



RÉGULATION DE L'EXPRESSION ET ANALYSE FONCTIONNELLE DES PROTÉINES  
CD2830 ET CD2831 DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

par

Maxime Paquette-D'Avignon

mémoire présenté au Département de biologie en vue de l'obtention  
du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, janvier 2015

Le 8 janvier 2015

le jury a accepté le mémoire de Madame Maxime Paquette-D'Avignon  
dans sa version finale.

Membres du jury

Professeur Vincent Burrus  
Directeur de recherche  
Département de Biologie

Professeur François Malouin  
Codirecteur de recherche  
Département de Biologie

Professeur Louis-Charles Fortier  
Membre interne  
Département de microbiologie et infectiologie

Professeur Sébastien Rodrigue  
Président-rapporteur  
Département de Biologie

## SOMMAIRE

*Clostridium difficile* est une bactérie Gram positive anaérobique responsable de plusieurs perturbations intestinales suite à la prise d'antibiotiques et est également reconnue comme une cause majeure de la colite pseudomembraneuse. La pathogenèse des infections à *C. difficile* est principalement associée aux toxines A et B, qui ont été largement étudiées dans les dernières années. Cependant, plusieurs autres aspects de la virulence de ce pathogène sont encore bien mal compris. Un bon nombre de protéines font partie de l'arsenal de facteurs de virulence qui jouent un rôle au niveau de l'adhésion de la bactérie ou qui dégradent certaines composantes de la paroi intestinale afin de permettre à la bactérie de coloniser son hôte. La régulation de l'expression de telles protéines nous permettrait d'en connaître davantage sur la colonisation de l'hôte par *C. difficile*. Chez plusieurs espèces bactériennes, le 3'5' diguanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP) est un second messager important qui régule plusieurs phénotypes. La formation de biofilm ainsi que la régulation de la transition de cellules motiles à un mode de persistance sont parmi les fonctions connues du c-di-GMP. Toutefois, la diversité des processus physiologiques bactériens régulés par le c-di-GMP reste encore pour la plupart peu expliquée chez les bactéries à Gram positif. Chez certaines bactéries, le c-di-GMP est impliqué dans le contrôle de la régulation de l'expression de gènes, via la liaison à des récepteurs à ARN, les riborégulateurs. Les riborégulateurs sont des séquences d'ARN non codants localisés dans la partie 5'UTR d'un ARNm et régulant l'expression de gènes par la liaison d'un ligand à son aptamère comme le c-di-GMP. Cette étude s'intéresse à la régulation et à la fonction des gènes CD2831 et CD2830 qui sont regroupés en un seul locus. L'expression de ces gènes est contrôlée par les niveaux de c-di-GMP intracellulaire via deux riborégulateurs en amont de ces gènes. Chez *C. difficile*, deux classes de riborégulateurs à c-di-GMP, de fonction similaire, mais qui diffèrent structurellement, ont été rapportées; c-di-GMP-I et c-di-GMP-II. L'expression relative du gène CD2830 en aval du riborégulateur à c-di-GMP de type I diminue de 23 à 29 fois lorsque le niveau de c-di-GMP intracellulaire augmente, tandis que pour les mêmes conditions, le gène CD2831 en aval du riborégulateur à c-di-GMP II était de 72 à 96 fois plus exprimé. Des essais  $\beta$ -galactosidase avec des

fusions des riborégulateurs et *lacZ*, ont démontrés que l'expression des gènes CD2830 et CD2831 semble être contrôlée de façon opposée par leurs riborégulateurs transcriptionnels respectifs, selon les concentrations de c-di-GMP intracellulaire. La protéine CD2830 a été décrite comme une métalloprotéase zinc-dépendante ayant une activité sur la fibronectine, le fibrinogène de plasma humain et la protéine CD2831, qui code pour une adhésine putative. La fonction de cette dernière protéine reste encore mal connue. Cette étude n'a pas permis de démontrer que les protéines CD2830 et CD2831 jouent un rôle dans l'agrégation ou dans l'adhésion à la fibronectine et au fibrinogène lorsque la concentration de c-di-GMP intracellulaire varie. Cette étude suggère que chez *C. difficile*, la zinc-métalloprotéase CD2830 est impliquée dans un mécanisme de clivage de protéines d'adhésion, comme décrit chez plusieurs pathogènes, afin de contrôler l'adhésion cellulaire lors de processus biologique important. Ce mécanisme serait régulé par le c-di-GMP.

## REMERCIEMENTS

Je veux tout d'abord remercier mon directeur de recherche le Dr Vincent Burrus de m'avoir donné l'opportunité de cheminer dans son laboratoire. Cette opportunité m'a permis de repousser mes limites, de comprendre et d'apprécier le merveilleux monde de la recherche! Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir fait confiance, je vous en suis très reconnaissante. Merci également pour votre soutien et votre compréhension tout au long du projet.

Je veux également remercier mon codirecteur Dr François Malouin ainsi que mes conseillers, Dr Sébastien Rodrigue et Dr Louis-Charles Fortier pour votre disponibilité et vos précieux conseils. Tout au long de mon projet, vos commentaires ont toujours été très constructifs et m'ont permis de progresser.

Je remercie tous les membres qui font ou ont fait parti du laboratoire ; Daniela Ceccarelli, Aurélie Daccord, Geneviève Garriss, Dominic Poulin-Laprade, Eric Bordeleau, Maxime Sauvé, Nicolas Carraro, Christelle Jouogo-Noumsi. Merci pour votre aide, vos conseils et parfois votre folie, qui ont contribué à alléger les moments plus difficiles. Je tiens à remercier spécialement Eric Bordeleau pour son aide, ses nombreuses explications et surtout sa patience. Je suis bien heureuse d'avoir pu côtoyer des gens comme vous, merci de m'avoir fait voir votre vision à tout un chacun de la science.

Finalement, je veux remercier ma famille et mes amis qui à plusieurs moments ont été d'un support inestimable et m'ont aidé à surmonter les moments de découragements. Merci infiniment pour votre soutien et vos encouragements !

## TABLE DES MATIÈRES

|   |      |
|---|------|
| SOMMAIRE.....   | iv   |
| REMERCIEMENTS.....  | vi   |
| TABLE DES MATIÈRES.....   | vii  |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS .....  | x    |
| LISTE DES TABLEAUX .....  | xii  |
| LISTE DES FIGURES .....   | xiii |
| CHAPITRE 1 .....  | 15   |
| INTRODUCTION .....  | 15   |
| 1.1 <i>Clostridium difficile</i> ( <i>Peptoclostridium difficile</i> )..... | 15   |
| 1.1.1 CDI : Infections reliées à <i>C. difficile</i> .....                  | 15   |
| 1.1.2 Épidémiologie.....  | 16   |
| 1.2 Pathogénèse .....   | 17   |
| 1.2.1 Les toxines A et B de <i>C. difficile</i> .....                       | 18   |
| 1.2.2 Les facteurs de virulence .....                                       | 19   |
| 1.3 Le 3'5' diguanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP).....              | 21   |
| 1.3.1 Le c-di-GMP.....  | 21   |
| 1.3.2 La synthèse et dégradation du c-di-GMP.....                           | 22   |
| 1.3.3 L'implication du c-di-GMP chez <i>C. difficile</i> .....              | 25   |
| 1.3.4 Les récepteurs à c-di-GMP.....  | 26   |
| 1.3.5 Les riborégulateurs.....  | 27   |
| 1.4 Hypothèses et objectifs.....  | 31   |
| CHAPITRE 2 .....  | 35   |

|   |    |
|---|----|
| MATÉRIEL ET MÉTHODES .....  | 35 |
| 2.1 Souches, plasmides et milieux de culture.....   | 35 |
| 2.2 Construction des plasmides.....   | 37 |
| 2.3 Construction des souches .....  | 41 |
| 2.4 Transformations.....  | 44 |
| 2.5 Conjugaison interspécifique.....  | 45 |
| 2.6 Essais $\beta$ -Galactosidase.....  | 46 |
| 2.7 Analyse de l'expression des gènes.....  | 47 |
| 2.8 Production de protéines recombinantes.....  | 48 |
| 2.9 Immunobuvardage (Western Blot).....   | 50 |
| 2.10 Essais protéolytiques.....   | 52 |
| 2.11 Essais d'agrégation.....   | 53 |
| 2.12 Essais d'adhésion en plaque.....   | 53 |
| CHAPITRE 3 .....  | 54 |
| RÉSULTATS .....   | 54 |
| 3.1 Analyse de la régulation des gènes CD2830 et CD2831.....                                      | 54 |
| 3.1.1 Expression relative de CD2830 et CD2831.....  | 54 |
| 3.1.2 Condition contrôle pour l'analyse de l'expression des gènes via les<br>riborégulateurs..... | 57 |
| 3.1.3 Analyse de l'expression de CD2830 via un riborégulateur à c-di-GMP de type I...58           |    |
| 3.1.4 Analyse de l'expression de CD2831 via un riborégulateur à c-di-GMP de type II..59           |    |
| 3.2 Analyse des fonctions des protéines CD2830 et CD2831.....                                     | 60 |
| 3.2.1 Essais protéolytiques avec la protéine recombinante CD2830m.....                            | 64 |



|  |    |
|--|----|
| 3.2.2 Essais d'adhésion à la fibronectine et au fibrinogène des mutants CD2830 et CD2831.....      | 66 |
| 3.2.3 Investigation du rôle de CD2830 et CD2831 dans l'agrégation bactérienne .....                | 69 |
| CHAPITRE 4 .....   | 71 |
| DISCUSSION .....   | 71 |
| 4.1 Implication du c-di-GMP dans la régulation de l'expression des protéines CD2830 et CD2831..... | 71 |
| 4.2 Fonctions des protéines CD2830 et CD2831.....  | 73 |
| 4.2.1 Activité protéolytique de la zinc-métalloprotéase CD2830.....                                | 74 |
| 4.2.2 Rôle dans l'adhésion ou la dégradation de composantes de la MEC.....                         | 75 |
| 4.2.3 Rôle de CD2830 et CD2831 dans l'agrégation des cellules.....                                 | 76 |
| CONCLUSION .....   | 78 |
| BIBLIOGRAPHIE.....   | 81 |

## ABRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

Amp : Ampicilline

ARN : Acide ribonucléique

BHI : *Brain Heart Infusion*

BSA : Albumine de sérum bovin traduit de *Bovin Serum Albumine*

c-di-GMP : Di-guanosine monophosphate cyclique

Cm : Chloramphénicol

cwp : *Cell wall protein*

DGC : Diguanilate cyclase

DO : Densité optique

Er : Érythromycine

g : Gramme

GST : Gluthatione S-Transférase

h : Heure

IPTG : Isopropyl 1-thio- $\beta$ -d-galactopyranoside

kb : Kilopaires de bases

kD : Kilo Dalton

kV : Kilovolt

L : Litre

M : molaire

mAm : Milliampère

MEC : Matrice extracellulaire

min : Minutes

mg : Milligrammes

mL : Millilitres

mm : Millimètre

mM : Millimolaire  
Nor : Norfloxacin  
ONPG : o-Nitrophenyl-beta-galactopyranoside  
pb : Paire de bases  
PBS : *Phosphate Buffer Saline*  
PCR : *Polymerase Chain Reaction*  
PDE : Phosphodiesterase  
PMSF : *Phenylmethanesulfonyl Fluoride*  
SAS : Sulfate d'ammonium  
Sm : Streptomycine  
SOC : *Super Optimal Broth*  
Sp : Spectinomycine  
TCA : acide trichloracétique  
Tm : Thiamphénicol  
 $\mu$ FD : MicroFD  
 $\mu$ g : Microgrammes  
 $\mu$ L : Microlitres  
 $\mu$ M : Micromolaire

## LISTE DES TABLEAUX

|  |    |
|--|----|
| Tableau 1. Riborégulateurs à c-di-GMP prédits et gènes en aval chez <i>C. difficile</i> 630..... | 30 |
| Tableau 2. Souches et plasmides utilisés dans cette étude.....                                   | 36 |
| Tableau 3. Noms et séquences des oligonucléotides utilisés dans cette étude .....                | 43 |

## LISTE DES FIGURES

|   |    |
|---|----|
| Figure 1 : Colite pseudomembraneuse.....  | 16 |
| Figure 2 : Pathogenèse et action des toxines A et B de <i>C. difficile</i> .....  | 18 |
| Figure 3 : Structure et fonction physiologique c-di-GMP.....  | 24 |
| Figure 4 : Exemple d'une régulation transcriptionnelle et traductionnelle des riborégulateurs.....  | 28 |
| Figure 5 : Schématisation du contexte génétique de CD2830 et CD2831.....  | 32 |
| Figure 6 : Les domaines putatifs des protéines CD2830 et CD2831.....  | 33 |
| Figure 7 : Constructions finales utilisées dans cette étude des gènes avec les différentes étiquettes.....  | 40 |
| Figure 8 : Constructions des plasmides pDP150 et pDG1661 avec fusions transcriptionnelles des riborégulateurs en amont des gènes CD2830 et CD2831 ..... | 41 |
| Figure 9 : Schématisation du contexte génétique de CD2830 et CD2831.....  | 54 |
| Figure 10 : Expression relative des gènes CD2830 et CD2831.....   | 56 |
| Figure 11 : Activité $\beta$ -galactosidase de la condition contrôle.....   | 57 |
| Figure 12 : Activité $\beta$ -galactosidase de la fusion Rb2830- <i>lacZ</i> .....  | 58 |
| Figure 13 : Activité $\beta$ -galactosidase de la fusion Rb2831- <i>lacZ</i> .....  | 59 |

|  |    |
|--|----|
| Figure 14 : Analyse des fractions cellulaires de la production de CD2830-FLAG dans MD12..... | 62 |
| Figure 15 : Purification de CD2830m et CD2831mHis.....                                       | 63 |
| Figure 16 : Activité de CD2830m recombinante (Zymogramme) .....                              | 66 |
| Figure 17 : Test d'adhésion en plaque de <i>CD2830</i> et <i>CD2831</i> .....                | 68 |
| Figure 18 : Essais d'agrégation de <i>CD2830</i> et <i>CD2831</i> .....                      | 70 |
| Figure 19 : Modèle prédit d'attachement et détachement des protéines CD2830 et CD2831.....   | 80 |

## CHAPITRE 1

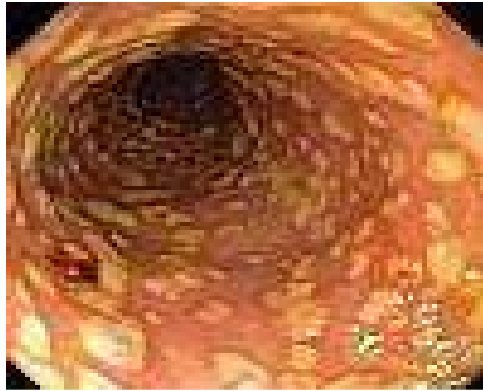
### INTRODUCTION

#### 1.1 *Clostridium difficile* (*Peptoclostridium difficile*)

##### 1.1.1 CDI : Infections reliées à *C. difficile*

À la fin du 19<sup>e</sup> siècle, des études anatomiques avaient mis en évidence une forme sévère de la maladie connue aujourd'hui comme la colite pseudomembraneuse soit des altérations de la pseudomembrane intestinale chez un jeune patient opéré. Toutefois, c'est en 1974 que la colite pseudomembraneuse a pu être associée à la prise d'antibiotique et à l'infection par *C. difficile* (Bartlett, 2008). Un faible pourcentage de porteurs sains existe dans la population, la grande majorité des infections sont acquises à l'hôpital ou dans un établissement de soins de longue durée. *C. difficile* est la principale cause de diarrhée nosocomiale qui est généralement transmise de patient à patient par l'environnement ou le personnel hospitalier sous forme de spores. Les spores vont résister à l'acidité de l'estomac et vont germer en cellules végétatives dans l'intestin suite à l'exposition aux sels biliaires. Ce pathogène opportuniste tire avantage de la perturbation de la microflore normale de l'intestin pour proliférer et coloniser son hôte. *C. difficile* est responsable d'environ 25 % des cas de diarrhée nosocomiale associés à la prise d'antibiotique (Zar *et al.*, 2007). L'étendue des symptômes est très variée, allant d'une diarrhée légère jusqu'à des formes beaucoup plus sévères d'inflammation du côlon comme la colite pseudomembraneuse (figure 1) ou le mégacôlon toxique. La perforation de celui-ci peut alors être fatale. La vancomycine dans les cas plus sévères ou récurrents et le métronidazole sont les antibiotiques utilisés dans le traitement des infections à *C. difficile*. Malheureusement, dans 5-20 % des cas on observe une récurrence de l'infection suite au premier traitement

(Poutanen & Simor, 2004). L'émergence de nouvelles souches plus virulentes, hypertoxiques et multi résistantes, comme la souche épidémique NAP1 Ribotype 027, en font un pathogène de plus en plus redoutable dans plusieurs pays du monde.



