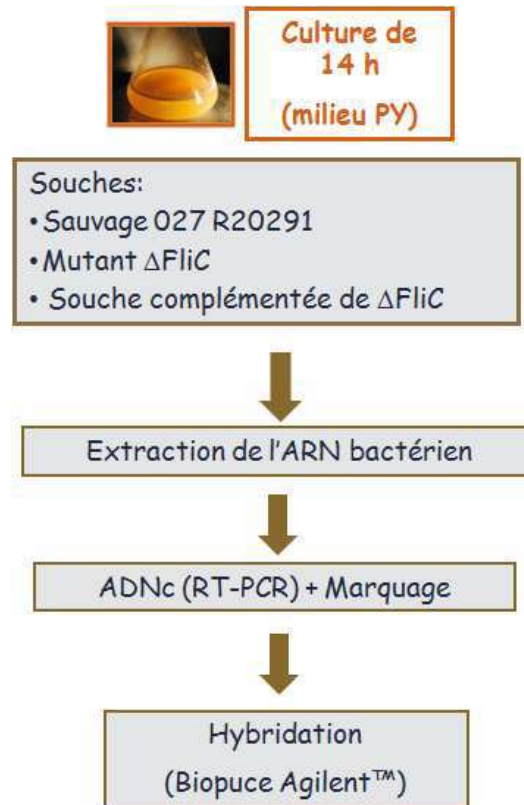


Figure 29. Protocole expérimental pour l'analyse transcriptomique comparative du mutant Δ FliC et de la souche sauvage 027 R20291 *in vitro*.

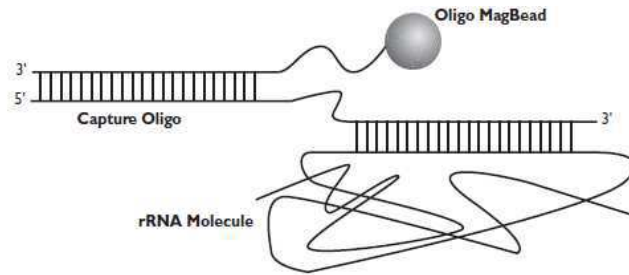


Figure 30. Principe de purification des ARN procaryotes par le kit MICROBEnrich™ (AMBION).

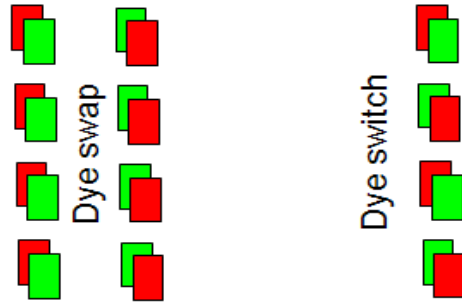


Figure 31. Principe de marquage des ARN pour l'hybridation des puces à ADN.

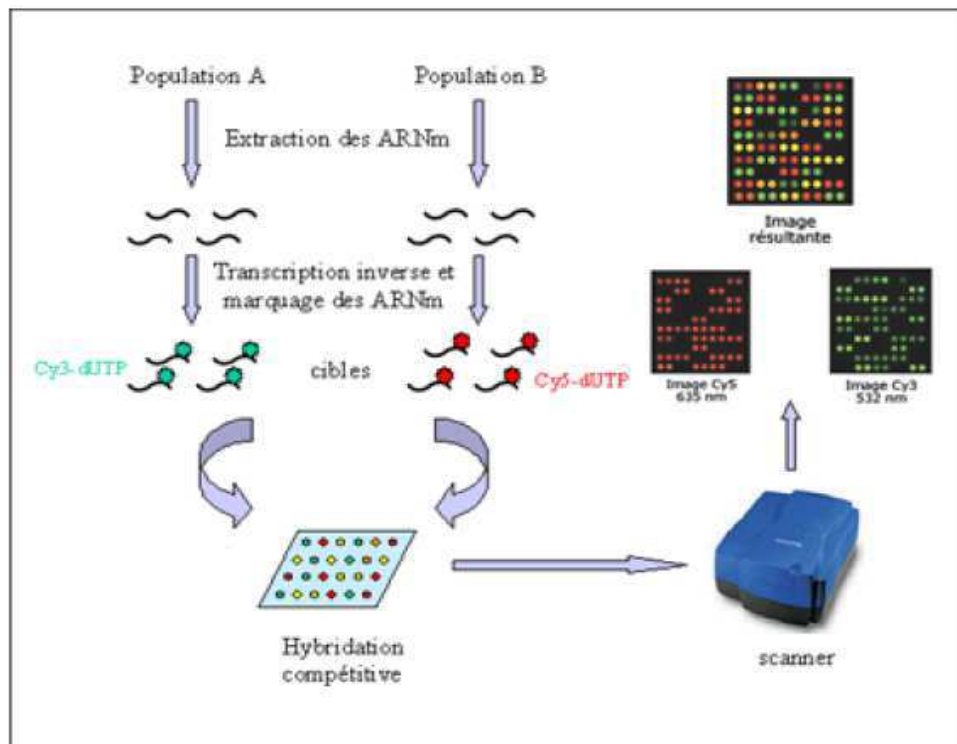


Figure 32. Principe des puces à ADN (Laffaire et coll. [387]).

Deux échantillons marqués par deux fluorophores différents (Cy3 et Cy5) sont hybridés simultanément sur la puce à ADN. Le ratio des intensités obtenu correspond aux ratios d'expression des gènes entre les deux échantillons.

Tableau I. Design de la biopuce.

	Gènes	Oligos	« Spots »
Gènes / 1 oligos	19	19	38
Gènes / 2 oligos	3338	6676	13352
Gènes / 3 oligos	154	462	924
Contrôles positifs	-	-	536
Contrôles négatifs	-	-	894
<u>Nombre total</u>	3511	7157	15744

Tableau II. Liste des amorces de gènes utilisés pour la normalisation des résultats de RT-PCR en temps réel.

Gènes	Séquence 3' – 5'	Séquence 5' – 3'
<i>rpsJ</i>	GATCACAAGTTTCAGGACCTG	GTCTTAGGTGTTGGATTAGAC
<i>gluD</i>	ATGCAGTAGGGCCAACAAAA	TTCCACCTTTACCTCCACCA
<i>rrs (16S)</i>	GGGAGACTTGAGTGCAGGAG	GTGCCTCAGCGTCAGTTACA
<i>ADN polIII</i>	TCCATCTATTGCAGGGTGGT	CCCAACTCTTCGCTAAGCAC
<i>rpoA</i>	TAAAGGTAGAGGTTATGTTTCTGCT	TTTGACCAACTCTTGTGTTTCC
<i>gyrA</i>	TTTTGTTGTGTCTATGAACCTTGT	TCCTTACCAGCTCTTATTGACTT

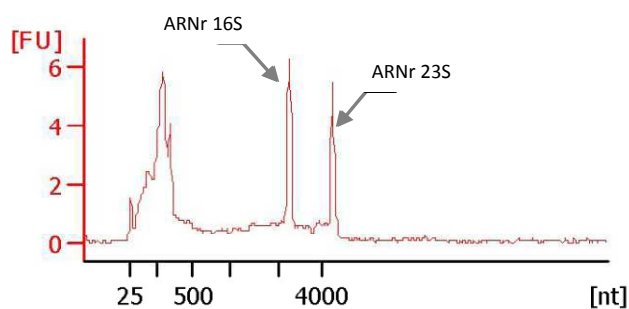


Figure 33. Exemple de profil obtenu par le bioanalyseur sur l'un des échantillons d'ARN du mutant Δ FliC testé en biopuce.

Les pics représentent respectivement les petits ARN eucaryotes non éliminés par le kit MICROBEnrich (Ambion), les ARN ribosomaux 16S et les ARN ribosomaux 23S.

Tableau III. Caractéristiques des échantillons d'ARN sélectionnés pour l'analyse transcriptomique du mutant Δ FliC *in vivo*.

Echantillons d'ARN	Visuel *	RIN**	Cc° finale (μ g/ μ l)	V total (μ l)	Degré de contamination % (gyrA)***	Degré de contamination % (rpoA)***
027-1	(++)	8.5	0.3	43	0.37	0.00
027-2	(++)	7.2	0.3	43	0.16	0.00
027-3	(++)	8	0.3	43	0.17	0.02
027-4	(++)	8.1	0.3	43	1.70	0.01
Δ FliC-1	(++)	6.7	0.3	43	0.01	0.00
Δ FliC-2	(++)	6.7	0.3	43	0.01	0.00
Δ FliC-3	(++)	6.5	0.3	43	0.03	0.00
Δ FliC-4	(++)	6.5	0.3	43	0.16	0.01

*Le visuel correspond au profil de bioanalyseur obtenu qui est indicateur de la qualité de l'ARN analysé. Il prend en considération la présence des deux pics d'ARN ribosomaux 16S et 23S à des proportions correctes, ainsi que la quasi absence de produits de dégradation ou de produits contaminants comme l'ADN. Selon l'état de l'ARN, une estimation qualitative (-, + ou ++) est attribuée à chaque échantillon.