**Figure 1** : Colite pseudomembraneuse (Carrion *et al.*, 2010)

### 1.1.2 Épidémiologie

La bactérie *C. difficile* a été décrite pour la première fois en 1935 par Hall et O'Toole dans la flore intestinale de nouveau-nés. *C. difficile* est une bactérie Gram positive anaérobie responsable de plusieurs perturbations intestinales qui a la capacité de former des spores et donc de persister dans l'environnement. Les spores résistent à la chaleur et à une multitude de désinfectants ce qui les rend difficiles à éliminer (Kuijper *et al.*, 2006). *C. difficile* est une bactérie ubiquitaire qui est donc retrouvée dans les sols et également reconnue pour infecter les animaux. Dans la dernière décennie, l'épidémiologie de ce pathogène a évolué rapidement ce qui a poussé plusieurs pays à établir des systèmes de surveillance afin de suivre l'impact et le taux des infections à *C. difficile* CDI (Rupnik *et al.*, 2009). Les méthodes de détection ont également évolué au cours des dernières années pour permettre une détection plus rapide avec une sensibilité accrue (Lessa *et al.*, 2012; Tenover *et al.*, 2010). Bien que les CDI soient contractées dans les établissements de soins hospitaliers, il existe un faible pourcentage de ces infections qui sont acquises dans la communauté en lien ou non avec le milieu hospitalier (Rupnik *et al.*, 2009). En Amérique du Nord, la souche *C. difficile* BI/NAP1/027 a été responsable de plusieurs épidémies dans les

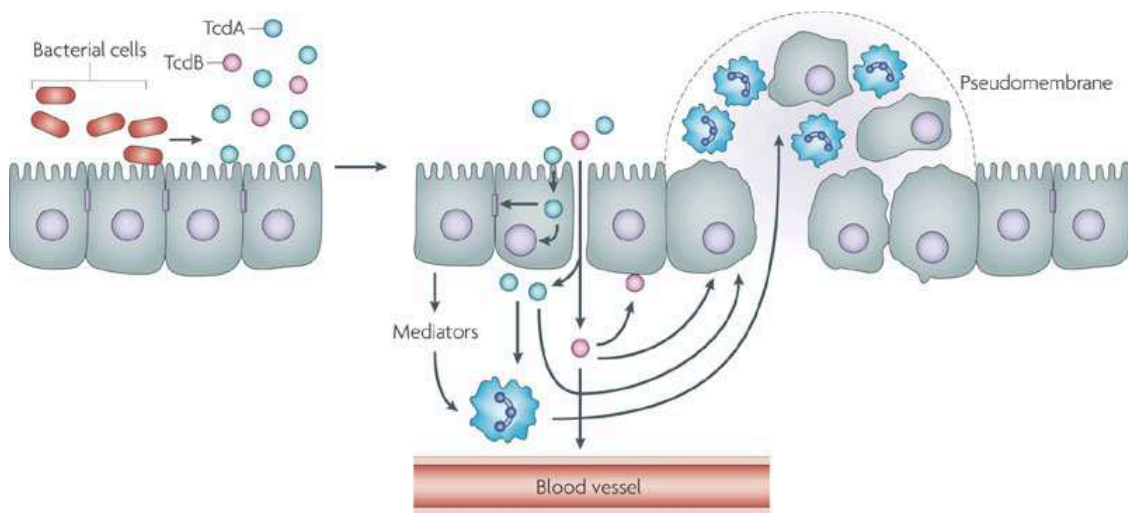


hôpitaux. Toutefois les éclosions à l'échelle mondiale ne sont pas toujours associées à ce ribotype qui est déterminé par le patron de la région intergénique de l'opéron de l'ARN ribosomal présent en copies multiples chez *C. difficile*.

## 1.2 Pathogénèse

La virulence de *C. difficile* est principalement associée aux toxines A et B qui ont été largement étudiées dans les dernières années (Kuehne et al., 2010; Lyras et al., 2009). Cependant, plusieurs autres aspects de la virulence de ce pathogène sont encore bien mal compris. Un bon nombre de protéines font partie de l'arsenal de facteurs de virulence qui joue un rôle au niveau de l'adhésion ou de la dégradation de certaines composantes de la paroi intestinale afin de permettre à la bactérie de coloniser son hôte (Poilane *et al.*, 1998).

Lors d'une infection à *C. difficile*, la majorité des symptômes sont principalement associés aux entérotoxines TcdA et TcdB. Celles-ci une fois relâchées vont causer des lésions aux muqueuses ainsi que de l'inflammation. Environ 75 % des souches pathogènes contiennent les deux toxines. TcdA et TcdB sont internalisées dans les cellules par endocytose. Les toxines seront libérées dans le cytosol suite à l'acidification de l'endosome (Voth & Ballard, 2005). Une fois internalisées, les toxines vont détruire le cytosquelette d'actine, déstabilisent les jonctions serrées et perturbent l'étanchéité de la barrière épithéliale. Tous ces changements vont causer l'accumulation de fluides et la destruction de l'épithélium intestinal (figure 2) (Thelestam & Chaves-Olarte, 2000). Les cellules épithéliales, les mastocytes et les macrophages vont alors relâcher des cytokines. Cette multitude de médiateurs inflammatoires va promouvoir l'abondance des cellules inflammatoires, la sécrétion des fluides, la migration des neutrophiles et par le fait même augmenter l'inflammation de l'intestin en général (Rupnik, et al., 2009).



Rupnik *et al.*, 2009

**Figure 2 : Pathogénèse et action des toxines A et B de *C. difficile***

Les bactéries libres ou attachées aux cellules de l’hôte produisent les toxines TcdA et TcdB. La toxine A va lier le côté apical des cellules tandis que la toxine B va lier préférentiellement la membrane basolatérale des cellules. Suite à l’internalisation des toxines, elles vont provoquer des changements dans le cytosquelette d’actine qui va déstabiliser les jonctions serrées et perturber l’étanchéité de la barrière épithéliale. La destruction des jonctions serrées permet aux toxines de traverser l’épithélium. TcdA et TcdB vont alors induire le relâchement de médiateurs inflammatoires, de phagocytes et de mastocytes qui vont eux, causer de l’inflammation et l’accumulation de neutrophiles. Avec le temps, il peut y avoir formation d’une pseudomembrane.

**1.2.1 Les toxines A et B de *C. difficile***

Les protéines TcdA et TcdB sont des glucosyltransférases. Elles font partie d’une grande famille de toxines clostridiales comme la toxine létale (TcsL) et la toxine hémorragique (TcsH) de *Clostridium sordellii* ou la toxine alpha (TcnA) de *Clostridium novyi* et plusieurs autres (Carter *et al.*, 2010). Ces toxines modifient par glycosylation, les petites protéines

GTPases de la famille Rho. Ces protéines participent à une multitude de fonctions cellulaires entre autres l'organisation du cytosquelette. La glycolysation inactive ces petites protéines régulatrices et perturbe ainsi les voies de signalisation cellulaire. Ces toxines sont codées par les gènes *tcdA* et *tcdB* situés dans le locus de pathogénicité PaLoc de 19,6 Kb (Voth & Ballard, 2005). Ce locus possède également trois autres gènes; *tcdR* qui code pour un facteur sigma alternatif nécessaire pour la production des toxines, *tcdC*, un facteur anti sigma qui interagit directement avec TcdR et *tcdE* qui code pour une protéine holine putative potentiellement impliquée dans le relâchement des toxines (Carter, et al., 2010; Govind & Dupuy, 2012). La toxine B serait essentielle lors de l'infection à *C. difficile* tandis que la toxine A ne le serait pas (Carter *et al.*, 2012; Lyras, et al., 2009).

### 1.2.2 Les facteurs de virulence

Bien que la pathogénèse de *C. difficile* soit majoritairement associée aux toxines TcdA et TcdB, d'autres facteurs sont importants dans l'établissement de ce microorganisme dans le système digestif lors de l'infection et influencent les interactions avec l'hôte. Parmi ces autres facteurs, il a été démontré que certaines protéines extracellulaires jouent un rôle dans ces interactions. Nombre d'études ont démontré l'existence de plusieurs adhésines ou autres protéines qui permettent à *C. difficile* d'adhérer aux cellules épithéliales (Eveillard *et al.*, 1993). L'adhésion aux cellules de l'hôte est importante pour l'expression des facteurs de virulence chez plusieurs pathogènes. L'adhésion de *C. difficile* aux cellules humaines intestinales a été observée pour la première fois en 1979 sur des spécimens de biopsie lavés obtenus de patients qui étaient atteints de colite pseudomembraneuse (Borriello, 1998). Parmi les protéines étudiées dans les dernières années, il a été démontré que *C. difficile* exprime un grand nombre de protéines de surface (*SLP*) qui sont importantes chez plusieurs autres pathogènes dans un contexte d'infection (Calabi *et al.*, 2002). Compte tenu de leur abondance et de leur localisation à la surface des bactéries, les protéines *SLPs* pourraient être impliquées dans les processus d'interactions avec l'hôte nécessaires pour l'infection (Sára & Sleytr, 2000). La protéine de surface Cwp66 présente une homologie importante

avec les protéines de surface *SLPs* et fait partie d'un locus génétique qui contient également les gènes qui codent pour les protéines précurseurs des S-layer (Calabi *et al.*, 2001; Karjalainen *et al.*, 2001). Waligora *et al.*, (2001) ont démontré que la protéine Cwp66 a deux domaines structuraux dont un domaine d'ancrage à la membrane en N-terminal et possède également des propriétés d'adhésion. Cette adhésion cellulaire est grandement perturbée lorsque des anticorps se lient au domaine N-terminal de la protéine et empêchent la fixation de la protéine Cwp66 à la paroi cellulaire.

Chez plusieurs bactéries, les protéases sont reconnues comme des facteurs de colonisation ou de virulence importants entre autres comme les protéases cystéines produites par *Streptococcus pyogenes* et *Staphylococcus aureus* (Lukomski *et al.*, 1999; Shaw *et al.*, 2004). L'activité des protéases bactériennes sur les tissus de l'hôte peut contribuer à la destruction et à la nécrose de l'épithélium intestinal (Janoir *et al.*, 2007). Ces protéases situées à la surface pourraient également interagir avec la matrice extracellulaire (MEC) de l'hôte. Une étude a démontré que la protéase Cwp84 de *C. difficile* a une activité protéolytique sur la fibronectine et dégrade la vitronectine et la laminine. Cette activité perturbe l'intégrité des tissus de l'hôte et facilite même la diffusion des toxines (Janoir, *et al.*, 2007).

Outre les protéines de la paroi cellulaire (CWPs pour *cell wall proteins*), les protéines de flagelles, FliC et FliD, seraient impliquées dans l'attachement de *C. difficile* à la muqueuse intestinale (Tasteyre *et al.*, 2001). FliD aurait un rôle dans l'adhésion comme les nombreuses adhésines codées par ce pathogène, en plus de son rôle connu dans la motilité et la formation de biofilm (Dingle *et al.*, 2011; Twine *et al.*, 2009).

Plusieurs patients ont développé des anticorps contre les protéines FliC, FliD, Cwp84 et le domaine C-terminal de Cwp66. Également, l'expression de toutes ces protéines chez *C. difficile* a été observée lors d'infection (Péchiné *et al.*, 2005). L'adhésion de *C. difficile* à des cultures de cellules épithéliales suggère l'existence de plusieurs adhésines impliquées dans ce processus. Les protéines de surfaces pourraient alors jouer un rôle dans l'initiation

de la colonisation, mais également dans la réponse inflammatoire de la cellule hôte (Calabi, et al., 2002).

La protéine de liaison à la fibronectine (FbpA) de *C. difficile* est une autre adhésine qui a été étudiée pour son rôle potentiel dans la colonisation intestinale lors de l'infection. Une étude effectuée par Barketi-Klai *et al.* (2011) suggère que FpbA a un rôle mineur, mais non négligeable dans l'adhésion des bactéries aux cellules de l'hôte et pourrait partager ce rôle avec d'autres adhésines exprimées chez *C. difficile*. Des approches génomiques plus vastes ont identifié plusieurs autres protéines avec des fonctions d'adhésion prédites. Des protéines sécrétées avec différents domaines prédits, comme des domaines de liaison au collagène ou encore des activités protéolytiques ont également été identifiées (Boetzkes *et al.*, 2012).

### **1.3 Le 3'5' diguanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP)**

#### **1.3.1 Le c-di-GMP**

Le *bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate* ou c-di-GMP est un messager secondaire bactérien presque ubiquitaire. En 1987, l'équipe de Moshe Benziman a isolé et caractérisé pour la première fois le c-di-GMP en menant des études sur la synthèse de la cellulose chez *Gluconacetobacter xylinus* (ou anciennement *Acetobacter xylium*) (Ross *et al.*, 1987). Chez la bactérie *G. xylinus*, le c-di-GMP régule la production de cellulose en activant de façon allostérique, le complexe membranaire de la cellulose synthase (D'Argenio & Miller, 2004). Les niveaux de c-di-GMP intracellulaires sont contrôlés par des protéines possédant des domaines GGDEF et EAL (Tal *et al.*, 1998). Dans plusieurs bactéries, le c-di-GMP est impliqué dans la régulation de processus biologiques complexes tels que la virulence ou la formation de biofilm (Römling & Amikam, 2006). Par exemple, chez *Vibrio cholerae* la protéine VieA possède un domaine CheY-EAL-HTH qui régule

positivement l'expression des gènes de virulence *toxT* (un régulateur transcriptionnel) et *ctxAB* (toxine du choléra), puis négativement la production d'exopolysaccharides et la formation de biofilm (Ryan *et al.*, 2006).

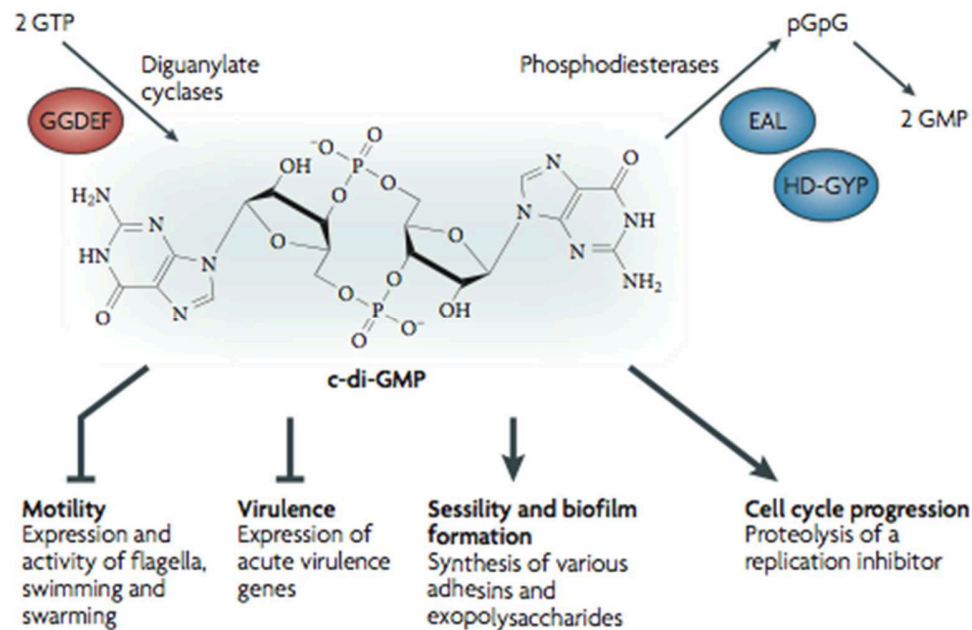
### 1.3.2 La synthèse et la dégradation du c-di-GMP

Les nucléotides cycliques sont des messagers secondaires répandus dans les différents domaines du vivant, mais le c-di-GMP est une molécule retrouvée exclusivement chez les Eubactéries (Römling *et al.*, 2005; Simm *et al.*, 2004). Les niveaux intracellulaires de c-di-GMP sont contrôlés par l'activité antagoniste de deux enzymes; les dyguanylates cyclases (DGC) qui le synthétisent et les phosphodiésterases (PDE) qui le dégradent (figure 3).