**RIN = RNA Integrity Number. Ce nombre varie entre 1 et 10 et est calculé par le logiciel d'Agilent afin de renseigner sur la qualité et l'état de dégradation de l'ARN. Une valeur proche de 0 atteste d'une mauvaise qualité de l'ARN et une valeur avoisinant 10 témoigne d'une très bonne qualité de l'ARN.

***Le degré de contamination des échantillons a été déterminé, au moyen de deux couples d'amorces (gyrA et rpoA). Un pourcentage de contamination inférieur à 5 % est jugé acceptable.

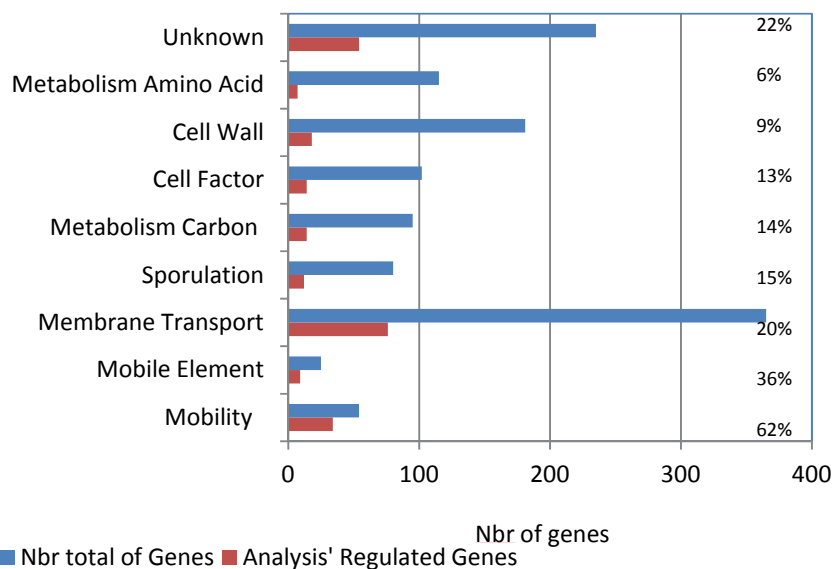
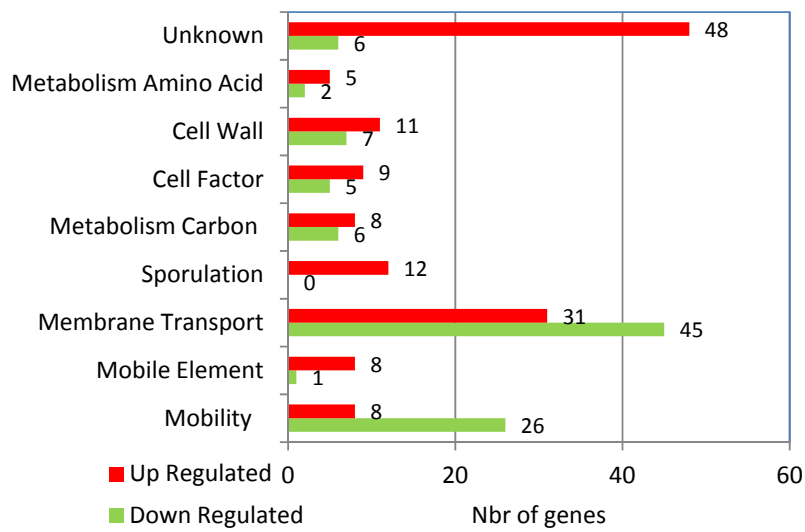


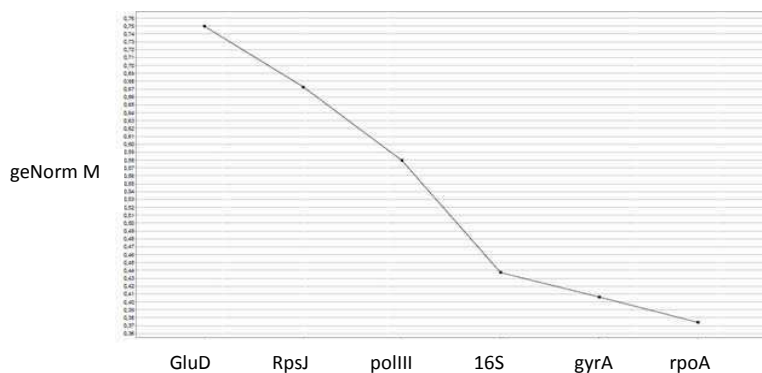
Figure 34. Représentation des principaux groupes de gènes différentiellement exprimés entre la souche mutante Δ FliC et la souche sauvage 027 *in vivo*.

Tableau IV. Résultats des analyses en RT-PCR en temps réel pour l'étude du mutant Δ FliC *in vivo*.

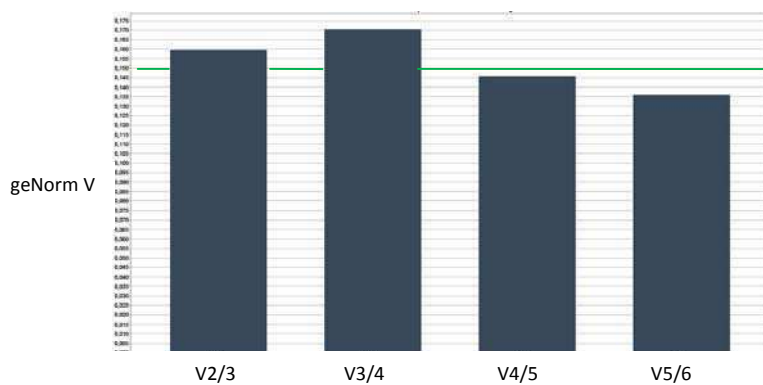
Numéros de gènes	Noms des gènes	Facteur d'expression en RT-PCR	Facteur d'expression sur la biopuce
CDR0238	<i>fliD</i>	9.85	5.05
CDR2678	<i>cwp66*</i>	0.61	2.87
CDR2479	<i>fbpA*</i>	0.03	1
CDR0195	<i>groEL*</i>	0.36	1
CDR2676	<i>cwp84*</i>	0.41	1
CDR2927	<i>pts1</i>	70.15	51.25
CDR2862	<i>pts2</i>	0.04	0.07
CDR2864	<i>malY</i>	0.01	0.05
CDR3138	<i>pts3</i>	17.63	11.76
CDR0785	<i>oppA</i>	0.03	0.06
CDR0783	<i>oppB</i>	0.06	0.07
CDR0224	<i>rham</i>	12.66	4.82
CDR2930	<i>treA</i>	177.63	24.38
CDR0152	<i>hpdA</i>	1.72	3.11
CDR0154	<i>hpdB</i>	1.67	1
CDR3187	<i>agr2</i>	4.26	4.89
CDR0584	<i>tcdA*</i>	0.64	1
CDR0582	<i>tcdB*</i>	0.59	1
CDR0585	<i>tcdC</i>	0.38	0.48
CDR1105	-	5.65	3.49
CDR0212	<i>(coat)</i>	6.66	6.88
CDR1579	<i>(HK)</i>	2.67	2.46
CDR0598	<i>csfT</i>	3.37	5.02
CDR2491	<i>cdtA</i>	2.49	1
CDR2492	<i>cdtB</i>	2.6	2.36

*Les gènes considérés comme étant non confirmés par la RT-PCR en temps réel. Les gènes *cdtA* et *hpdB*, ne sont pas considérés comme tel car ils sont co-transcrits avec les gènes *cdtB* et *hpdA* qui sont eux exprimés de la même façon avec les deux techniques d'analyse. Les gènes successifs grisés sont d'ailleurs des gènes situés dans le même opéron.

La couleur rouge indique une sur-expression du gène chez le mutant Δ FliC par rapport à la souche sauvage 027, et la couleur verte indique une sous-expression.



(a) Stabilité des différents gènes de référence



(b) Nombre optimal de gènes de référence à retenir

Figure 35. Sélection des gènes de référence par GeNorm^{PLUS}.

Le programme GeNorm^{PLUS} permet de calculer les valeurs M et V nécessaires pour le choix des meilleurs gènes de référence à retenir. Il est conseillé de tester plusieurs gènes de référence (en moyenne 8) pour avoir une bonne sélection.