Les DGC catalysent la synthèse du c-di-GMP à partir de deux molécules de GTP liées à chacune de ses sous-unités puis libèrent du pyrophosphate. En général, une DGC active est composée d'un dimer de deux sous-unités qui contiennent un domaine GGDEF contenant le motif catalytique GG[D/E]EF hautement conservé. Le site actif A des protéines DGC est situé à l'interface entre les deux sous-unités et correspond au motif GGDEF du domaine dont le nom réfère à sa séquence conservée d'acides aminés Gly-Gly-Asp-Glu-Phe (Chan *et al.*, 2004; Paul *et al.*, 2004). Une mutation dans ce motif supprime l'activité enzymatique à l'exception de l'acide aspartique (D) qui peut être remplacé par un résidu d'acide glutamique (E) sans perturber l'activité de la DGC (Malone *et al.*, 2007). La plupart des DGC peuvent être inactivées par inhibition allostérique par la liaison du c-di-GMP au site secondaire composé du motif RXXD séparé par cinq acides aminés du site actif (Römling *et al.*, 2005).

Les phosphodiésterases catalysent la dégradation du c-di-GMP en molécule linéaire intermédiaire 5'pGpG, puis en deux molécules de GMP. Les protéines PDE peuvent être de deux types : elles contiennent soit un domaine EAL ou soit un domaine HD-GYP. L'activité catalytique des protéines contenant un domaine EAL nécessite du  $Mg^{2+}$  ou du  $Mn^{2+}$ , mais est inhibée par le  $Ca^{2+}$  et le  $Zn^{2+}$ . Le nom du domaine EAL provient de sa séquence en acides aminés conservés Glu-Ala-Leu (Schmidt *et al.*, 2005). Le domaine HD-GYP est présent chez les protéines d'un sous-groupe d'une grande famille de phosphohydrolases métal-dépendante non reliées aux protéines avec un domaine EAL. Les acides aminés His-Asp-Gly-Tyr-Pro constituent la séquence conservée du motif HD-GYP (Schirmer & Jenal, 2009).

La présence des domaines GGDEF, EAL et HD-GYP dans un grand nombre de protéines codées par une multitude de génomes bactériens suggère un rôle important du c-di-GMP dans la transduction de signaux (Galperin, 2004). Ces domaines sont impliqués dans toutes les voies de signalisation impliquant le c-di-GMP comme second messager (Wolfe & Visick, 2008). Il a été démontré que chez plusieurs protéobactéries, la synthèse d'exopolysaccharide est affectée par la surexpression de protéines avec une activité DGC ou par des mutations dans le motif GGDEF de telles protéines. Plusieurs études mettent en évidence l'implication du c-di-GMP dans le contrôle de plusieurs processus biologiques important chez les bactéries. Chez *V. cholerae* le c-di-GMP contrôle la formation de biofilm, mais semble également avoir un effet sur l'expression des facteurs tels que la toxine CT (*Cholera toxin*) (Pratt, Tamayo, Tischler, & Camilli, 2007). Chez *Shewanella woodyi*, SwGDC est une protéine hybride contenant les domaines GGDEF et EAL et possède l'activité d'une DGC et d'une PDE (Liu *et al.*, 2010).



**Figure 3 :** Structure et fonction physiologique du c-di-GMP

Le niveau intracellulaire de c-di-GMP est contrôlé par des diguanylates cyclases (DGC) possédant un domaine GGDEF (en rouge) et par des phosphodiesterases (PDE) possédant un domaine EAL ou HD-GYP (bleu). Il est synthétisé à partir de deux molécules de GTP par les DGC et dégradé par les PDE avec un domaine EAL en pGpG ou en 2 GMP par les PDE avec un domaine HD-GYP. Via différents récepteurs, le c-di-GMP peut réguler positivement ou négativement plusieurs processus biologiques. Par exemple chez *Pseudomonas aeruginosa* il peut réduire la motilité en diminuant l'expression des flagelles. De faibles niveaux de c-di-GMP favorisent l'expression de facteurs de virulence. Tandis que des niveaux élevés favorisent la formation de biofilm ou la progression du cycle cellulaire chez *Caulobacter crescentus*. Tirée de (Hengge, 2009).



### 1.3.3 L'implication du c-di-GMP chez *C. difficile*

Chez *C. difficile*, 37 protéines possèdent les domaines impliqués dans synthèse et la dégradation du c-di-GMP. Même si toutes les protéines qui contiennent les domaines GGDEF ou EAL ne possèdent pas une activité DGC ou PDE, la présence d'un tel nombre de ces domaines suggère une implication importante du c-di-GMP dans les processus biologiques de *C. difficile* (Bordeleau *et al.*, 2011).

L'étude du c-di-GMP chez *C. difficile* a permis à ce jour de démontrer entre autres son rôle dans la motilité. Des niveaux élevés de c-di-GMP chez *C. difficile* induisent l'agrégation des cellules et suggèrent que le c-di-GMP a un rôle dans la formation de biofilm. Chez *C. difficile* comme chez plusieurs autres espèces bactériennes, le c-di-GMP régule inversement l'agrégation et la motilité suggérant que le c-di-GMP pourrait jouer un rôle important dans la pathogenèse (Purcell *et al.*, 2012).

D'autres études suggèrent même une implication du second messager au niveau de la régulation des gènes des toxines par l'entremise de SigD, un orthologue du facteur Sigma alternatif de flagelle chez *Salmonella* (FliA;  $\sigma^{28}$ ). La liaison du c-di-GMP au riborégulateur Cd1 en région 5' UTR de l'opéron *flgB*, qui inclut *sigD*, inhibe son expression. SigD ne peut donc pas activer l'expression de l'opéron lorsqu'il y a des concentrations élevées de c-di-GMP (McKee *et al.*, 2013). Comme SigD active l'expression de *tcdR*, l'augmentation de c-di-GMP intracellulaire inhibe la production de toxines. L'augmentation du niveau de c-di-GMP durant l'infection de *C. difficile* pourrait alors réduire la production des toxines TcdA et TcdB (McKee *et al.*, 2013). Chez plusieurs bactéries, cette molécule est impliquée dans différents mécanismes qui entourent la régulation. Chez *C. difficile*, le c-di-GMP est un facteur important dans la régulation de processus physiologiques essentiels (McKee *et al.*, 2013).

### 1.3.4 Les récepteurs du c-di-GMP

Bien que depuis moins d'une dizaine d'années on comprenne un peu plus les mécanismes entourant la régulation des niveaux de c-di-GMP intracellulaire, il en reste beaucoup à étudier quant aux récepteurs capables de lier celui-ci et ses mécanismes. Le c-di-GMP agit comme second messenger en liant de façon allostérique des enzymes ou d'autres protéines qui possèdent des récepteurs spécialisés afin de pouvoir moduler différents phénotypes (Schirmer & Jenal, 2009). Cette molécule a également la capacité de lier des structures d'ARN appelés riborégulateurs qui contrôlent l'expression d'une diversité de gènes responsables de changements physiologiques entraînés par l'augmentation ou la diminution du niveau intracellulaire de c-di-GMP (Shanahan *et al.*, 2011).

Le c-di-GMP est également capable de lier les domaines GGDEF et EAL dégénérés qui n'ont pas d'activité catalytique. Une rétro-inhibition allostérique via le site I du domaine GGDEF des DGC a également été observée lorsque le c-di-GMP y est lié (Christen *et al.*, 2006; Jenal & Malone, 2006). Chez *C. crescentus* par exemple, la protéine CC3396 possède les domaines GGDEF-EAL, mais le motif GGDEF est non actif et ne permet donc pas la synthèse de c-di-GMP. Toutefois, ce domaine est capable de lier le GTP ce qui active le domaine EAL, également présent dans la protéine, et permet l'hydrolyse du c-di-GMP (Christen *et al.*, 2005; Ryan, *et al.*, 2006). Chez *Pseudomonas fluorescens* la protéine LapD possède les domaines GGDEF et EAL mais ne possède aucune activité enzymatique. Elle est toutefois capable de lier le c-di-GMP à son domaine EAL (Newell *et al.*, 2009).

Le récepteur le plus étudié est le domaine PilZ qui est présent dans une variété de génomes bactériens et présente un patron phylogénétique similaire aux domaines GGDEF des DGC et EAL des PDE responsables de la synthèse et de la dégradation du c-di-GMP (Amikam & Galperin, 2006). Les protéines qui contiennent un domaine PilZ sont très variées. Le domaine PilZ a été identifié dans des protéines qui contiennent les domaines GGDEF et

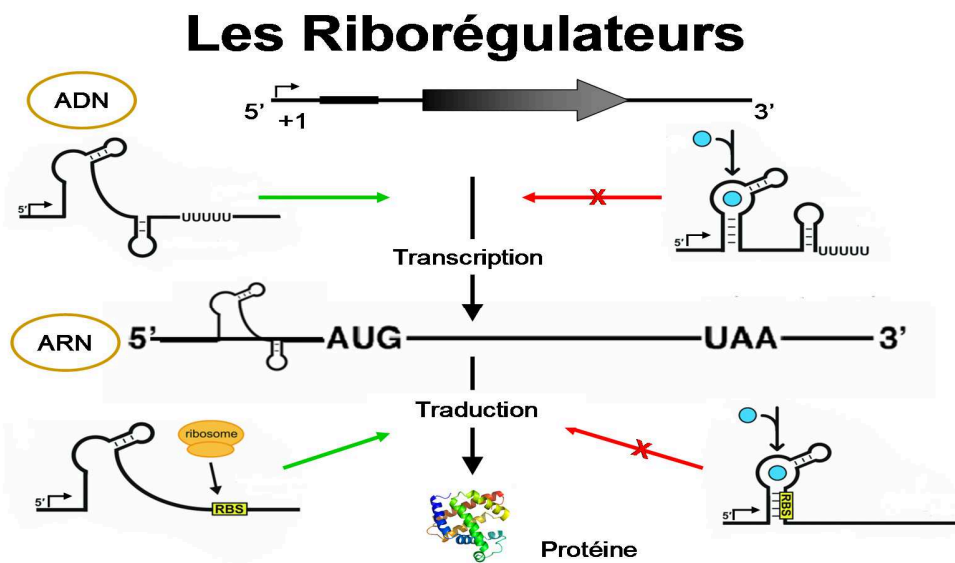
EAL, domaine de liaison à l'ADN Hélice-tour-Hélice et plusieurs interactions protéine-protéines (Amikam & Galperin, 2006). Elles peuvent être formées seulement du domaine ou contenir plusieurs autres domaines qui leurs permettent d'assurer leurs fonctions. Par exemple, la protéine YcgR (le frein du flagelle) chez *E. coli*, lie le domaine PilZ à une protéine YcgR-N. Le domaine PilZ va alors lier un c-di-GMP à cette interaction protéine-protéine déjà présente et causer ainsi un changement dans la structure de la protéine ce qui va lui permettre d'interagir avec la machinerie des flagelles (Mills *et al.*, 2011; Ryjenkov *et al.*, 2006). La liaison du c-di-GMP au domaine PilZ permet la régulation de plusieurs facteurs de virulences par exemple et permet aussi le contrôle de différents phénotypes tels que la formation de biofilm (Schirmer & Jenal, 2009; Wolfe & Visick, 2008).

En plus de protéines contenant des domaines GGDEF et EAL, ou PilZ, d'autres protéines sont capables de lier le c-di-GMP. La protéine Clp de *Xanthomonas campestris*, un homologue de la protéine Crp qui est un récepteur de l'AMP cyclique, est capable de lier le c-di-GMP. La liaison de la protéine Clp au c-di-GMP permet de moduler l'expression de plusieurs gènes de virulence de cette bactérie (Chin *et al.*, 2010). La protéine FleQ est un autre exemple d'une protéine qui lie le c-di-GMP sans posséder les domaines GGDEF/EAL ou PilZ. Chez *P. aeruginosa*, la liaison du c-di-GMP à FleQ permet la transcription de gènes impliqués dans la synthèse d'exopolysaccharides en levant la répression de l'expression (Hickman & Harwood, 2008).

### **1.3.5 Les riborégulateurs**

Chez certaines bactéries, le c-di-GMP est impliqué dans le contrôle de la régulation de l'expression de gènes via la liaison à des récepteurs à ARN, les riborégulateurs. Les riborégulateurs sont des ARN non codant localisés dans la partie 5'UTR d'un ARN messager et régulent l'expression des gènes en aval (figure 4). Les riborégulateurs sont généralement composés de deux structures soit l'aptamère qui a la particularité de pouvoir

lier de façon très sélective une petite molécule appelée le ligand ainsi que la plateforme d'expression. Les riborégulateurs ont une variété de ligands possibles tels que des acides aminés, des hydrates de carbone comme la glucosamine 6-phosphate, des coenzymes comme la flavine et plusieurs autres (Bastet *et al.*, 2011). Parmi les ligands, il y a également les nucléotides et leurs dérivés comme le c-di-GMP. La liaison du ligand à l'aptamère va provoquer un changement de la conformation de la plateforme d'expression du riborégulateur et produire un changement dans l'expression génétique (Breaker, 2008). Lors de ce changement structurel, la formation de tiges terminatrices ou antiterminatrices dans la plateforme d'expression va réguler la transcription. Le changement de conformation peut également séquestrer le site de liaison du ribosome RBS et alors empêcher la traduction.



**Figure 4** : Exemple d'une régulation transcriptionnelle et traductionnelle de riborégulateurs

Les riborégulateurs sont des séquences d'ARN retrouvées dans la région 5' non codante d'un gène. Certains riborégulateurs vont former une tige terminatrice lorsque leur ligand va lier l'aptamère et provoquer un changement de conformation. La tige terminatrice va donc empêcher la transcription de se poursuivre. D'autres riborégulateurs vont subir des

changements de conformation lors de la liaison de leur ligand à l'aptamère qui va séquestrer le RBS et donc empêcher la traduction de la protéine.

L'équipe de Sudarsan *et al.* (2008) avait proposé que la régulation transcriptionnelle et traductionnelle de plusieurs gènes semblait impliquer un riborégulateur capable de lier le c-di-GMP. Les riborégulateurs à c-di-GMP ont entre autres été décrits chez *V. cholerae*. Vc2 est un riborégulateur en amont du gène VC1722 qui code pour une protéine de *V. cholerae* potentiellement impliquée dans la compétence naturelle (Lee *et al.*, 2010; Sudarsan *et al.*, 2008). Lee *et al.* (2010) ont également identifié un riborégulateur à c-di-GMP retrouvé principalement chez les bactéries anaérobiques à Gram positif de la famille des Clostridies avec un rôle potentiel au niveau de la transcription des gènes en aval.

Chez *C. difficile*, 16 riborégulateurs à c-di-GMP ont été prédits certains en amont de gènes de fonctions connues et d'autres inconnues (Tableau 1). Parmi ces riborégulateurs deux types qui diffèrent structurellement ont été décrits : les riborégulateurs à c-di-GMP-I et c-di-GMP-II. En plus de différer structurellement il a également été proposé que leur régulation soit également différente pour certains riborégulateurs. Certains des riborégulateurs à c-di-GMP prédits chez *C. difficile* semblent réguler la transcription des gènes en aval de façon positive en concentration intracellulaire de c-di-GMP élevée alors que d'autres auraient plutôt un effet négatif sur la transcription avec les mêmes conditions (Soutourina *et al.*, 2013).