(a) La valeur M est la valeur mesurant la stabilité de l'expression d'un gène de référence donné. Elle est calculée par GeNorm^{PLUS} en faisant la moyenne, deux à deux, de la variation V du gène en question avec tous les autres gènes de référence à tester. Les valeurs M permettent ainsi de classer les gènes selon leur ordre de stabilité. Les valeurs les plus faibles correspondent aux gènes de référence les plus stables.

(b) Les valeurs V permettent de déterminer le nombre optimal de gènes de référence à utiliser pour les analyses. Des valeurs $V_{n/n+1}$ sont calculées pour chaque comparaison entre deux nombres de gènes consécutifs (n et n+1). En règle générale, il est déconseillé de prendre un gène supplémentaire quand la valeur (n+1) chute en dessous du seuil 0.15 indiqué dans la figure par la ligne verte. Dans notre essai, il est donc recommandé de prendre quatre gènes de référence, à savoir *rpoA*, *gyrA*, *polIII* et *16S*, et ce en utilisant la moyenne géométrique des valeurs de leurs cycles seuils respectifs (Ct).

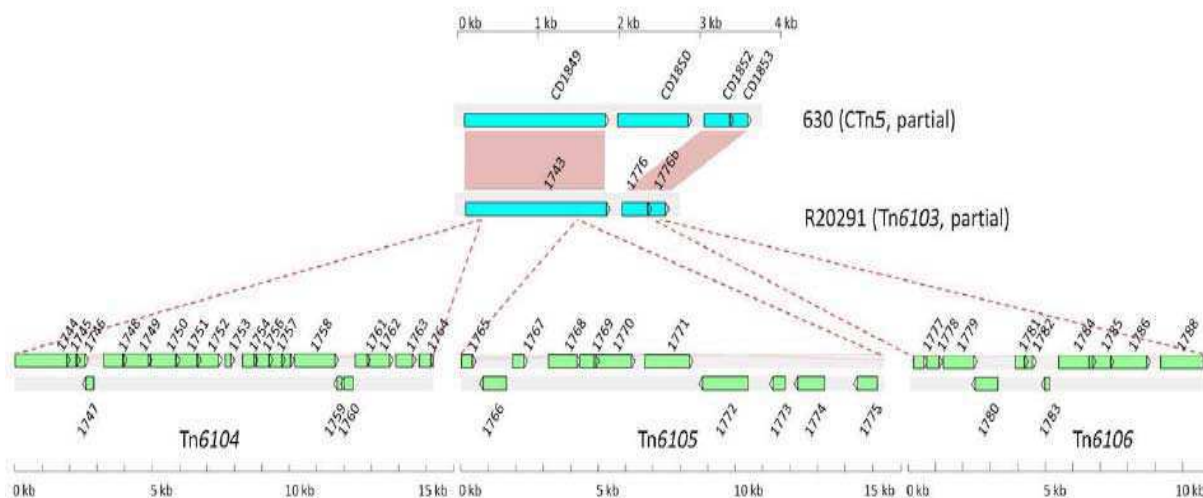


Figure 36. Représentation schématique de Tn6104, Tn6105 et Tn6106 dans Tn6103, d'après Brouwer et coll. [410]

Les gènes homologues entre CTn5 (CD1849-CD1853) de la souche 630 et Tn6103 de la souche R20291 de *C. difficile* sont représentés par les boxes rouges. Les trois insertions au niveau de Tn6103 sont indiquées par les pointillés.

Tableau V. Liste des transposons potentiellement conjugatifs et mobilisables dans la souche R20291 de *C. difficile*, d'après Brouwer et coll. [410]

	Excision du génôme	ORF du début	ORF de la fin	Taille (kb)	Pourcentage G+C
CTn1-like	Non	3453	3475	27.2	39.9
Tn6103	Oui	1740	1809	84.9	41.2
Tn6104	Oui	1744	1764	15.6	48.2
Tn6105	Non	1765	1775	15.8	49.8
Tn6106	Non	1777	1788	11.3	49.9

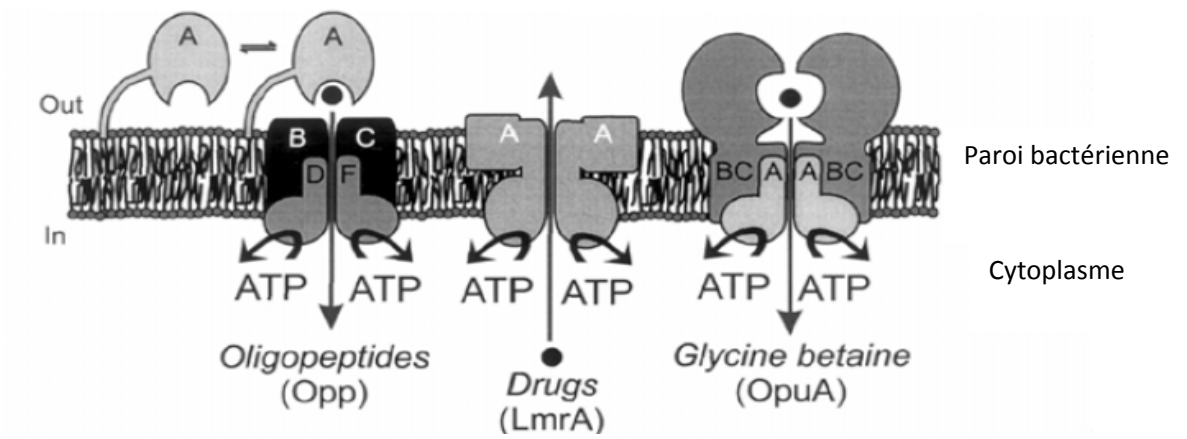


Figure 37. Organisation des ABC transporteurs chez les bactéries à Gram positif, d'après Detmers et coll. [423]

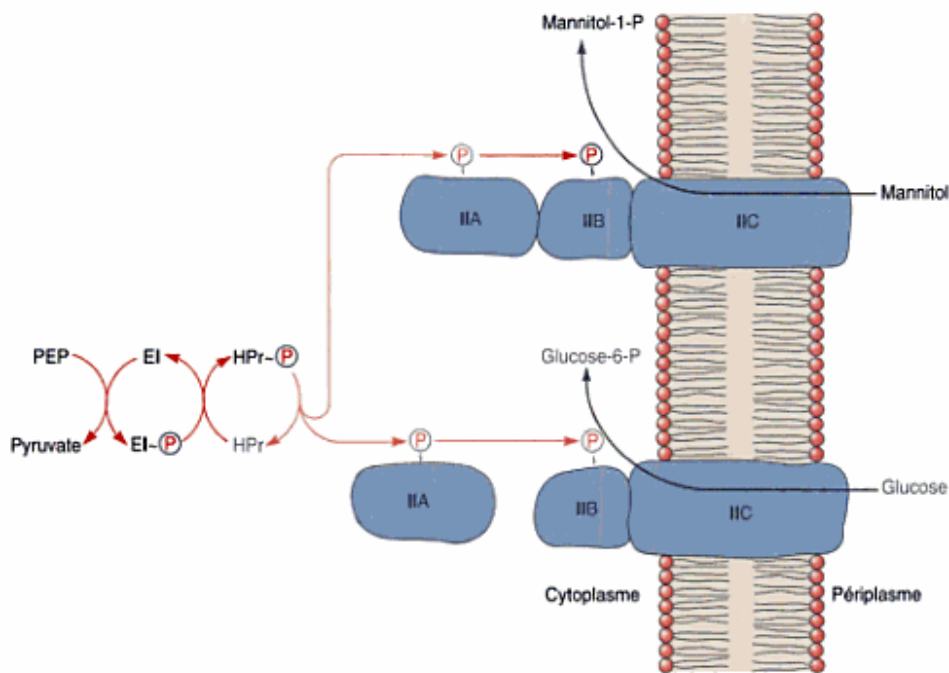


Figure 38. Le transport PTS bactérien, d'après Prescott et coll. [425]

Deux exemples de la phosphotransférase de sucres (PTS) dépendant du phosphoénolpyruvate sont illustrés. Le système implique l'intervention des composés suivants : le phosphoénolpyruvate, *PEP* ; l'enzyme I, *EI* ; la protéine thermostable de faible masse moléculaire *HPr* ; l'enzyme II, *EII* ; Le phosphate riche en énergie est transféré de *HPr* à *EIIA*, une enzyme soluble. *EIIA* est liée à *EIIB* dans le transporteur de mannitol, il est séparé de *EIIB* dans le transporteur du glucose. Dans chaque cas, le phosphate passe de *EIIA* à *EIIB*, il est ensuite transféré sur le sucre au cours du transport à travers la membrane. D'autres relations entre les composants de *EII* sont possibles. Par exemple, *IIA* et *IIB* peuvent former une protéine soluble séparée du complexe membranaire, le phosphate se déplace de toute façon de *EIIA* à *EIIB* et ensuite sur le ou les domaines membranaires.