**Tableau 1.** Riborégulateurs à c-di-GMP prédits et gènes en aval chez *C. difficile* 630

| Riborégulateur | Coordonnées <sup>2</sup> |         | Gène <sup>3</sup>                    | Distance<br>(pb) | Annotation <sup>5</sup>            |
|----------------|--------------------------|---------|--------------------------------------|------------------|------------------------------------|
|                | 5'                       | 3'      |                                      |                  |                                    |
| c-di-GMP-I     |                          |         |                                      |                  |                                    |
| Cdi1_1         | 2296528                  | 2296435 | CD630_19900                          | 82               | Protéine putative avec domaine SH3 |
| Cdi1_2         | 3266964                  | 3266879 | CD630_27970                          | 123              | Protéine d'adhésion putative       |
| Cdi1_3         | 308777                   | 308867  | <i>flgB</i><br>(CD630_02450)         | 405              | Protéine de la base du flagelle    |
| Cdi1_4         | 3379980                  | 3380075 | AS : CD630_28890                     | 202              | Protéine de phage hypothétique     |
| Cdi1_5         | 1142665                  | 1142570 | AS : CD630_09771                     | 202              | Protéine de phage hypothétique     |
| Cdi1_6         | 2285922                  | 2286011 | VBICloDif38397_2<br>078 <sup>4</sup> | 52               | Protéine hypothétique              |
| Cdi1_7         | 2907225                  | 2907322 | AS: CD630_25171                      | 852              | Protéine de phage hypothétique     |
| Cdi1_8         | 2297491                  | 2297588 | CD630_19903                          | 54               | Protéine hypothétique              |
| Cdi1_9         | 2671808                  | 2671897 | CD630_23090                          | 53               | Protéine hypothétique              |
| Cdi1_10        | 1653917                  | 1653821 | CD630_14240                          | 229              | Protéine hypothétique              |
| Cdi1_11        | 3936239                  | 3936335 | CD630_33682                          | 53               | Protéine hypothétique              |
| Cdi1_12        | 3303460                  | 3303375 | <i>zmp1</i><br>(CD630_28300)         | 99               | Zinc métalloprotéase               |
| c-di-GMP-II    |                          |         |                                      |                  |                                    |
| Cdi2_1         | 3801149                  | 3801064 | CD630_32460                          | 581              | Protéine de surface                |
| Cdi2_2         | 3826693                  | 3826610 | CD630_32670 à<br>32650               | 580              | Système à 2 composants             |
| Cdi2_3         | 3306767                  | 3306682 | CD630_28310                          | 117              | Adhésine putative                  |
| Cdi2_4         | 4105882                  | 4105797 | <i>pilA1</i>                         | 161              | Piline de pili de type IV          |

<sup>1</sup> : Les riborégulateurs sont nommés tel que proposé par (Soutourina *et al.*, 2013) et (Sudarsan *et al.*, 2008) (Cd1).

<sup>2</sup> : Coordonnées des aptamères des riborégulateurs c-di-GMP telles que répertoriées dans la banque Rfam 11.0 (Burge *et al.*, 2013) dans le génome de *C. difficile* 630 (Genbank, AM180355.1) (Benson *et al.*, 2013).

<sup>3</sup> : Seuls les gènes à moins de 1000 pb de l'aptamère sont indiqués. AS : antisens par rapport au 3' de l'aptamère.

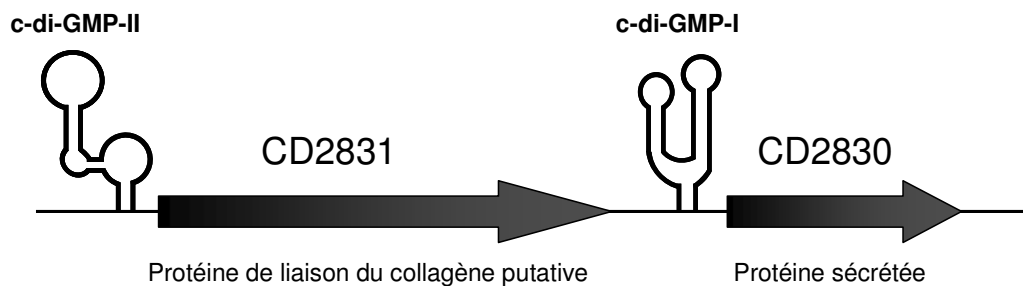
<sup>4</sup> : Gène annoté dans la banque PATRIC (Snyder *et al.*, 2007) (absent de Genbank AM180355.1)

#### 1.4 Hypothèses et objectifs

Parmi les gènes en aval des riborégulateurs prédits chez *C. difficile*, un locus composé de deux gènes de fonction inconnue a attiré notre attention par la présence de deux types de riborégulateurs et la courte distance entre les deux gènes. Nous avons donc posé l'hypothèse que l'expression de CD2830 et CD2831 est régulée par deux riborégulateurs c-di-GMP. Des études effectuées par les groupes de Sudarsan *et al.* (2008) et de Soutourina *et al.* (2013) nous suggèrent également que la régulation de ces gènes soit effectuée de façon opposée au niveau transcriptionnel.

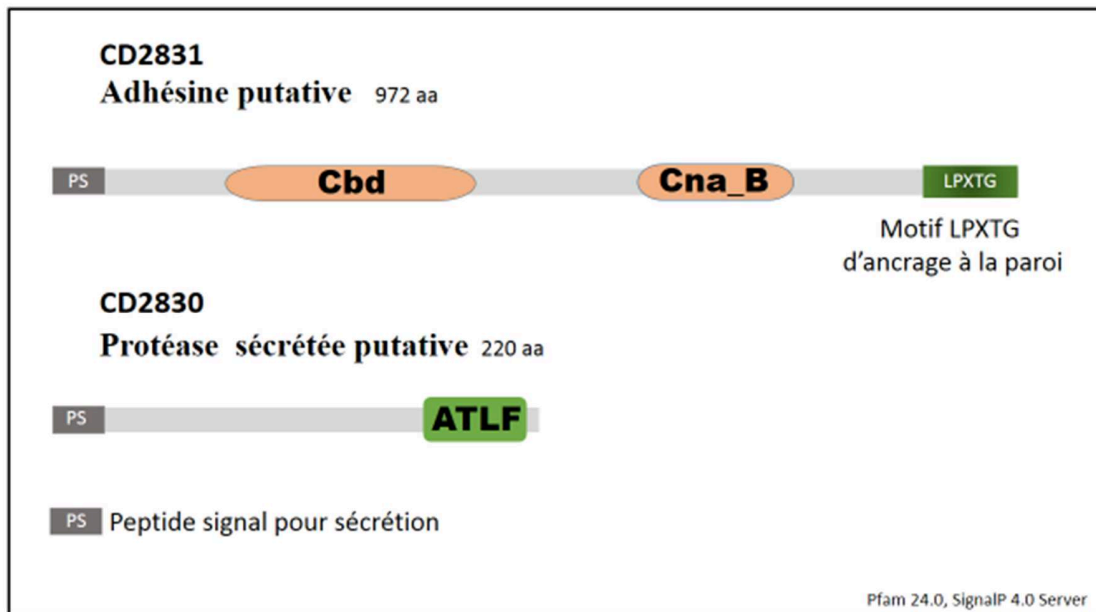
La fonction prédite pour chaque protéine est également intéressante. L'hypothèse de départ suggérait (d'après SUPFAM) que la protéine CD2830 présente dans la souche *C. difficile* 630, serait une protéine sécrétée contenant un domaine zinc-métalloprotéase (Pruitt *et al.*, 2007). Cette hypothèse est supportée par une modélisation tridimensionnelle de CD2830 effectuée par Eric Bordeleau (étudiant gradué, membre du laboratoire du Pr Burrus, université de Sherbrooke) et sur les données de cristallographie de la partie catalytique C-terminale de la toxine LF (lethal factor) de *Bacillus anthracis* (Pannifer *et*

*al.*, 2001), qui démontrent que les acides aminés importants pour la coordination du zinc, identifiés chez LF, sont conservés et bien orientés dans la protéine CD2830. Le contexte génétique, un locus composé des gènes CD2831 et CD2830 (figure 5), nous a logiquement amenés à porter notre attention sur la protéine CD2831 et à examiner le rôle de cette protéine. Si l'hypothèse de départ se confirme, la zinc-métalloprotéase (CD2830) pourrait cibler le collagène des protéines présentes dans la matrice extracellulaire ou encore la protéine CD2831 qui code pour une protéine putative qui contient un domaine de liaison au collagène et un motif d'ancrage à la paroi cellulaire LPXTG (figure 6). Également, la proximité (370 pb) de ces deux gènes supposerait une coévolution, suggérant donc que leur fonction est liée. La protéine de liaison au collagène putative CD2831 pourrait être exprimée lors de la colonisation de l'hôte, afin de se lier à une protéine de l'hôte présente dans le mucus ou la matrice extracellulaire de l'épithélium. Suite à cette liaison et aux conditions favorables la zinc-métalloprotéase, CD2830 pourrait être exprimée sous le contrôle du c-di-GMP. Une fois sécrétée, CD2830 pourrait aller cliver ou dégrader les protéines d'attachement (CD2831 ou autres) pour permettre le détachement.



**Figure 5** : Schématisation du contexte génétique de CD2830 et CD2831





**Figure 6** : Les domaines putatifs des protéines CD2830 et CD2831

Chacune des protéines possède en N-terminal, un peptide signal de sécrétion. L'adhésine putative CD2831 a un motif LPXTG en C-terminal qui permet un clivage protéolytique et l'ancrage à la paroi cellulaire. Il contient également deux domaines prédits, soit un domaine de liaison au collagène (Cbd) et un domaine de protéine Cna de type B (Cna\_B) présent dans les protéines de liaison au collagène. La protéase sécrétée putative CD2830 possède un domaine catalytique ATLF apparenté au facteur létal (LF) une toxine produite par *B. anthracis*.

En résumé, les hypothèses émises au départ de ce projet de recherche étaient les suivantes :

- A) La protéine putative CD2831 a un rôle dans l'adhésion cellulaire chez *C. difficile*.
- B) La protéine CD2830 est une zinc-métalloprotéase extracellulaire impliquée dans la dégradation de protéines extracellulaires ou de CD2831.
- C) Le c-di-GMP régule l'expression de CD2830 via un riborégulateur à c-di-GMP de type I.
- D) Le c-di-GMP régule l'expression de CD2831 via un riborégulateur à c-di-GMP de type II.

Les objectifs étaient :

- 1) Déterminer la régulation de l'expression des gènes CD2830 et CD2831 par des riborégulateurs c-di-GMP prédits de *C. difficile*.
- 2) Déterminer la fonction et évaluer l'importance des protéines CD2830 et CD2831 chez *C. difficile*.

## CHAPITRE 2

### MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 2.1 Souches, plasmides et milieux de culture

Les souches et plasmides utilisés au cours de cette étude sont répertoriés dans le tableau 2. Les souches d'*E. coli* et de *B. subtilis* ont, comme c'est habituellement le cas, été incubées dans du milieu Luria-Bertani commercial (LB Miller, EMD Millipore) à 37 °C avec agitation à 225 rpm. Pour la production de la protéine CD2830 dans *E. coli* BL21, du milieu YTA (16 g/L Tryptone, 10 g/L extrait de levure, 5 g/L NaCl) a été utilisé. Plusieurs milieux ont été testés pour la transformation de *B. subtilis*, mais au final, ce sont les milieux SM1 et SM2 décrits dans le protocole de transformation de Vojcic *et al.* (2012) qui ont été utilisés. Le BHI (*Brain Heart Infusion*, BD Bacto) et le BHIS, soit du BHI avec 5g/L d'extrait de levure et 0,1 % de cystéine, ont été utilisés pour les cultures de *C. difficile* incubées à 37 °C en chambre anaérobie (*Coy Laboratory Products*) dans une atmosphère de 90 % N<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, et 5 % H<sub>2</sub>. L'induction des plasmides pGEX-6P1, pTRCHisB, pMutin-FLAG, pDP150 ainsi que leurs dérivés respectifs, a été effectuée avec une concentration finale de 0,5 ou de 1 mM d'IPTG (*Isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside*, Amersham Biosciences). Les plasmides pDccA et pDccAmut ont été induits avec une concentration finale de 1 µg/mL de nisine (2,5 % w/w, MP Biomedicals). Les antibiotiques ont été utilisés aux concentrations suivantes : ampicilline (Amp) 100 µg/ml; chloramphénicol (Cm), 5 µg/mL pour les cultures de *B. subtilis* ou 20 µg/mL pour les cultures d'*E. coli*; spectinomycine (Sp), 100 µg/mL; Erythromycine (Er), 1 µg/mL; norfloxacine (Nor), 12 µg/mL; thiamphénicol (Tm), 10 µg/mL; streptomycine (Sm) 200 µg/mL.

**Tableau 2** Souches et plasmides utilisés lors de cette étude

| Souches                      | Description  | Référence ou source                          |
|------------------------------|--|--|
| <i>Escherichia coli</i>      |  |  |
| Top 10                       | F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> $\Delta$ <i>lacX74</i><br><i>recA1 araD139 araD139</i> $\Delta$ ( <i>araleu</i> )7697<br><i>galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i> | Invitrogen                                   |
| CA434                        | HB101 avec plasmide conjugatif R702  | (Purdy et al., 2002)                         |
| BL21                         | F- <i>dcm ompT hsdS</i> ( $r_B^-$ $m_B^-$ ) <i>gal</i> [malB <sup>+</sup> ] <sub>K-12</sub> ( $\lambda^S$ )  | Stratagene                                   |
| MC1061                       | F-, $\Delta$ ( <i>araA-leu</i> )7697, [ <i>araD139</i> ]B/r, $\Delta$ ( <i>codB-lacI</i> )3,<br><i>galK16, galE15(GalS),</i> $\lambda^-$ , <i>e14-</i> , <i>mcrA0</i> ,<br><i>relA1, rpsL150(strR), spoT1, mcrB1, hsdR2</i>    | (Casadaban & Cohen, 1980)                    |
| <i>Bacillus subtilis</i>     |  |  |
| MW10                         | <i>his nrpR2 nrpE18</i> $\Delta$ <i>aprA3</i> $\Delta$ <i>eglS102</i> $\Delta$ <i>bglT</i> $\Delta$ <i>bglSRV</i>  | (Wolf, Geczi, Simon, & Borriess, 1995)       |
| MD12                         | MW10 <i>amyE::CD2830-FLAG</i> (Er)   | cette étude                                  |
| MD23                         | MW10 <i>thrC::CD2830-FLAG</i> (Er)   | cette étude                                  |
| 168                          | <i>trpC2</i>   | (Burkholder et Giles, 1947)                  |
| MD35                         | 168 <i>thrC::CD2830-FLAG</i> (Er)  | cette étude                                  |
| MO1813                       | <i>trpC2 pheA1 amyE::cat</i> (Cm)  | (Guérout-Fleury, Frandsen, & Stragier, 1996) |
| MD36                         | MO1813 <i>amyE::cat</i> (Cm) <i>thrC::CD2830-FLAG</i> (Er)   | cette étude                                  |
| EB194                        | Dérivé de MO1099; <i>amyE::RBS-lacZ-cat</i> (Cm)   | cette étude                                  |
| EB196                        | Dérivé de MO1099; <i>amyE::Rb2830-RBS-lacZ-cat</i> (Cm)  | cette étude                                  |
| EB198                        | Dérivé de MO1099; <i>amyE::Rb2831-RBS-lacZ-cat</i> (Cm)  | cette étude                                  |
| <i>Clostridium difficile</i> |  |  |
| 630 $\Delta$ <i>erm</i>      | souche sauvage   | (Hussain, Roberts, & Mullany, 2005)          |
| CD2830                       | 630 $\Delta$ <i>erm</i> CD2830 ::Intron 465a (Er)  | cette étude                                  |
| CD2831                       | 630 $\Delta$ <i>erm</i> CD231::Intron 1656s (Er)   | cette étude                                  |
| Plasmides                    |  |  |
| pGEX-6P1                     | Ap <sup>R</sup> , IPTG-inducible glutathione S-transferase<br>gene fusion vector   | GE Healthcare                                |
| pGCD2830m                    | CD2830m tag GST  | cette étude                                  |
| pTrcHisB                     |  | Invitrogen                                   |
| pTrcHisB-CD2831m             | CD2831-Histag  | cette étude                                  |
| pDG1661                      | <i>amyE'</i> ...'amyE <i>spoVG-lacZ</i> (Sp, Cm)   | (Guérout-Fleury, et al., 1996)               |
| pDG1661-Rb2830               |  | cette étude                                  |

|                            |   |   |
|----------------------------|---|---|
| pDG1661-Rb2831             |   | cette étude                             |
| pMutin-FLAG                | FLAG-Tag $P_{Spac}$   | (Kaltwasser, Wiegert, & Schumann, 2002) |
| pMutin-FLAG-CD2830         |   | cette étude                             |
| pMMD-2                     | $P_{Spac}$ amyE' CD2830-FLAG (Sp, Er)   | cette étude                             |
| pDP150                     | dérivé de pDR111, site d'intégration <i>thrC</i> , promoteur IPTG inductible Phyper-spank | (Kearns & Losick, 2005)                 |
| pDP150-CD2830-FLAG         |   | cette étude                             |
| pDP150-DccA                | DGC DccA  | cette étude                             |
| pDP150-DccA <sup>mut</sup> | DGC DccA <sup>mut</sup>   | cette étude                             |
| pMTL007C-E5-CD2830-465a    | plasmide de clostron pMTL007 avec Intron spécifique                                       | cette étude                             |
| pMTL007-E5-CD2831-1656s    | plasmide de clostron pMTL007 avec Intron spécifique                                       | cette étude                             |
| pDccA                      | CD1420  | (Purcell, et al., 2012)                 |
| pDccA <sup>mut</sup>       | CD1420 <sup>mut</sup>   | (Purcell, et al., 2012)                 |

---

## 2.2 Construction des plasmides

Les amorces utilisées pour la construction des plasmides sont décrites dans le tableau 3. Pour la production et la purification de la protéine CD2830 (figure 6), le gène a d'abord été amplifié par PCR sans la séquence codant pour le peptide signal à partir de l'ADN génomique de *C. difficile* 630  $\Delta erm$ , avec les amorces 2830GF et 2830GR, puis cloné avec les enzymes de restriction BamHI en amont et SalI en aval dans pGEX6P-1 (*GE Healthcare*) en phase avec le cadre de lecture de la séquence codant pour la GST (*Glutathione S-transférase*). Le plasmide pGCD2830m (figure 7A) a été vérifié par digestion et séquençage. D'autres constructions ont également été effectuées afin de produire et purifier la protéine CD2830 à partir de *B. subtilis*. La première construction a été réalisée avec l'assemblage des vecteurs pDG1661 et pMutin-Flag-CD2830 pour créer pMMD-2 (figure 7B) avec la méthode de Gibson (2011) (*one-step ISO assembly of overlapping dsDNA*). Le gène CD2830 a encore une fois été amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique de *C. difficile* 630  $\Delta erm$  en utilisant la paire d'amorces CD2830-F-HindIII\_RBS/CD2830-R-EagI-RBS. Ensuite, le gène a été cloné en phase avec le cadre de

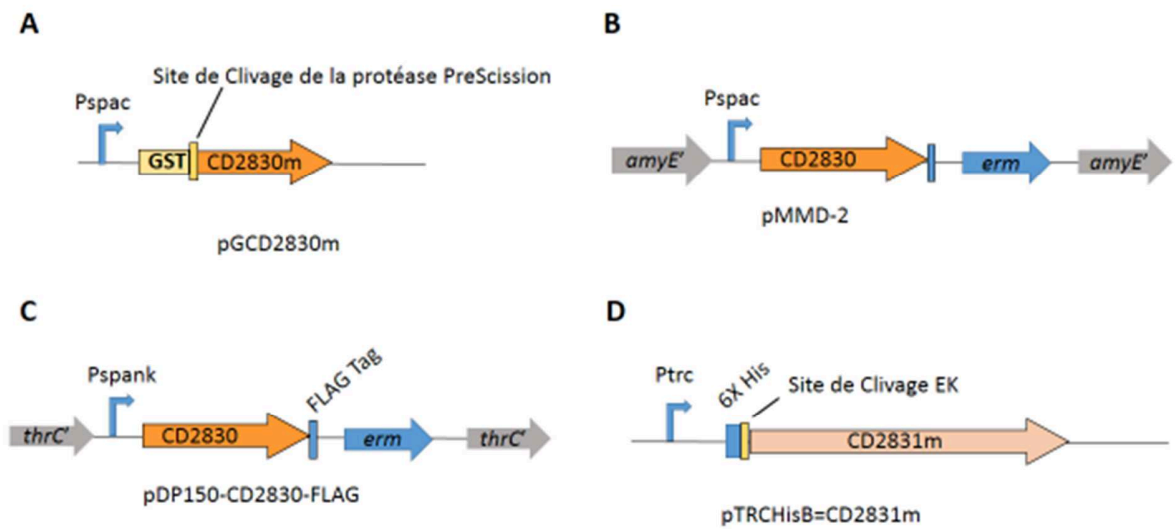
lecture de l'étiquette FLAG (DYKDDDDK 1012 Da) en c-terminal dans le plasmide pMutin-FLAG avec les enzymes de restriction EagI et HindIII. Par la suite, chaque partie sélectionnée de chacun des plasmides a été amplifiée par PCR avec les paires d'amorces pDG1661-amyE-R/pDG1661-amyE-F et pMutin-erm-a-lacI-R/pMutErm-a-lacI-F en incluant ainsi des régions homologues à chaque extrémité des fragments pour l'assemblage. Les deux fragments ont alors été ajoutés à 15 µL de tampon de réaction dans un volume total de 20 µL, soit 10-100 ng de chaque fragment d'ADN en quantité équimolaire. Le tampon de la réaction est réalisé en mélangeant les enzymes et le tampon 5X ISO comme décrit dans le protocole (Gibson & Christopher, 2011). La réaction est alors incubée pendant une heure à 50 °C. Les cellules ont été transformées avec 1 µL du produit de réaction ou 1 µL d'une dilution 1:5. La deuxième construction a été effectuée par clonage dans pDP150 avec les enzymes de restrictions SphI et HindIII. Le gène CD2830 avait été amplifié par PCR du même ADN génomique que précédemment avec les amorces CD2830-RBS-SpHI-F/CD2830-FLAG-HindIII-R1 en incluant l'étiquette FLAG dans le même cadre de lecture en C-terminal (figure 7C). Toutes les constructions ont été vérifiées par digestions enzymatiques et séquençage par la plateforme de séquençage et de génotypage (Centre de recherche du CHUL, Québec, Canada).

Pour la production et la purification de la protéine CD2831, le gène, en excluant la séquence codante pour le peptide signal, a été amplifié à partir de l'ADN génomique de *C. difficile* 630  $\Delta$ erm avec les amorces CD2831-F-BamHI/CD2831-R-PstI. Le fragment a alors été cloné avec les enzymes de restriction BamHI et PstI dans le vecteur pTrcHisB, en phase avec le cadre de lecture de la séquence codante de l'étiquette His (*H6X invitrogen*) en N-terminal de la protéine (figure 7D).

Pour la construction des souches pour les essais  $\beta$ -galactosidase dans *B. subtilis*, les plasmides pDG1661-Rb2830 et pDG1661-Rb2831 (figure 8) ont été construits comme suit. Les régions régulatrices (RBS et promoteurs natifs) de CD2830 et CD2831 ont été amplifiées de l'ADN génomique de *C. difficile* avec les paires d'amorces suivantes :

RbCD2830-F-EcoRI/RbCD2830-R-BamHI et RbCD2831-F-EcoRI/RbCD2831-R-BamHI. Puis, les produits ont été clonés dans pDG1661, en suivant le cadre de lecture pour respecter la fusion transcriptionnelle avec *lacZ* avec les enzymes de restriction EcoRI et BamHI selon les directives du fournisseur (NEB biolabs).

Les plasmides pDP150-DccA et pDP150-DccA<sup>mut</sup> ont été construits en amplifiant DccA (CD1420) ou DccA<sup>mut</sup> (CD1420<sup>mut</sup>) avec les amorces CD1420-RBS-F-HindIII et CD1420-R-SphI à partir des plasmides pDccA et pDccA-G204E (qui contient la mutation pour inactiver la DGC). La séquence du RBS de *spoVG* de *B. subtilis* a également été ajoutée dans la construction. Les produits ont ensuite été clonés avec les enzymes de restrictions HindIII et SphI dans pDP150 qui contient le promoteur *phyper-spank* inductible à l'IPTG et les sites *thrC* pour la recombinaison homologue dans *B. subtilis*. Puis, les plasmides ont été introduits dans les souches de *B. subtilis* qui contenaient les fusions *lacZ* par transformation selon la méthode décrite plus loin, afin de moduler le c-di-GMP lors des essais  $\beta$ -galactosidase.

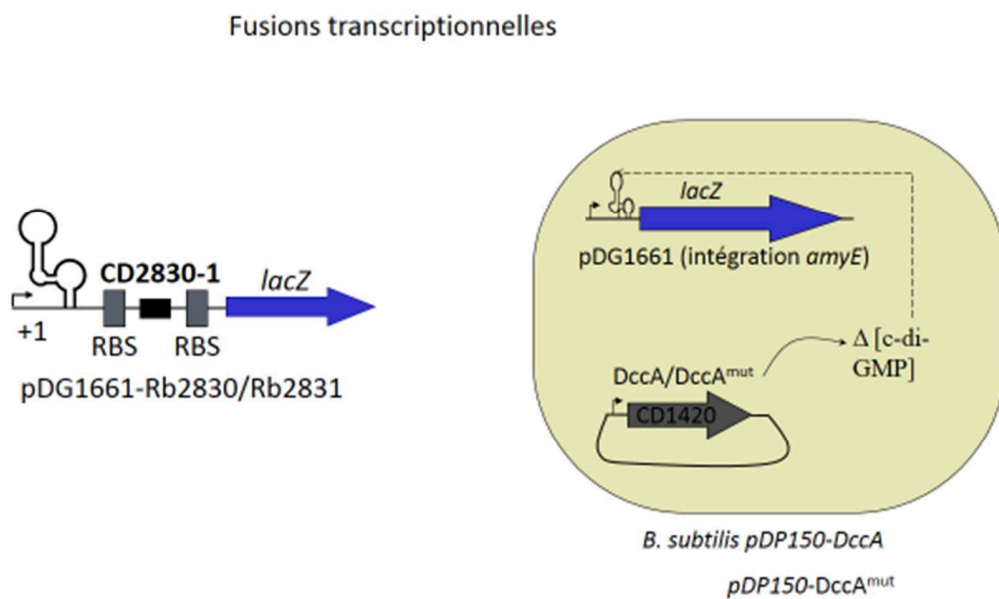


**Figure 7 :** Constructions utilisées dans cette étude des gènes avec les différentes étiquettes CD2830 avec l'étiquette FLAG en N-terminal dans pDP150 avec le promoteur  $P_{spank}$  inductible à l'IPTG, pour la production de la protéine recombinante dans *B. subtilis* (A). CD2830 avec le FLAG en N-terminal pour la production de protéine recombinante dans *B. subtilis* avec le promoteur  $P_{spac}$  inductible à l'IPTG (B). CD2830m (mature) sans la séquence pour le peptide signal pour la sécrétion avec l'étiquette GST pour la production de la protéine recombinante dans *E. coli* avec le promoteur  $P_{spac}$  inductible à l'IPTG (C). CD2831m (mature) sans la séquence pour le peptide signal de sécrétion pour la production de la protéine recombinante dans *E. coli* avec le promoteur  $P_{trc}$  inductible à l'IPTG (D).



### 2.3 Construction des souches

Les amorces utilisées pour la construction des souches sont décrites dans le tableau 3. Les fusions transcriptionnelles des riborégulateurs c-di-GMP en amont des gènes CD2830 et CD2831 avec *lacZ* ont été construites par Eric Bordeleau en utilisant le vecteur intégratif pDG1661. Les plasmides de fusions avec *lacZ* ont été introduits dans une souche de *B. subtilis* dérivée de MO1099 par transformation. Les plasmides ont été intégrés par recombinaison homologue au locus *amyE*. Par la suite, les plasmides pDP150 contenant soit DccA, DccA<sup>mut</sup> ou seulement le plasmide vide, ont été introduits dans les souches de *B. subtilis* contenant les fusions avec le gène *lacZ* et intégrés également par recombinaison homologue dans le chromosome au locus *thrC*.



**Figure 8** : Constructions des plasmides pDP150 et pDG1661 avec fusions transcriptionnelles des riborégulateurs en amont des gènes CD2830 et CD2831 avec le gène *lacZ*. Le c-di-GMP est modulé avec la construction pDP150-DccA lors des essais  $\beta$ -galactosidase.

Les souches utilisées pour les essais  $\beta$ -galactosidase EB194, EB196 et EB198 ont été obtenues en transformant la souche *B. subtilis* MO1099 avec les plasmides pDG1661, pDG1661-Rb2830 et pDG1661-Rb2831, soit les fusions *lacZ*, qui vont s'intégrer dans le chromosome par recombinaison homologue au site *amyE*. Par la suite, chacune de ces nouvelles souches a été transformée selon la méthode présentée plus loin avec les plasmides pDP150, pDP150-DccA et pDP150-DccA<sup>mut</sup> pour la modulation du c-di-GMP lors des cultures des essais  $\beta$ -galactosidase (figure 8).

Les souches de *C. difficile* 630  $\Delta$ *erm* CD2830 et CD2831 ont été réalisées par mutagenèse insertionnelle avec le système ClosTron (Heap *et al.*, 2007) en introduisant par conjugaison les plasmides navettes pMTL007C-E5-CD2830-465a et pMTL007-E5-CD2831-1656s d'*E. coli* à *C. difficile*. La mutation a été effectuée en inactivant le gène ciblé par l'intron de groupe II. L'intron a été conçu à partir de l'outil bio-informatique disponible sur le site *ClosTron.com*. Les constructions ont été vérifiées par PCR et séquençage par la plateforme de séquençage et de génotypage (Centre de recherche du CHUL, Québec, Canada).

Les souches *C. difficile* 630  $\Delta$ *erm* CD2830 et CD2831 ont été construites par la méthode ClosTron (*ClosTron.com*). Dans les plasmides pMtL007C-E5, les introns dérivés de Ll.ltrB ont été redirigés pour s'insérer dans CD630\_28300 à la position 465 (pMTL007C-E5-CD2830-465a) ou à la position 1656 de CD630\_28310 (pMTL007-E5-CD2831-1656s). Les sites d'insertion des introns et les modifications des séquences respectives pour chaque intron ont été prédits en utilisant l'algorithme de Perutka (2004). Les dérivés de pMTL007C-E5 ont été synthétisés par *DNA 2.0* (Menlo Park, US). Les plasmides contenant les introns ont alors été transformés par électroporation dans *E. coli* CA434 pour être ensuite introduits par conjugaison interspécifique dans *C. difficile* 630  $\Delta$ *erm* pour donner CD2830 et CD2831.