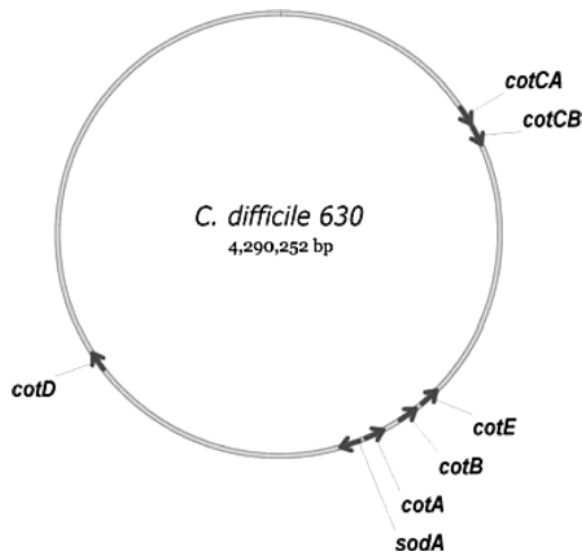


Figure 39. Gènes des protéines de la paroi sporale de *C. difficile*, identifiés par Permpoonpattana et coll. [288]

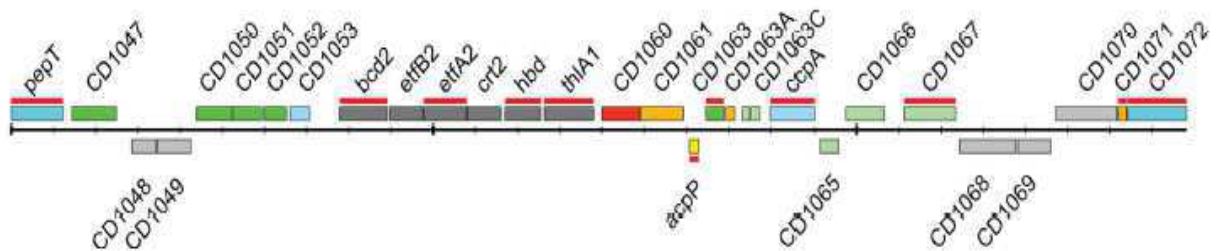
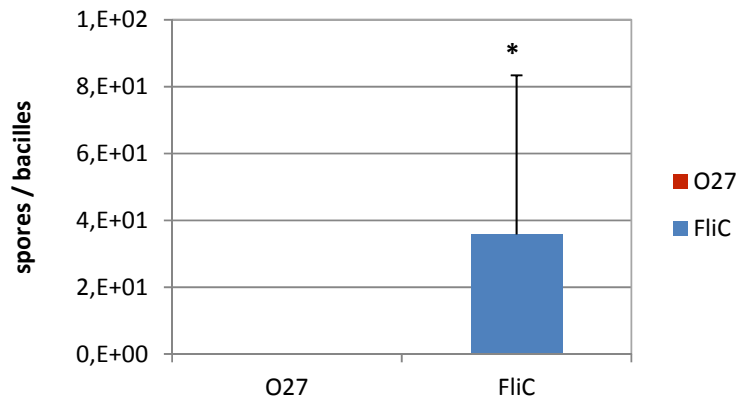
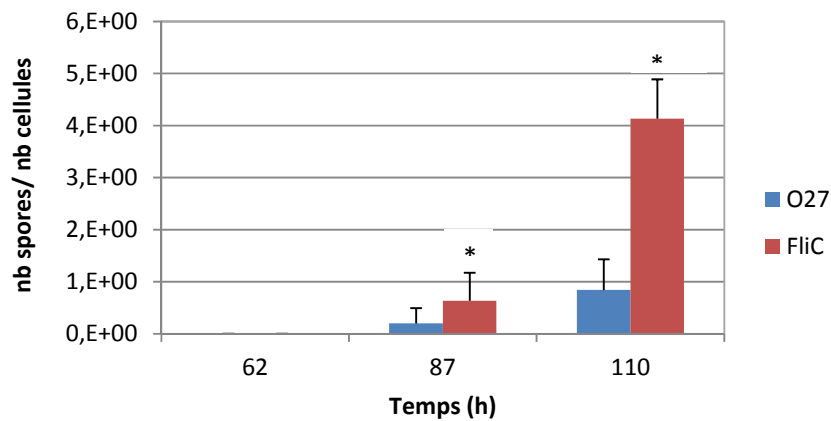


Figure 40. Représentation d'une région de 27,8 kb du génome de la souche 630 de *C. difficile* contenant plusieurs protéines sporales d'après Lawley et coll. [287]

Les lignes rouges indiquent les gènes codants des protéines trouvées dans la spore mature. La couleur verte foncée représente les gènes codant des protéines associées à la surface. La couleur gris foncée et la couleur jaune représentent respectivement les gènes impliqués dans le métabolisme énergétique et dans le métabolisme central/intermédiaire ; la couleur orange indique les gènes de protéines hypothétiques conservées et la couleur verte claire est relative aux gènes codant des protéines inconnues ; la couleur bleue claire représente les régulateurs et la couleur bleue ciel représente les protéines dégradant les grosses molécules ; et enfin le gris clair pour divers.



(a) Capacité de sporulation des souches O27 et Δ FliC dans des souris monoxéniques à 14 h post-infection.



(b) Cinétique de sporulation des souches O27 et Δ FliC en milieu BHIS

Figure 41. Comparaison de la capacité de sporulation de la souche mutée Δ FliC et de la souche sauvage O27 *in vivo* et *in vitro*.

(a) Des souris axéniques ont été inoculées par voie oro-gastrique par 10^8 bactéries/souris. Après 14 h d'infection, les spores et les formes végétatives ont été dénombrées dans les fèces.

(b) Du milieu BHIS a été inoculé au $1/100^\circ$ avec une préculture en début de phase stationnaire. Les spores et les formes végétatives ont été dénombrées aux temps indiqués.

* $p < 0,05$

Tableau VI. Liste des gènes différentiellement exprimés chez le mutant Δ FliC et qui sont spécifiques aux souches 027 de *C. difficile*, selon Stabler et coll. [259]

Gène	Gène orthologue	Description du gène	Facteur d'expression Δ FliC / 027
CDR0045	CD196_0057	hypothetical protein	2.77
CDR0224	CD196_0237	glucose-1-phosphate thymidyltransferase	4.82
CDR0225	CD196_0238	dtdp-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	3.09
CDR0226	CD196_0239	dtdp-glucose 4,6-dehydratase	5.91
CDR0243	CD196_0256	glycosyl transferase, group 2 family	2.19
CDR0244	CD196_0257	hypothetical protein	2.77
CDR0440	CD196_0454	cell surface protein (putative hemagglutinin/adhesin) precursor	0.11
CDR0551	CD196_0569	abc transporter, atp-binding/permease protein	3.73
CDR1429	CD196_1454	hypothetical protein	2.97
CDR1430	CD196_1455	hypothetical protein	3.08
CDR1439	CD196_1464	hypothetical protein	0.33
CDR1443	CD196_1468	hypothetical protein	2.6
CDR1447	CD196_1472	hypothetical protein	3.67
CDR1448	CD196_1473	hypothetical protein	2.71
CDR1462	CD196_1487	hypothetical protein	3.26
CDR2092	CD196_2049	putative lipoprotein	2.31
CDR2275	CD196_2228A		2.38
CDR2278	CD196_2230	putative peptidoglycan-binding/hydrolysing protein	3.62
CDR2760	CD196_2713	two-component system, sensor histidine kinase	2.02
CDR2908	CD196_2861	hypothetical protein	2.75
CDR2909	CD196_2862	type i restriction enzyme r subunit	2.51
CDR2964	CD196_2917	transcriptional regulator, padr-like family	2.34
CDR2981	CD196_2934	spermidine/putrescine abc transporter atp-binding subunit	3.39
CDR2982	CD196_2935	hypothetical protein	1.94
CDR2983	CD196_2936	abc-type fe3+ transport system periplasmic component-like protein precursor	2.8
CDR2990	CD196_2943	hypothetical protein	2.89
CDR2994	CD196_2947	crispr-associated helicase cas3	1.93
CDR2995	CD196_2948	crispr-associated autoregulator, devr family	2.12
CDR2996	CD196_2949	hypothetical protein	2.24
CDR2998	CD196_2951	crispr-associated protein cas5 family	2.45
CDR3185	CD196_3139	abc transporter, atp-binding protein	2.1
CDR3187	CD196_3141	accessory gene regulator	4.89
CDR3188	CD196_3142	sensor histidine kinase virs	3.13
CDR3189	CD196_3143	dna-binding response regulator, lytrr family	3.3
CDR3278	CD196_3232	putative exported protein precursor	4.25
CDR3281	CD196_3235	transposon Tn21 resolvase	3.65
CDR3285	CD196_3239	hypothetical protein	5.45

Tableau VI. Suite de la liste des gènes différentiellement exprimés chez le mutant Δ FliC et qui sont spécifiques aux souches 027 de *C. difficile* selon Stabler et coll., [259]

Gène	Gène orthologue	Description du gène	Facteur d'expression Δ FliC / 027
CDR3286	CD196_3240	hypothetical protein	3.09
CDR3456	CD196_3410	hypothetical protein	2.95
CDR3457	CD196_3411	hypothetical protein	3.39
CDR3461		Chloramphenicol o-acetyltransferase	3.39
CDR3469	CD196_3423	transcriptional regulator, tetr family	3.38

N.B. Les gènes en rose clair sont regroupés en opéron.

Tableau VII. Liste des gènes différentiellement exprimés chez le mutant Δ FliC et qui sont spécifiques à la souche 027 R20291 selon Stabler et coll. [259]

Gène	Description	Facteur d'expression Δ FliC / 027
CDR1759	inconnue	3.40
CDR1760	inconnue	2.90
CDR1747	inconnue	2.02
CDR1774	inconnue	2.97

Tableau VIII. Résultats récapitulatifs concernant les mutants du flagelle des deux souches 630 Δ erm et 027 R20291

	630 Δ erm	027 R20291
Adhésion aux cellules Caco-2	Δ FliC, Δ FliD, Δ FlgE : ++	Δ FliC, Δ FliD, Δ FlgE, Δ MotB : (-)
Cinétique d'implantation	Δ FliC : absence de différence dans les 3 modèles de souris gnotoxéniques	Δ FliC : difficultés à coloniser les souris en présence de 027 et de Δ MotB
Adhésion aux caeca (J 7)	Δ FliC : (-) en essai de compétition	Δ FliC : (-) en essais de compétition
Virulence	Δ FliC : ++ en modèle hamster	Δ FliC : ++ chez la souris monoxénique
Expression et production des toxines	Δ FliC, Δ FliD : ++ expression de <i>tcdA in vitro</i> ++ cytotoxicité Δ FlgE : (-) d'expression (-) cytotoxicité	Δ FliC : (-) expression de <i>tcdA</i> et <i>tcdB in vivo</i> pas de différence de cytotoxicité ++ expression de <i>cdt A</i> et <i>cdtB in vivo</i>
Sporulation	-	Δ FliC : ++ <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>
Conclusions	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de rôle dans l'adhésion • Rôle dans la virulence 	<ul style="list-style-type: none"> • Importance de l'adhésion et non de la mobilité dans la colonisation intestinale • Rôle dans la virulence/ Rôle différent de celui de 630Δerm

(+) Effet positif ou supérieur / (-) Effet négatif ou inférieur

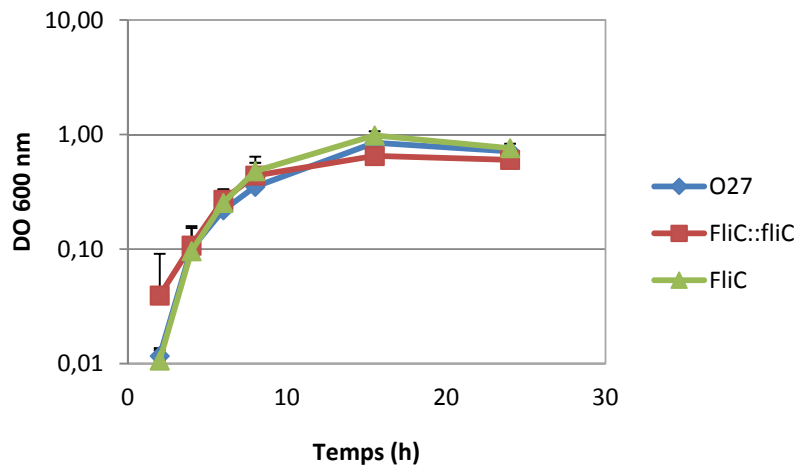


Figure 42. Cinétique de croissance des trois souches O27, Δ FliC et Δ FliC complétée en milieu PY.

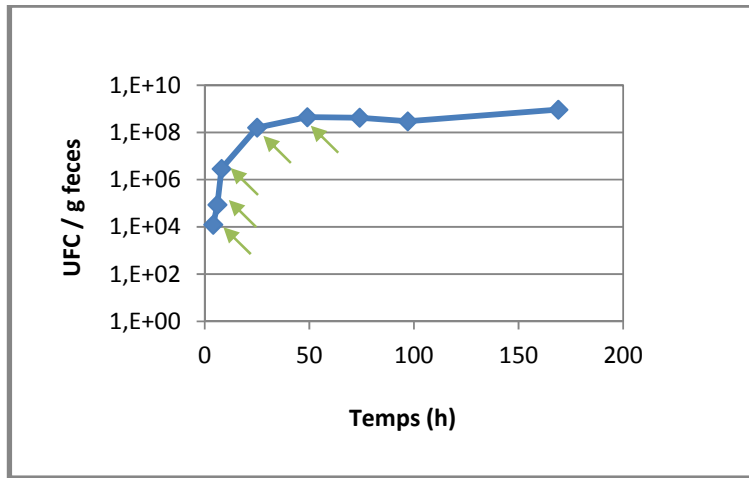


Figure 43. Cinétique de colonisation de souris monoxéniques par la souche 027 R20291.

Les flèches indiquent les temps 4 h, 6 h, 8 h, 14 h et 38 h au cours desquels les prélèvements ont été réalisés pour l'extraction de l'ARN bactérien.

Tableau IX. Liste des gènes variables au cours du processus d'infection des souris par la souche 027 R20291 et qui ont été analysés par RT-PCR en temps réel.

Gènes	Description	4 h	6 h	8 h	14 h	38 h
CDR3187	<i>agr2</i>	0.35	0.30	1.33	0.60	0.94
CDR3090	<i>bclA2</i>	1.67	2.28	2.47	6.63	9.07
CDR0522	<i>cotJB1</i>	1.40	3.74	1.97	394.37	162.38
CDR2479	<i>fbpA</i>	0.91	0.93	1.04	0.95	0.57
CDR2214	<i>gatC</i>	11.39	13.24	1.30	3.45	9.25
CDR2491	<i>cdtA</i>	0.28	0.42	1.04	1.03	0.94
CDR2492	<i>cdtB</i>	0.22	0.32	1.04	0.93	0.67
CDR0043	<i>thyA</i>	1.73	1.49	1.06	0.83	1.55
CDR2491	<i>tcdA</i>	0.32	0.64	1.02	2.19	3.17
CDR2492	<i>tcdB</i>	0.17	0.51	1.23	2.78	4.45
CDR0583	<i>tcdE</i>	0.25	0.27	0.61	0.90	1.53
CDR1740	<i>ctn5</i>	0.60	0.53	1.23	14.25	11.35
CDR2678	<i>cwp66</i>	0.52	1.15	1.03	1.09	0.61
CDR2676	<i>cwp84</i>	0.82	1.31	1.02	2.07	0.80

Les valeurs colorées correspondent aux valeurs dont l'expression est significativement variable par rapport au temps 8 h ($p < 0,05$). La couleur rouge indique une surexpression et la couleur vert indique une sous-expression par rapport à 8 h.