**Tableau 3** Noms et séquences des oligonucléotides utilisés lors de cette étude

| Nom                    | Séquence nucléotidique 5' vers 3'   |
|------------------------|---|
| 2830GF                 | NNNNNGGATCCGATAGTACTACTATAACAACAAAATAAAGA                                 |
| 2830GR                 | NNNNNGTCGACCTATTTAGCTAAATTTTGCA   |
| CD1420-RBS-F-HindIII   | NNNNNNAAGCTTAAAGGTGGTGAACACTACTATGTTTAAAGAAA<br>TTTTTTTAAGAAC             |
| CD1420-R-SphI          | NNNNNNGCATGCACAATGTTAATAATCATTTTTATCAAATT                                 |
| pDG1661-amyE-R         | AACACGAACCGTCTTATCTCTCGACATGGATGAGCGATGA                                  |
| pDG1661-amyE-F         | GTGAGTTAGGATCCTGCCTCATCAGACCAGTTTTTAATTTG<br>TGTGT                        |
| pMMD1-CD2830-F         | GAACAACCTCTGCTAAAATTCCTG  |
| pMMD1-CD2830-R         | TGGAAAAAAGCCCGCTCATT  |
| pMutErm-a-lacI-F       | TCATCGTCATCCATGTCGAGAGATAAGACGGTTCGTGTT                                   |
| pMutin-erm-a-lacI-R    | CACACAAATTA AAAACTGGTCTGATGAGGCAGGATCCTA<br>ACTCAC                        |
| CD2830-F-HindIII_RBS   | NNNNNNAAGCTTTTTGAAATTTATTACTCCCG  |
| CD2830-R-EagI-RBS      | NNNNNNCGGCCGTTTAGCTAAATTTTGCAAAAAG  |
| CD2830-RBS-SpHI-F      | NNNNNNGCATGCTTTGAAATTTATTACTCCCG  |
| CD2830-FLAG-HindIII-R1 | NNNNNNAAGCTTAGATTATTATTTATCATCATCATCTTT<br>ATAATCTTTAGCTAAATTTTGCAAAAAGCT |
| CD2831-F-BamHI         | NNNNNNGGATCCTTTTTTAGTAAAAATTACTTTATAT                                     |
| CD2831-R-PstI          | NNNNNNCTGCAGTTTGTATTTTTATTCTTCT   |
| RbCD2830-F-EcoRI       | NNNNNNGAATTCACCTAACATTATAAAAAATATAAGTT                                    |
| RbCD2830-R-BamHI       | NNNNNNGGATCCTGGTCTCATATTATTCCCTC  |
| RbCD2831-F-EcoRI       | NNNNNNGAATTTCTTATTAATTAATCTCATCATAAGG                                     |
| RbCD2831-R-BamHI       | NNNNNNGGATCCTTTCTTCATGTAAATCTCAC  |
| CD2830_5pUTR.qcd.F1    | AATGAGGCAAAACTAGGGAAACCTAGTC  |
| CD2830_5pUTR.qcd.R1    | AATTTTTACTCTTTTCGGCAACTGGCTG  |
| CD2830.qcd.F1          | ATGGGAAGGTACTGGAAAACTTGGG   |
| CD2830.qcd.R1          | ATGGTCTATTGCATGTGCTGTTTCATG   |
| CD2831_5pUTR.qcd.F1    | GTTGAAGTATATTCTATTATTGGGCACC  |
| CD2831_5pUTR.qcd.R1    | TATATTCATAGCCGTTGCACC   |
| CD2831.qcd.F1          | CCAAGCACAGATAAACCAAGGAAACC  |
| CD2831.qcd.R1          | TCTGATGGTGGTACTGGAGGATTCA   |
| gyrA.CD0006.qcd630.F1  | ACAGAAATAAGACATGCTGAAGGCGA  |
| gyrA.CD0006.qcd630.R1  | GTGCTGAAATACCTCTTCCACCCC  |
| rpoA.CD0098.qcd630.F1  | TCATTACCAGGTGTAGCAGTGAATGC  |
| rpoA.CD0098.qcd630.R1  | TGATAGAGCATGGTCCTTGAGCTTCT  |
| adk.CD0091.qcd630.F1   | TCCAAGAAATGTAGCACAAGGAGAACAT  |
| adk.CD0091.qcd630.R1   | ACTCAACATGGTAAGTAGCTCCACAAG   |

## 2.4 Transformations

Les plasmides pMTL007C-E5-CD2830-465a et pMTL007-E5-CD2831-1656s ont été introduits dans *E. coli* CA343 par électroporation. Une culture de 4 mL d'une nuit, incubée à 37 °C avec agitation à 225 rpm, a été utilisée pour inoculer un nouveau bouillon LB dilué 1:100, puis incubée de nouveau jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600nm comprise entre 0,6 et 0,8. Par la suite 4 cycles de centrifugation de 1 minute à 13 000 g et de lavages des cellules à l'eau froide ont été effectués. Lors du dernier cycle, les cellules ont été resuspendues dans 40 µL d'eau froide et conservées à 4 °C. Un microlitre d'ADN (plasmide) a été ajouté aux cellules et le tout a été placé dans une cuvette à électroporation. Les cellules ont alors été électroporées selon les conditions suivantes : 200Ω, 1,8 kV, 25 µF, cuvette 1mm (*Gene Pulser Xcell* Biorad). Les cellules transformées ont ensuite été incubées à 37 °C dans 1 mL de SOC (2 % tryptone, 5 % extrait de levure, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> et 20 mM glucose) et ont été étalées sur pétri LB agar contenant du chloramphénicol.

Toutes les autres transformations chez *E. coli* ont été effectuées avec des cellules chimio-compétentes commerciales ou préparées selon la méthode Inoue (Sambrook & Russell, 2006). Une aliquote de bactéries chimio-compétentes (50 µL) a été mélangé à l'ADN plasmidique (entre 10 et 50 ng) et le mélange a été laissé 30 min sur la glace. Un choc thermique a été réalisé à 42 °C pendant 90 secondes. Le mélange a ensuite été placé sur la glace pendant 2 minutes avant d'y ajouter 800 µL de milieu SOC. La réaction de transformation a été placée à 37 °C sous agitation constante pendant 1 h et a ensuite été étalée selon différentes concentrations sur gélose LB contenant les antibiotiques pour la sélection du plasmide correspondant.

Les transformations de toutes les souches de *B. subtilis* ont été effectuées selon le protocole de transformation pour *B. subtilis* DB104 (Vojcic *et al.*, 2012). Les bactéries ont été

incubées sur LB agar à 37 °C pendant un peu plus de 9 heures. Une colonie a ensuite été repiquée pour ensemer un bouillon de 4 ml de milieu SM1 incubé à 37 °C pour la nuit avec agitation 225 rpm. Cette culture a été diluée avec du milieu SM1 dans un volume final de 10 ml jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm de 0,5 et a été incubée à 37 °C avec agitation pour 3 heures. Par la suite, 10 mL de milieu SM2 ont été ajoutés ainsi que de l'histidine à une concentration finale de 200 µg/mL. Les cellules ont ensuite été incubées dans les mêmes conditions pour 2 heures supplémentaires. Une aliquote de 500 µL de cellules maintenant compétentes a été mélangé à 1 µL d'ADN plasmidique (10 ng). Les cellules ont par la suite été incubées pendant une heure à 37 °C avec agitation et 300 µL de LB ont été ajoutés après 30 minutes. Les cellules transformées ont ensuite été étalées sur LB agar avec les antibiotiques nécessaires pour la sélection de chacun des plasmides.

## 2.5 Conjugaison interspécifique

Les plasmides pDccA et pDccAmut ont été introduits chez *C. difficile* dans les différentes constructions par conjugaison à partir de souches d'*E. coli* donatrices contenant les plasmides. Un millilitre de culture de nuit d'*E. coli* a été centrifugé puis lavé avec 1 mL de LB. En condition anaérobie, le culot de cellules d'*E. coli* a été resuspendu avec 200 µL d'une culture de *C. difficile* incubée une nuit à 37 °C dans du BHIS. La suspension a été déposée sous forme de petites gouttes sur du BHIS agar 1 %, puis incubée une nuit à 37 °C. Les bactéries ont été récupérées en resuspendant l'amas de cellules dans 1 ml de PBS 1X. Les suspensions ont été étalées sur plusieurs milieux BHIS agar 1 % contenant les antibiotiques norfloxacine pour contre sélectionner *E. coli* et thiamphénicol pour sélectionner *C. difficile* contenant les plasmides et incubées à 37 °C jusqu'à 72 h.

## 2.6 Essais $\beta$ -galactosidase

L'activité  $\beta$ -galactosidase des fusions transcriptionnelles des riborégulateurs putatifs avec le gène rapporteur *lacZ* a été mesurée dans des souches de *B. subtilis* dont la concentration en c-di-GMP varie selon des modifications apportées au protocole de Cutting et Hardwood (1990). La concentration de c-di-GMP intracellulaire est modulée par la surexpression de la DGC DccA (figure 8). Des cultures en LB de 4 mL avec les antibiotiques appropriés ont été incubées à 37°C pendant une nuit. Les cultures ont alors été diluées 1:100 dans 50 mL de milieu LB sans antibiotique puis incubées à 37 °C avec agitation jusqu'à une densité optique à 600 nm de 0,4. Ensuite, les cultures ont été séparées en 2 x 25 mL et l'une d'elles a été induite avec 1mM d'IPTG puis l'incubation a été poursuivie avec agitation à 37 °C. Une aliquote de 4,5 mL de chaque culture a été prélevée lorsque la densité optique à 600 nm a atteint 0,8 et 1,5. La croissance a été arrêtée sur glace pendant 2 à 5 minutes. Les aliquotes ont été centrifugées à 3700 g pendant 10 minutes puis les culots ont été lavés avec du Tris-HCl à 25 mM pH 7,4 froid (4 °C) puis recentrifugé. Les culots ont été congelés dans de l'azote liquide puis placés à -20 °C. Par la suite, les culots ont été dégelés sur glace. Pour chaque ml de culture initiale les culots ont été resuspendus dans 640  $\mu$ L de tampon Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  à 60mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  à 40mM, KCl à 10 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  à 1mM à pH 7,0 et 50 mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol fraîchement ajouté chaque fois). 160  $\mu$ L de lysozyme (Sigma, isolé de blanc d'œuf de poule) à 2.5 mg/mL (dans du tampon Z sans  $\beta$ -mercaptoéthanol) ont été ajoutés à chaque échantillon de 640  $\mu$ l (en triplicata pour chaque condition de culture). Chaque échantillon a été vortexé brièvement puis incubé 5 minutes à 37 °C. Ensuite, 8  $\mu$ L de Triton X100 (Sigma) à 10 % ont été ajoutés aux échantillons puis ils ont été placés sur glace. Les échantillons ont été préchauffés pendant environ 5 minutes dans un bain à 30 °C puis 0,2 mL d'ONPG (*o*-Nitrophenyl-beta-galactopyranoside) 4,0 mg/mL ont été ajoutés au temps initial ( $t_0$ ). Le temps a été noté de façon précise lorsque l'ONPG a été ajouté dans chaque échantillon. Les réactions ont été incubées en absence de lumière jusqu'à l'obtention d'une coloration jaune. La réaction a alors été arrêtée par l'ajout de 0,4 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M puis le temps a également été noté à ce moment ( $t_j$ ). Les échantillons ont été centrifugés dans une microcentrifugeuse à vitesse maximale pendant 3

minutes puis l'absorbance a été mesurée à 420 nm et 550 nm. Le blanc a été effectué avec 0,640 mL de tampon Z, 0,2 mL ONPG 4mg/mL et 0,4 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M. L'activité a été calculée avec la formule utilisée par Cutting et Hardwood (1990) et exprimée en Unités Miller :

$$(1000 \times \text{DO } 420 \text{ nm}) / (\Delta t \text{ (min)} \times \text{DO}600)$$

ou « DO » représente la densité optique mesurée à 420 nm et 600 nm et  $\Delta t$  (en minutes) le temps de réaction jusqu'à l'obtention de la coloration jaune ( $t_j - t_0$ ).

## 2.7 Analyse de l'expression des gènes

D'abord, l'ARN a été purifié de culture de *C. difficile* 630  $\Delta_{erm}$  incubée dans du BHIS-Tm jusqu'à une DO<sub>600 nm</sub> de 0,7 avec 0,1 ou 1  $\mu\text{g/mL}$  de nisine. Les cultures ont été mélangées à de l'acétone-éthanol froid 1:1 puis placées à -80 °C. La purification d'ARN a été effectuée avec le *minikit RNeasy* (QIAGEN) selon les instructions du manuel et la lyse a été effectuée avec des billes de verre. Suite à un lavage au tampon TE (Tris-HCl 1mM, EDTA 1mM) froid, les cellules ont été resuspendues dans du tampon RLT (QIAGEN) et soumises à 2 cycles de 40 secondes à 4 m/s avec l'appareil *Fastprep 24* (MP Biomedicals) avec 0.5g de billes en verre de 0,1 mm. Les échantillons d'ARN purifiés ont subi un traitement à la *DNase Turbo* (Ambion) selon les directives du manuel en ajoutant une étape de 30 minutes de digestion avec 1  $\mu\text{L}$  d'enzyme. L'étude de l'expression des gènes CD2830 et CD2831 de *C. difficile* 630  $\Delta_{erm}$  a été réalisée par RT-PCR quantitative avec la plateforme RNomique du laboratoire de génomique fonctionnelle de l'Université de Sherbrooke (<http://lgfus.ca>). L'intégrité des ARN a été vérifiée avec le *Bioanalyzer Agilent 2100* (Agilent Technologies). La réaction de transcription inverse a été effectuée sur 2,2  $\mu\text{g}$  totaux d'ARN avec la *Transcriptor reverse transcriptase*, des hexamers aléatoires, dNTPs (Roche Diagnostics) et 10 unités de *RNAseOUT* (Invitrogen) suivant les directives du fournisseur dans un volume final de 20  $\mu\text{L}$ . Toutes les amorces utilisées (voir tableau 3) ont été préalablement resuspendues dans du tampon Tris-EDTA (IDT) à des concentrations entre 20-100  $\mu\text{M}$  et les paires d'amorces ont été diluées à une concentration finale de 1  $\mu\text{M}$

dans de l'eau sans RNase ni DNase (IDT). La méthode de qPCR a été réalisée en plaque 96 puits dans un thermocycleur CFX-96 (Bio-Rad) avec 5 µl de *iTaq Universal SYBR Green Supermix 2X* (Bio-Rad), 10 ng (3 µL) cDNA, et 200 nM final (2 µL) de paires d'amorces en solution. Les conditions suivantes ont été utilisées pour la réaction PCR : 3 min. à 95 °C; 50 cycles: 15 s à 95 °C, 30 s à 60 °C, 30 s à 72 °C. L'expression relative des gènes CD2830 et CD2831 a été calculée en utilisant plusieurs gènes de références *adh* (adénylate kinase), *rpoA* (sous-unité alpha de l'ARN polymérase) et *gyrA* (ADN gyrase sous-unité A) dont l'expression reste stable (Hellemans *et al.*, 2007). La stabilité de l'expression des gènes de ménages a été évaluée par *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002). Chaque expérience contenait des échantillons contrôles sans ADN pour chaque paire d'amorces ainsi que des échantillons contrôles sans transcriptase inverse. Les expériences de RT-qPCR ont été réalisées avec trois réplicats techniques pour chacun des trois réplicats biologiques et ont été combinées par la suite.

## 2.8 Production de protéines recombinantes

Des cultures de *B. subtilis* MD12, MD23, MD35, MD36, MD37 et MD38 ont été diluées 1:100 dans 500 mL de LB avec 1 µg/ml d'érythromycine et incubées à 37 °C avec agitation. L'expression des protéines a été induite vers 0,4 de densité optique mesurée à 600 nm et incubée pendant 2 h à température réduite de 30 °C. Par la suite, les cultures ont été placées sur glace pendant 5 minutes et centrifugées à 4 °C pendant 15 minutes à 10 000 g. Le surnageant de la culture a été récolté et le culot a été conservé pour analyse. Le surnageant a soit été précipité au SAS (Sulfate d'ammonium, sigma) soit au TCA 100 % (acide trichloracétique, Sigma) pour analyse des protéines précipitées par immunobuvardage (*Western blot*) ou bien filtré pour purification avec résine de billes anti-FLAG (*ANTI-FLAG M2 affinity Gel*, Sigma).

Les précipitations au SAS ont été effectuées en ajoutant jusqu'à 100 % du sel (conditions saturantes : 69,7 g pour chaque 100 mL de surnageant à 4 °C) au surnageant de culture, puis incubé à 4 °C pendant une heure avec légère agitation. Les protéines précipitées ont



été récupérées suite à une centrifugation à 4 °C de 15 minutes à 10 000 g. Les protéines ont alors été resuspendues dans un tampon Tris-HCl pH 7,5 50 mM ou PBS (tampon phosphate salin).