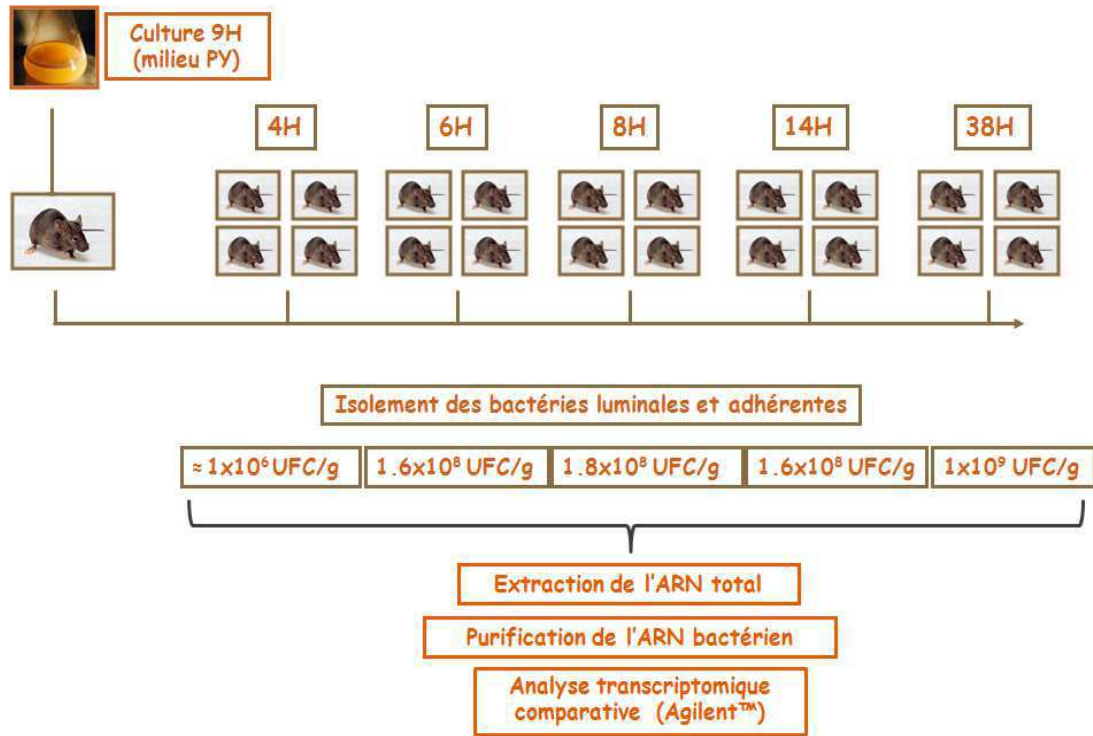


Figure 44. Protocole expérimental pour l'analyse transcriptomique de la cinétique de colonisation *in vivo* de la souche 027 R20291.

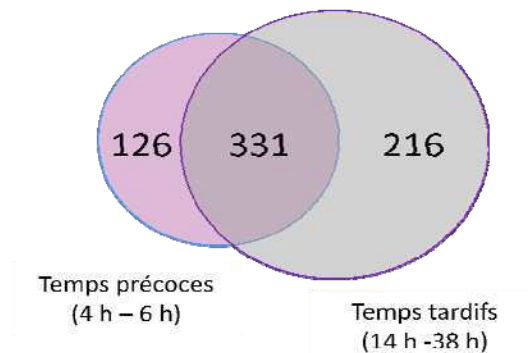


Figure 45. Nombre de gènes différentiellement exprimés pendant les temps précoces et les temps tardifs de la colonisation de souris monoxéniques par la souche 027 R20291 de *C. difficile*.

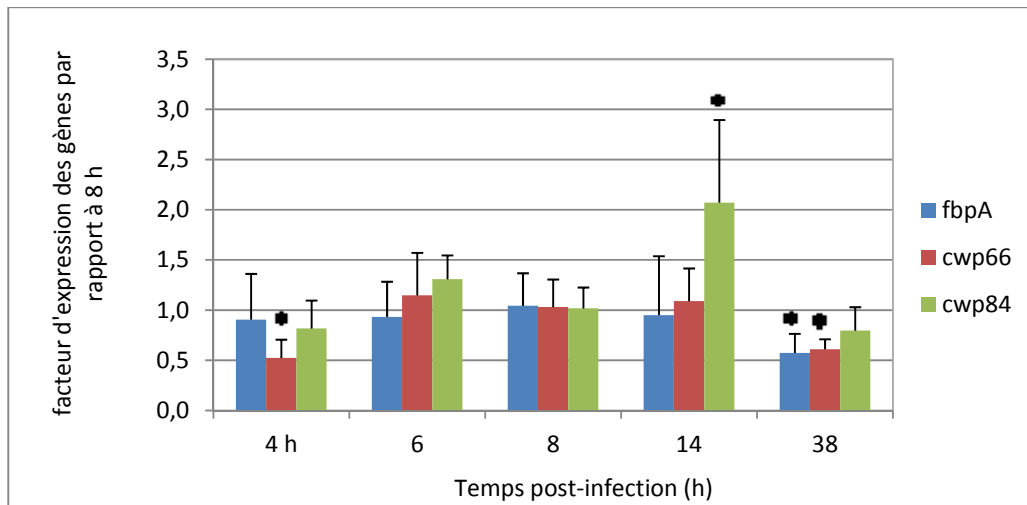


Figure 46. Cinétique d'expression *in vivo* de gènes d'adhésines de la souche 027 R20291 de *C. difficile* déterminé par RT-PCR en temps réel.

L'expression de ces gènes a été déterminée par RT-PCR en temps réel à partir d'ADNc de 6 réplicats biologiques. Ils ont été normalisés par rapport à 3 gènes de référence (*polIII*, *rpoA* et *gyrA*).

* significatif pour $p < 0,009$

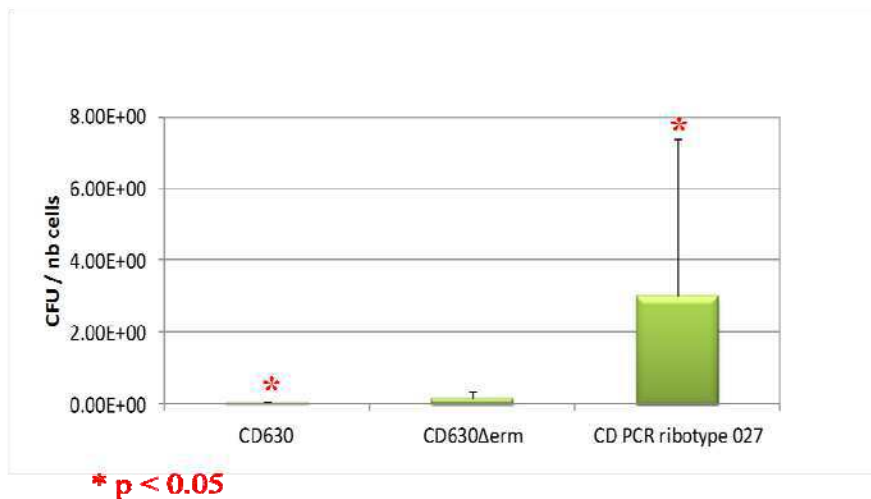
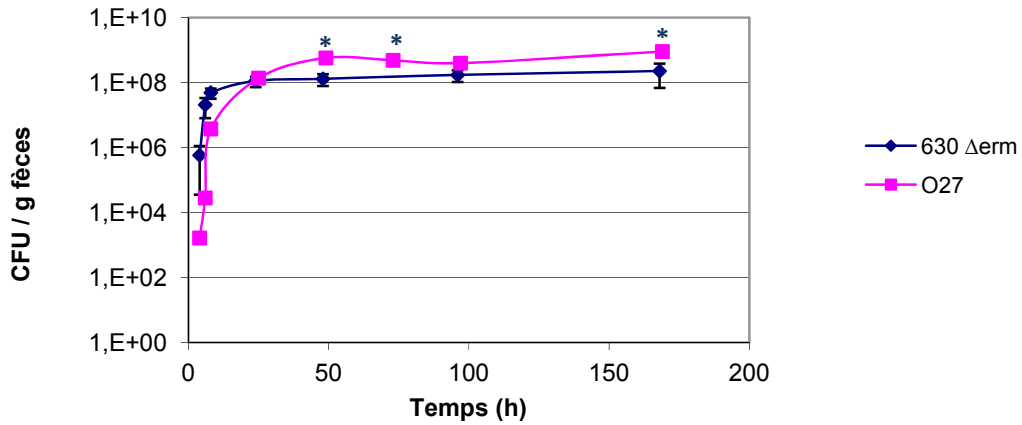
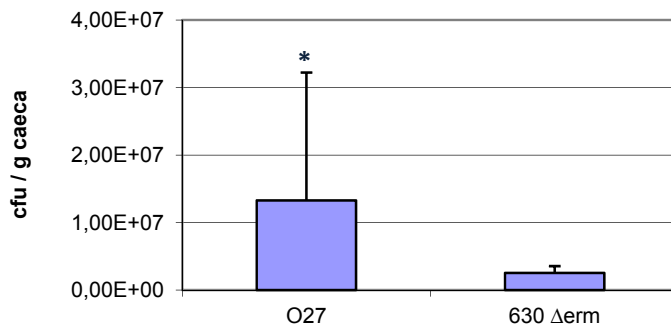


Figure 47. Capacité d'adhésion des souches 630, 630Δerm et 027 R20291 aux cellules en culture Caco-2.

La capacité d'adhésion des différentes souches a été évaluée par dénombrement des bactéries adhérentes aux cellules Caco-2 différenciées. L'infection est réalisée à partir de 10^8 bactéries / ml et le dénombrement est effectué après incubation de 1 h 30 à 37°C en condition anaérobie.