Les précipitations au TCA 100 % ont été effectuées en ajoutant 1 volume de TCA 100 % à 4 volumes de surnageant. La réaction a été incubée à 4 °C pendant 10 minutes avec légère agitation puis centrifugée à 10 000 g pendant 15 minutes. Le culot de protéines a été lavé avec de l'acétone froide et centrifugé de nouveau pour un total de 3 fois. Le culot a été séché afin d'enlever les traces d'acétone et conservé pour analyse par immunobuvardage. Les protéines précipitées par cette méthode sont dénaturées et ont servi seulement pour valider la méthode de production de la protéine. L'extrait cellulaire a été resuspendu dans du PBS 1X avec 1 % de Triton X-100, 1mM de DTT (dithiothréitol, Sigma) et des inhibiteurs de protéases (*Protease Inhibitors Cocktail*, Sigma). Les cellules ont été lysées par sonication (6 fois pendant 15 secondes à une amplitude de 40 %) et ensuite centrifugées. Le lysat cellulaire et le culot de débris ont été séparés et conservés pour analyse par immunobuvardage.

La purification de la protéine CD2830-FLAG dans le surnageant de culture filtré a été effectuée selon les instructions du *technical bulletin ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel* (Sigma) avec le Gel d'affinité *ANTI-FLAG M2* (Sigma) dans des colonnes de 3 ml QIAGEN. Suite à l'élution, la pureté de la protéine a été vérifiée par SDS-PAGE et analysée par immunobuvardage.

Une culture d'*E. coli* BL21 contenant pGCD2830m a été diluée 1:100 dans 500 ml de milieu avec Amp et incubée avec agitation à 37 °C. Lorsque la culture a atteint une densité optique à 600 nm d'environ 0,8, l'expression des protéines a été induite pendant 2 h à température réduite (25 °C). Les cellules ont été centrifugées à 4 °C et les culots ont été congelés à – 20 °C. Les cellules ont ensuite été dégelées, resuspendues dans du PBS 1X

avec 1 % de Triton X-100, 1mM de DTT (dithiothréitol, Sigma) et des inhibiteurs de protéases (*Protease Inhibitors Cocktail*, Sigma) puis lysées par sonication. La protéine CD2830m a été obtenue par chromatographie d'affinité en utilisant une matrice de *glutathione sepharose 4B* (GE Healthcare life science) dans des colonnes de 5 mL (QIAGEN) avec la PreScission (GE Healthcare life science) selon les instructions du manuel. Toutes les étapes ont été effectuées sans EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) pour ne pas inactiver la protéine. Suite à l'élution, la pureté des protéines a été déterminée par SDS-PAGE et la concentration dosée par la méthode de Bradford avec du BSA (*Bovin Serum Albumin*, Sigma).

Pour la production de CD2831mHis, une culture d'*E. coli* BL21 contenant pTrcHisB-CD2831m a été diluée 1:100 dans 500 mL de LB avec Amp et incubée avec agitation à 37 °C. L'expression des protéines a été induite lorsque la densité optique à 600 nm a atteint 0,8 et l'incubation a été poursuivie pendant 2 h à température réduite (25 °C). Les cellules ont été centrifugées à 4 °C et le culot a été resuspendu dans du tampon de lyse (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole pH 8,0) puis 2 mg/mL de Lysozyme (Sigma) ont été ajoutés. Les cellules ont été incubées sur la glace pendant 30 minutes et lysées par sonication. Les cellules ont été centrifugées de nouveau à 4 °C et les protéines du lysat cellulaire ont été purifiées en conditions dénaturantes selon les directives du manuel d'instruction *The QIAexpressionist* (QIAGEN, *Ni-NTA manuel*). La pureté des protéines purifiées a également été vérifiée par SDS-PAGE.

## **2.9 Immunobuvarge (*Western Blot*)**

Pour détecter la présence de la protéine recombinante CD2830-FLAG, les différentes fractions produites lors de la production ou purification de la protéine ont été analysées par immunobuvardage (*Western Blot*). D'abord pour chaque production, les différentes fractions ont été déposées dans deux gels SDS-PAGE identiques afin de séparer les

protéines par taille. Un gel a ensuite été coloré au bleu de Coomassie pour analyse et l'autre utilisé lors de l'immunobuvardage a été réalisé selon des modifications apportées au protocole du manuel d'instruction du *Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell Instruction Manual*, Biorad). Les protéines du gel ont été transférées par électrophorèse sur une membrane de nylon (*Magna Nylon transfer membrane 0,45 micron*, Gilson scientifique) pendant 1 h 15 à 100V et 300mA à basse température (environ 4 °C) dans du tampon de transfert (25 mM Tris-base, 192 mM glycine à pH 8,3). La membrane a été préalablement imbibée dans du méthanol pour 2 minutes et rincée à l'eau distillée pendant une minute. Une fois que les protéines ont été transférées, la membrane a été placée dans du tampon de blocage contenant 5 % de lait écrémé en poudre et 0,1 % de Tween-20 (Sigma) dans du TBS 1X (TBS 5X : 30,25 g Tris, 43,8 g NaCl à pH 7,5 dans un litre d'H<sub>2</sub>O) puis incubé une nuit à 4 °C. La membrane a ensuite été lavée dans du tampon de lavage (TBS 1X, 0,05 % de Tween-20) avant d'être incubée une heure à la température de la pièce avec légère agitation dans le tampon d'anticorps primaire composé de TBS 1X, 1 % de gélatine, 0,05 % de Tween-20 et les IgG anti-FLAG M2 dilués 1:8000 (F316S, Sigma). La membrane a été rincée dans du tampon de lavage une fois pendant 15 minutes et deux fois pendant 5 minutes. La membrane a été incubée pendant 45 minutes dans les mêmes conditions dans le tampon d'anticorps secondaire contenant 5 % de lait écrémé en poudre, 0,1 % de Tween-20, 2 µL d'anti-IgG couplés à la HRP (horseradish peroxidase, Amersham Biosciences cat#NA931V) dans 40 mL de TBS 1X. Suite à cette incubation, une autre étape de lavage a été effectuée puis la membrane a été incubée dans le noir pendant 5 minutes dans les réactifs de chimioluminescence A et B 40:1 (*Pierce ECL 2 western Blotting substance*, Thermo scientifique). Par la suite, un film autographique *Kodak BioMax light film* (Sigma-Aldrich) a été exposé 15 minutes à la membrane dans une cassette métallique fermée. Le film a été révélé dans la solution de développeur jusqu'à ce qu'un signal apparaisse, rincé à l'eau et fixé dans la solution de fixateur pendant 1 minute (*Carestream® Kodak® processing chemicals*, Sigma-Aldrich).

## 2.10 Essais protéolytiques

Les premiers essais ont été effectués avec la protéine purifiée. La protéine CD2830m a été incubée dans différents tampons (100 mM Tris-HCL, 5 mM MgCl<sub>2</sub> ou 2 mM CaCl<sub>2</sub> ou 5 mM ZnCl<sub>2</sub>) en présence d'azocaséine 1 % (Sigma). Suite à une période d'incubation de 30 minutes, du TCA 10 % a été ajouté afin de faire précipiter l'azocaséine qui n'aurait pas été clivée. La réaction a été centrifugée à 10 000 g pendant 5 minutes puis du NaOH 1,8 N a été ajouté avant de mesurer la densité optique à 440 nm et d'évaluer l'activité protéolytique. La protéine CD2830m a également été incubée pendant 1 et 16 heures, en présence de caséine 1 % (Sigma) et de gélatine 0,08 % commerciales. Les réactions ont été analysées par SDS-PAGE afin d'observer un profil de digestion.

Les essais protéolytiques ont également été effectués avec des surnageants de culture de *C. difficile* 630  $\Delta$ erm et *B. subtilis* MD12. Les cellules de cultures de nuit et de 5 jours ont été centrifugées et les surnageants ont été utilisés pour les essais avec de l'azocaséine 2 %. Les réactions ont été incubées à différentes températures et selon différents temps, puis l'activité a été mesurée par spectrophotomètre comme précédemment.

Finalement, une dernière méthode (zymogramme) a été utilisée pour l'analyse de l'activité protéolytique de CD2830m. Des gels d'acrylamide 10 % (Biorad), sans aucun traitement dénaturant, contenant de la caséine à 0,05 % ou la protéine purifiée CD2831m, ont été utilisés pour visualiser l'activité protéolytique de CD2830m sur ces deux substrats. Suite à la migration des protéines, les gels ont été incubés pendant 20 heures à 37 °C et colorés au Bleu de Coomassie 0,25 % pour visualiser les plages de digestion.

## **2.11 Essais d'agrégation**

Les essais d'agrégation en culture liquide ont été effectués avec les souches de *C. difficile* 630  $\Delta_{erm}$  CD2830, CD2831 et sauvage selon les méthodes décrites par Purcell *et al.* (2012). Des bouillons de 10 ml de BHIS-Tm avec ou sans nisine ont été inoculés avec des colonies cultivées sur gélose BHIS-Tm pendant 24-48 h et ont été incubés à 37 °C pendant 16 heures. L'agrégation a été évaluée en mesurant la densité cellulaire au spectrophotomètre à 600 nm avant et après la resuspension des cellules agrégées avec un vortex.

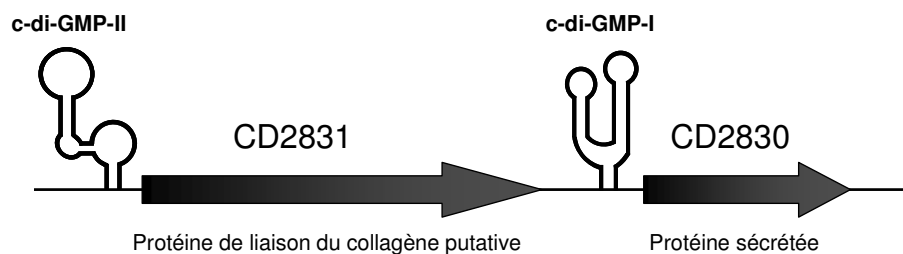
## **2.12 Essais d'adhésion en plaque**

Les différents mutants d'inactivation de *C. difficile* 630  $\Delta_{erm}$  et la souche sauvage contenant pDccA, induit ou non, ont été utilisés pour ses essais. Cette méthode a été réalisée selon le protocole publié par King *et al.*, (2011). La plaque 96 puits (SARSTEDT) a été traitée avec des solutions 2 % de fibronectine de plasma humain ou de fibrinogène de plasma humain et BSA (Sigma-Aldrich) préparées selon les fiches descriptives de chacun des produits. Pour chaque condition de culture, 1,2 ml a été prélevé et lavé avec du PBS en conditions anaérobie. Les cellules ont alors été centrifugées et resuspendues dans du milieu BHIS avant d'être déposées dans la plaque. La plaque a été incubée en absence d'oxygène pendant 2 h à 37 °C et contenait également des puits avec seulement du BHIS comme contrôles négatifs. Après l'incubation, les cellules dans la plaque ont été lavées 3 fois avec du PBS 1X. Les cellules ont été fixées avec 150  $\mu$ L de formaldéhyde hydraté 25 % pendant 30 minutes à la température de la pièce. Une autre série de deux lavages au PBS 1X a été effectuée avant de colorer les cellules avec 150  $\mu$ L de cristal de gentiane 0,1 % pendant 30 minutes. La microplaque a ensuite été lavée à l'eau et l'adhésion des cellules à la microplaque a été mesurée par un lecteur de microplaque (Asys UVM340, Biochrom) à 570 nm et les résultats analysés par ANOVA.

## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS

#### 3.1 Analyse de la régulation des gènes CD2830 et CD2831

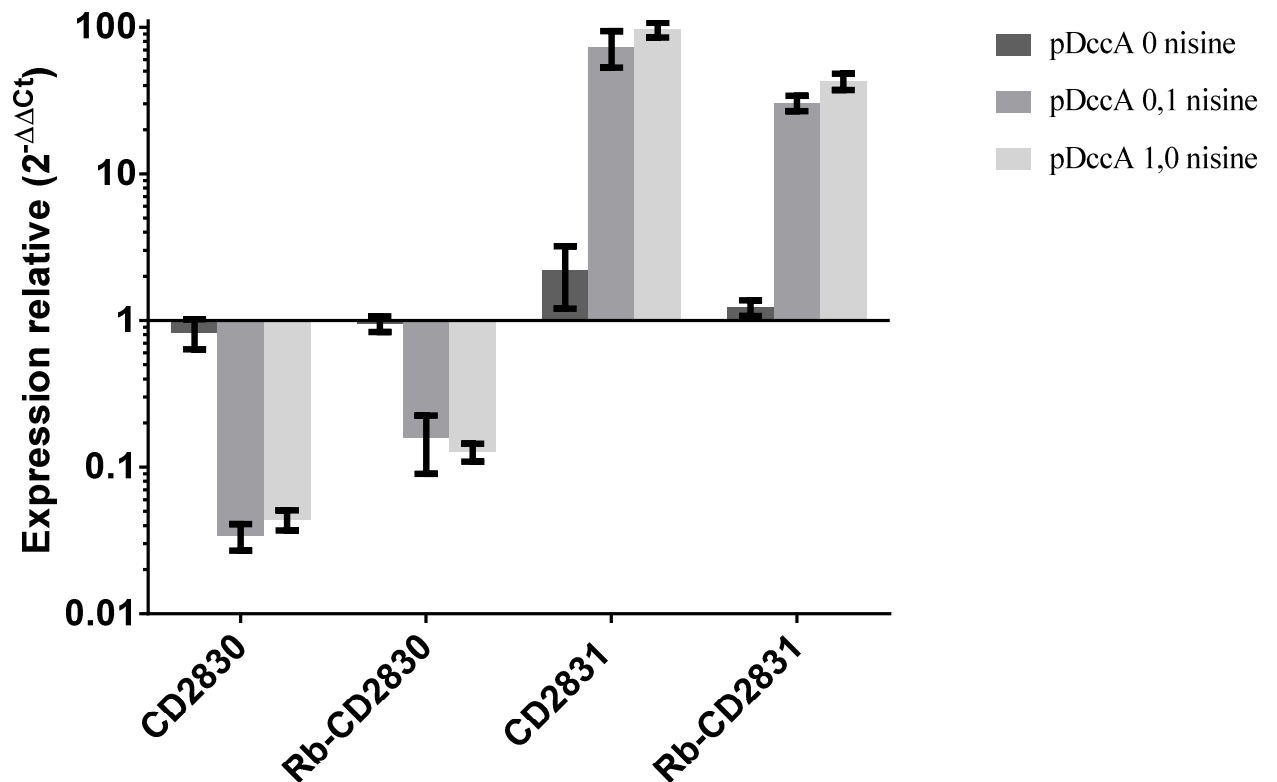


**Figure 9** : Schématisation du contexte génétique de CD2830 et CD2831

##### 3.1.1 Expression relative de CD2830 et CD2831

De façon générale, les riborégulateurs contrôlent soit la transcription de l'ARN messager par la formation d'une tige-boucle terminatrice Rho-indépendante ou encore la traduction en séquestrant la séquence Shine-Dalgarno et/ou le codon d'initiation. Des essais de RT-PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR), à partir d'ADNc obtenus de la purification d'ARN de *C. difficile* 630  $\Delta erm$  avec soit pDccA ou pDccA<sup>mut</sup> (induits à la nisine ou non), ont été effectués afin de mesurer les effets de la variation de la concentration de c-di-GMP intracellulaire sur l'expression des gènes CD2830 et CD2831 en aval des riborégulateurs prédits (figure 9). Lorsque le niveau de c-di-GMP intracellulaire augmente, l'expression relative du gène CD2830 en aval du riborégulateur à c-di-GMP de type I diminue de 23 à 29 fois. Tandis que pour les mêmes conditions, l'expression relative du gène CD2831 en aval du riborégulateur à c-di-GMP II augmente de 72 à 96 fois (Figure 10). La souche

exprimant  $DccA^{mut}$  a été utilisée comme contrôle standard, soit la condition où l'on n'observe pas de variation de la concentration en c-di-GMP en conditions induites pour effectuer les calculs d'expression relative. Lors des essais de RT-qPCR, afin de vérifier si l'effet du c-di-GMP observé sur l'expression des gènes ne serait pas plutôt associé à l'activité des promoteurs, l'expression des aptamères a également été vérifiée avec des amorces spécifiques à chacune des structures. Dans ce cas, le niveau d'expression relative devrait rester constant et indépendant du niveau de c-di-GMP intracellulaire. Toutefois, nous avons observé une différence significative pour chacun des riborégulateurs (figure 10). En effet, le niveau d'expression des aptamères suit la même tendance que les gènes en aval suggérant soit que le c-di-GMP ait un effet sur le promoteur ou soit que la structure d'ARN formée soit plus stable lorsqu'il y a liaison du c-di-GMP ce qui augmente sa demi-vie.