(a) Comparaison de la cinétique de colonisation des souris monoxéniques avec les souches 630 Δ erm et O27 R20291



(b) Adhésion des souches 630 Δ erm et O27 R20291 aux caeca de souris monoxéniques

Figure 48. Capacité d'adhésion et de colonisation *in vivo* des souches 630 Δ erm et O27 R20291.

(a) Après infection des souris à raison de 107 bactéries / souris, la cinétique de colonisation des deux souches a été déterminée au cours du temps. Le taux de colonisation est évalué par dénombrement des cellules bactériennes dans les fèces des souris.

(b) Le taux d'adhésion aux caeca est déterminé par dénombrement des cellules bactériennes adhérentes après lavage et broyage des caeca.

*significatif pour $p < 0,05$

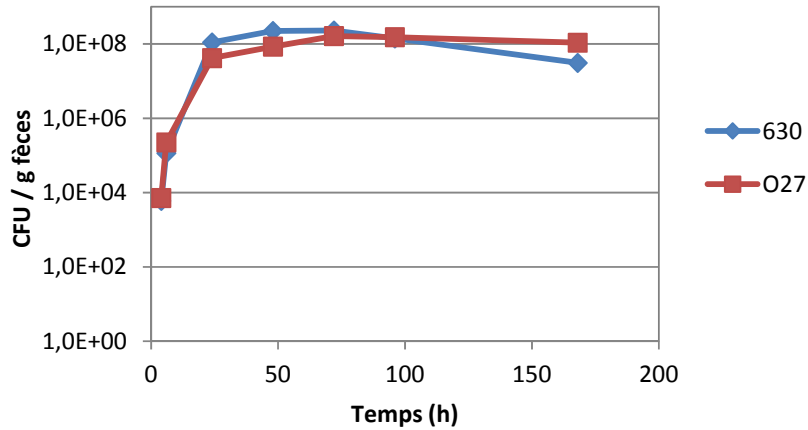


Figure 49. Cinétique de colonisation des souches 630 Δ erm et 027 R20291 en modèle de souris dixéniques.

Les souris sont inoculées simultanément par les deux souches de *C. difficile* à raison de 10^7 bactéries / ml. Le suivi du taux de colonisation est réalisé par dénombrement des cellules bactériennes à partir des fèces prélevées au cours du temps.

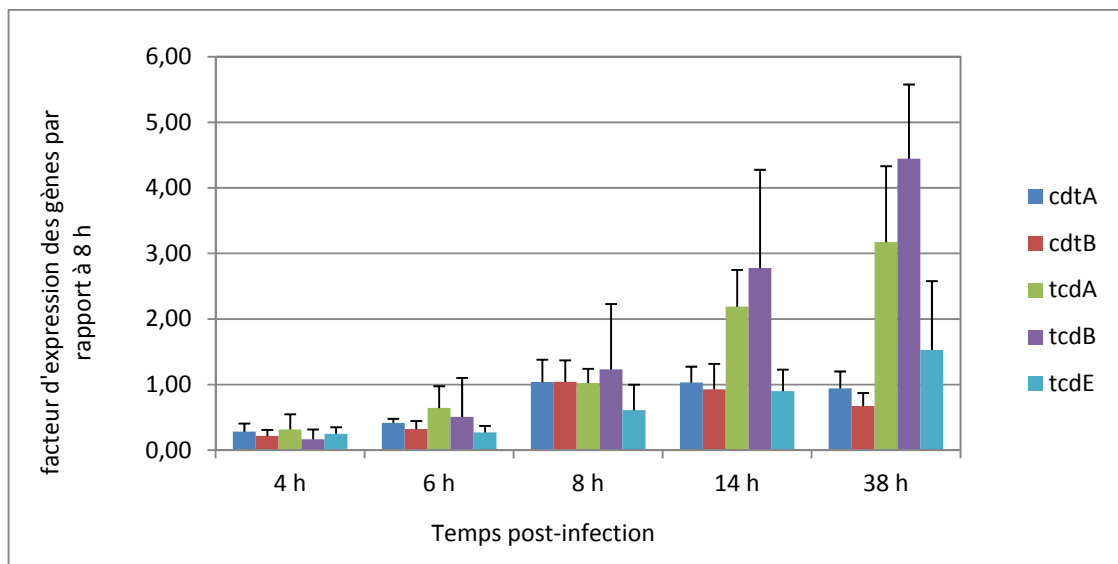


Figure 50. Cinétique d'expression *in vivo* de gènes de toxines de la souche 027 R20291 de *C. difficile* déterminé par RT-PCR en temps réel.

L'expression de ces gènes a été déterminée par RT-PCR en temps réel à partir d'ADNc de 6 réplicats biologiques. Ils ont été normalisés par rapport à 3 gènes de référence (*polIII*, *rpoA* et *gyrA*).

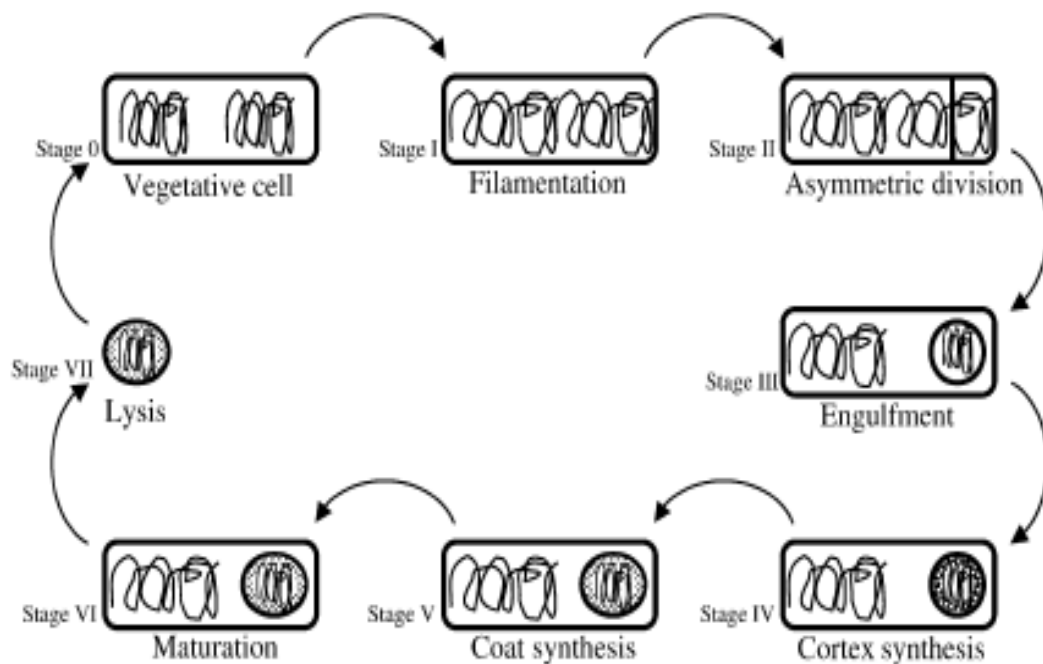


Figure 51. Différents stades de la sporulation, d'après Stephenson et coll. [439]

La sporulation intervient lorsque les conditions deviennent défavorables à la croissance (carence en nutriments, en sels minéraux, manque d'eau). Les bactéries sporulantes (stade 0) entrent alors dans le stade I.

- Au stade I, l'ADN se duplique et se condense en formant un filament axial.
- Au stade II, il y a formation d'un septum qui individualise deux compartiments de tailles inégales. Le filament axial d'ADN se fragmente pour donner 2 molécules.
- Au stade III, la membrane de la grosse cellule englobe la petite cellule qui est finalement endocytée. La petite cellule est appelée prespore, elle est entourée d'une double membrane. L'ensemble est le sporange.
- Au stade IV, la cellule mère produit des composants proches du peptidoglycane qui viennent s'accumuler entre les 2 membranes pour former le cortex. Chez certaines espèces, une autre couche protéique plus externe est synthétisée, c'est l'exosporium (structure facultative).
- Au stade V, la formation du cortex et de l'exosporium se poursuit avec synthèse de nouvelles enveloppes protéiques : les tuniques qui s'insèrent entre le cortex et l'exosporium. On observe également l'accumulation d'acide dipicolinique (DPA) et de calcium dans le cytoplasme. Cette accumulation s'accompagne d'une déshydratation de la spore et de la production de SASPs (*Small Acide Soluble spore Proteins*).
- Au stade VI, la maturation de la spore s'achève. Peu de différence physique est observée depuis le stade V mais la spore acquiert, à ce niveau, toutes ses propriétés de résistance.
- Au stade VII, la cellule mère (ou sporange) est lysée sous l'effet des enzymes lytiques. Elle libère la spore mure.

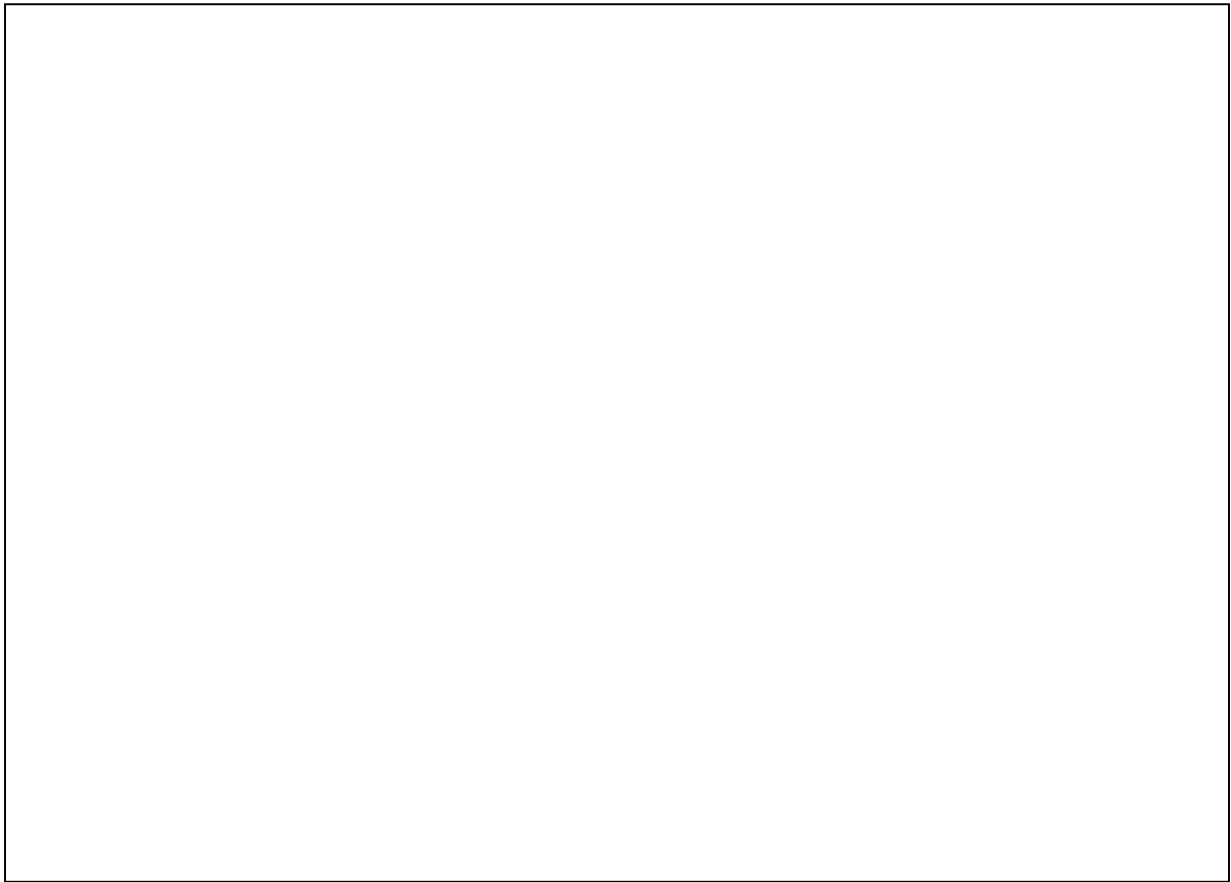


Figure 52. Expression des gènes de sporulation au cours du processus d'infection de souris gnotobiotiques par *C. difficile* 027 R20291.

Représentation des groupes de gènes de sporulation exprimés au cours de la cinétique de colonisation des souris gnotobiotiques, d'après les résultats de la transcriptomique. Le nombre de spores par gramme de fèces a été aussi évalué aux différents temps étudiés

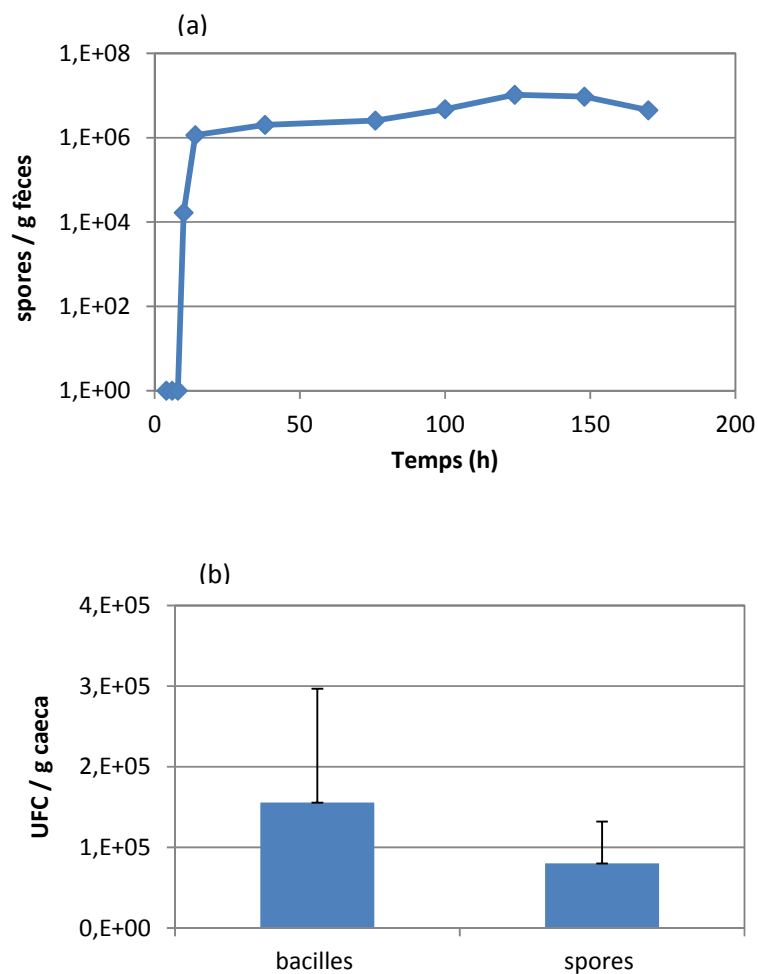


Figure 53.

a. Cinétique de sporulation *in vivo* de la souche 027 R20291 de *C. difficile*.

La cinétique de sporulation a été étudiée dans un modèle de souris gnotobiotiques. Elle a été déterminée par dénombrement des spores dans les fèces des souris pendant les temps indiqués.

b. Adhésion des spores et des bacilles de *C. difficile* 027 R20291 aux caeca de souris monoxéniques (J7)

Le taux d'adhésion des spores aux caeca a été également déterminé après sacrifice des souris. Les spores et les formes bacillaires non adhérentes sont éliminées par plusieurs lavages successifs. Les bactéries et les spores adhérentes sont dénombrées en milieu BHI additionné de 0,1 % taurocholate après broyage des caeca.

Tableau X. Liste des gènes spécifiques aux souches 027 (R20291 et CD196) et qui sont différentiellement exprimés au cours du processus d'infection des souris par la souche R20291, selon Stabler et coll. [259]

Gène	Gène orthologue	Description du gène	4H/8H*	6H/8H*	14H/8H*	38H/8H*
CDR0510	CD196_0527	putative signaling protein precursor	1	1	2.64	1
CDR0043	CD196_0055	thymidylate synthase	2.21	1	1	1
CDR0044	CD196_0056	dihydrofolate reductase region	2.61	1	1	1
CDR0045	CD196_0057	hypothetical protein	2.42	1	1	1
CDR0047	CD196_0059	Fragment of C-terminal putative thymidylate synthase	4.08	1	1	1
CDR1847	CD196_1802	possible transcriptional regulator	1	1	1	3
CDR2515	CD196_2468	amino acid permease family protein	4.68	1	1	1
CDR2516	CD196_2469	cobalt dependent xaa-pro dipeptidase	2.94	1	1	1
CDR3187	CD196_3141	accessory gene regulator	0.25	1	1	1

* Chaque temps est comparé au temps 8 h.

Tableau XI. Liste des gènes spécifiques à la souche 027 R20291 et qui sont différentiellement exprimés au cours du processus d'infection des souris, selon Stabler et coll. [259]

Gène	Description	4H/8H*	6H/8H*	14H/8H*	38H/8H*
CDR1781	inconnue	1	1	1	2.38
CDR1784	inconnue	1	1	1	3.26
CDR1786	inconnue	1	1	0.19	1
CDR1788	inconnue	1	1	1	2.21

* Chaque temps est comparé au temps 8 h.