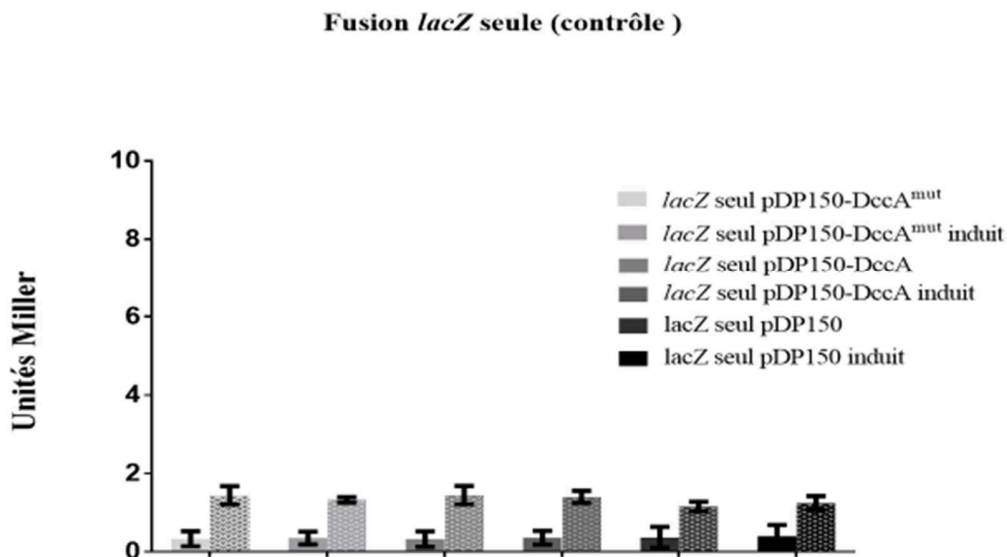
**Figure 10 :** Expression relative des gènes CD2830 et CD2831

Les barres représentent l'expression relative ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) des gènes (CD2830 et CD2831) ou des aptamères (RB-CD2830 et RB-CD2831) calculée par rapport à la condition contrôle : *C. difficile* 630  $\Delta erm$  qui contient pDccA<sup>mut</sup> induit avec nisine et normalisée avec les gènes de références *adk*, *gyrA* et *rpoA*. Les données proviennent de trois essais indépendants et les barres d'erreurs représentent l'écart type. Des tests statistiques *one-way* ANOVA ont été effectués pour comparer les valeurs avec la condition contrôle ( $P \leq 0.001$ ).



### 3.1.2 Condition contrôle pour l'analyse de l'expression des gènes via les riborégulateurs

Pour les essais  $\beta$ -galactosidase, des constructions contrôles de *B. subtilis* avec le gène *lacZ* et les plasmides pDP150-DccA, pDP150-DccA<sup>mut</sup> et pDP150 ont été utilisées pour mesurer l'activité  $\beta$ -galactosidase basale. Le niveau de c-di-GMP intracellulaire a été augmenté lorsque pDP150-DccA a été induit avec 1 mg/ml d'IPTG pour surexprimer la DGC DccA. Comme attendu, les valeurs obtenues, représentées dans le graphique de la figure 11, sont très faibles. Ces valeurs nous permettent de comparer la pertinence des résultats d'activité  $\beta$ -galactosidase des fusions des régions régulatrices de CD2830 et CD2831.

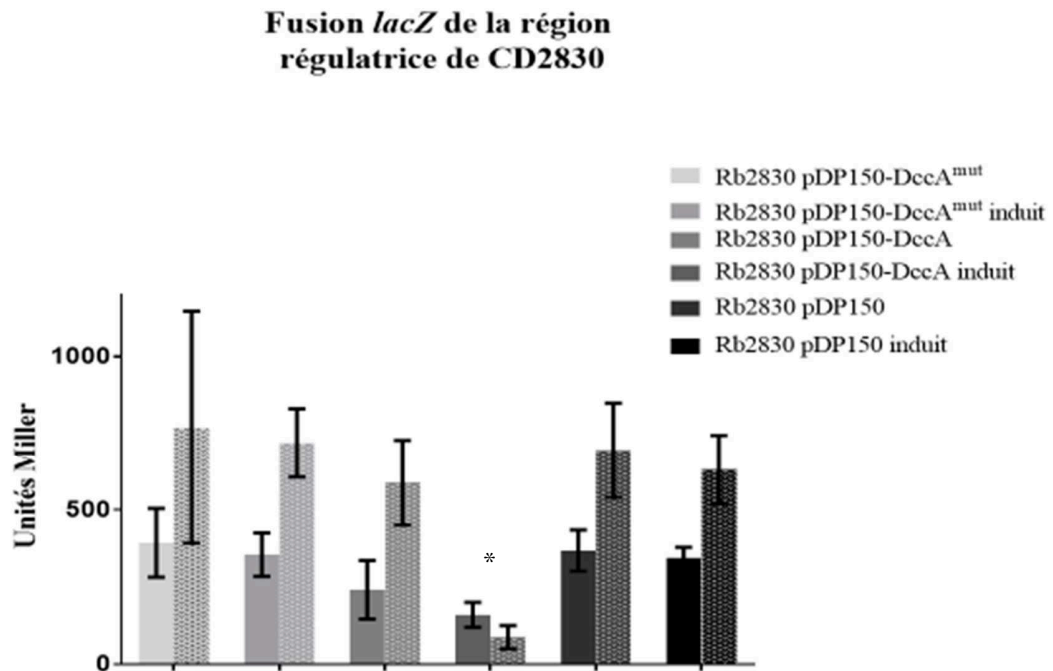


**Figure 11 :** Activité  $\beta$ -galactosidase de la condition contrôle

Les données de ce graphique représentent l'activité  $\beta$ -galactosidase exprimée en Unités Miller de la moyenne d'un triplicata biologique pour les constructions contrôles. Les différentes conditions sont présentées dans la légende en condition induite avec 1 mM d'IPTG ou non. Lors des cultures, les échantillons ont été récoltés à 0,8 DO<sub>600 nm</sub> (Barres unies) et à 1,5 DO<sub>600 nm</sub> (Barres tachetées). Les barres d'erreurs représentent l'écart type et toutes les moyennes ne sont pas statistiquement significatives, différentes entre elles (*two-ways ANOVA*).

### 3.1.3 Analyse de l'expression de CD2830 via un riborégulateur à c-di-GMP de type I

L'activité  $\beta$ -galactosidase de la fusion transcriptionnelle avec le riborégulateur à c-di-GMP I prédit (Rb2830) diminue de façon significative lorsque pDP150-DccA est induit avec 1 mg/ml d'IPTG pour surexprimer la DGC DccA. Les résultats présentés à la figure 12 suggèrent qu'une concentration plus élevée en c-di-GMP semble jouer un rôle sur la transcription du gène *lacZ* via le riborégulateur à c-di-GMP de type I. L'expression de *lacZ* diminue par rapport aux conditions contrôles.



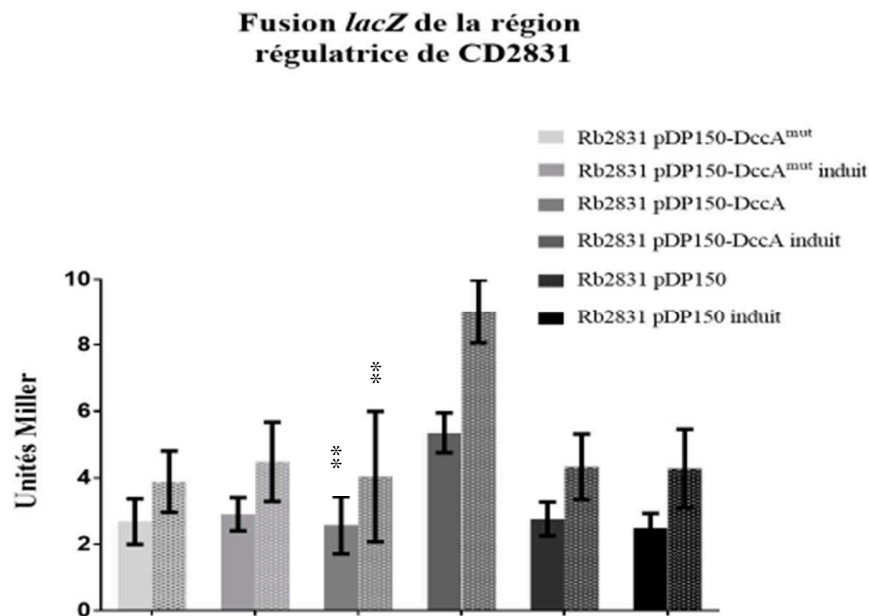
**Figure 12 :** Activité  $\beta$ -galactosidase de la fusion Rb2830-*lacZ*

Les données de ce graphique représentent l'activité  $\beta$ -galactosidase de la fusion Rb2830-*lacZ* exprimée en Unités Miller de la moyenne d'un triplicata biologique. Les différentes conditions sont présentées dans la légende en condition induite avec 1mM d'IPTG ou non. Lors des cultures, les échantillons ont été récoltés à 0,8 DO<sub>600 nm</sub> (Barres unies) et à 1,5 DO<sub>600 nm</sub> (Barres tachetées). Les barres d'erreurs représentent l'écart type et les moyennes d'unités Miller, obtenues avec pDP150-DccA induit, sont significativement différentes (*two-ways* ANOVA) par rapport aux autres moyennes en conditions induites avec un

intervalle de confiance de  $P \leq 0,05$ , les autres moyennes ne sont pas significativement différentes entre elles.

### 3.1.4 Analyse de l'expression de CD2831 via un riborégulateur à c-di-GMP de type II

De façon inverse, lorsque pDP150-DccA est induit avec 1 mg/mL d'IPTG pour surexprimer la DGC DccA afin d'augmenter le niveau de c-di-GMP intracellulaire pour la fusion transcriptionnelle avec le riborégulateur à c-di-GMP II prédit (Rb2831), l'activité  $\beta$ -galactosidase augmente de façon significative. La transcription du gène *lacZ* via le riborégulateur à c-di-GMP de type II semble être modulée par l'augmentation de la concentration de c-di-GMP (figure 13). L'expression de *lacZ* augmente par rapport aux conditions contrôles.



**Figure 13:** Activité  $\beta$ -galactosidase de la fusion Rb2831-*lacZ*

Les données de ce graphique représentent l'activité  $\beta$ -galactosidase de la fusion Rb2831-*lacZ* exprimée en Unités Miller de la moyenne d'un triplicata biologique. Les différentes conditions sont présentées dans la légende en condition induite avec 1mM d'IPTG ou non. Lors des cultures, les échantillons ont été récoltés à 0,8 DO<sub>600 nm</sub> (Barres unies) et à 1,5

DO<sub>600 nm</sub> (Barres tachetées). Les barres d'erreurs représentent l'écart type et les moyennes d'unités Miller, obtenues avec pDP150-DccA induit, sont significativement différentes (*two-ways* ANOVA) par rapport aux autres moyennes en conditions induites avec un intervalle de confiance de  $P \leq 0,01$ , les autres moyennes ne sont pas significativement différentes entre elles.

### 3.2 Analyse des fonctions des protéines CD2830 et CD2831

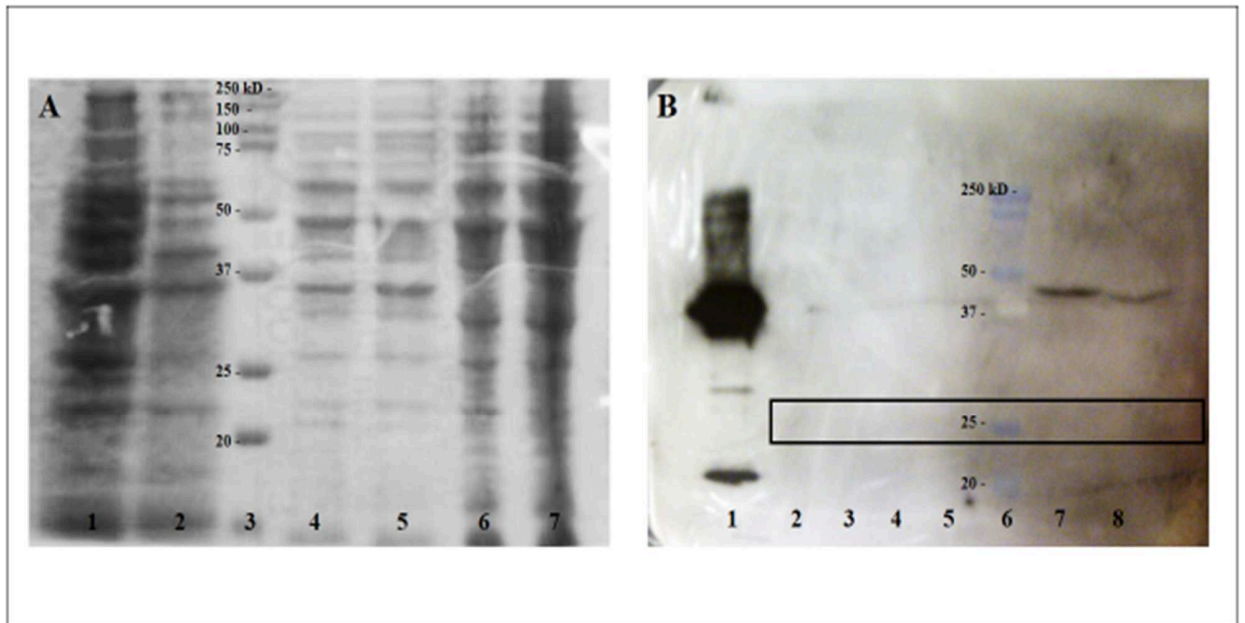
Afin d'étudier la fonction des protéines CD2830 et CD2831 de *C. difficile*, les protéines ont dû être produites et purifiées. Plusieurs expériences ont été effectuées, et bien que les résultats obtenus aient permis d'utiliser les protéines recombinantes et de mener certains essais, les résultats présentés ci-dessous sont préliminaires et incomplets. D'autres avenues devaient également être explorées, mais comme il sera discuté plus loin, la publication des résultats des travaux d'autres équipes a mis fin prématurément à cette partie du projet.

Pour produire la protéine CD2830, plusieurs méthodes ont été utilisées afin de conserver son activité prédite après purification. Selon les prédictions de départ, CD2830 semblait contenir un peptide signal pour sa sécrétion (SUPFAM; (Boetzkes *et al.*, 2012; Pruitt *et al.*, 2007)). Une souche de *B. subtilis*, dans laquelle plusieurs gènes codant des protéases sécrétées ont été inactivés, a été utilisée pour la production de la protéine CD2830 dans un contexte optimal permettant sa sécrétion et son repliement. Les résultats présentés ci-dessous sont un aperçu de plusieurs productions et purifications de CD2830-FLAG dans *B. subtilis*, qui n'ont pas permis d'obtenir la protéine CD2830 recombinante sous sa forme complète avec l'étiquette FLAG. La protéine CD2830-FLAG a été surexprimée à partir de pMMD dans *B. subtilis* MD12 pendant 2 heures avec 1 mM d'IPTG. Selon les prédictions, la protéine recombinante CD2830-FLAG aurait dû être sécrétée à l'aide de son peptide signal conservé lors du clonage et des mécanismes de sécrétion présents chez *B. subtilis* puis se retrouver dans le surnageant de culture. Toutes les fractions obtenues lors de la

purification ont été analysées par SDS-PAGE (figure 14A) et par immunobuvardage (figure 14B) afin de localiser la protéine avec l'étiquette FLAG. Les résultats obtenus n'ont pas permis de localiser la protéine recombinante CD2830-FLAG dans le surnageant de culture, ni dans aucune des autres fractions cellulaires. La protéine ne semble pas exprimée dans la souche MD12.

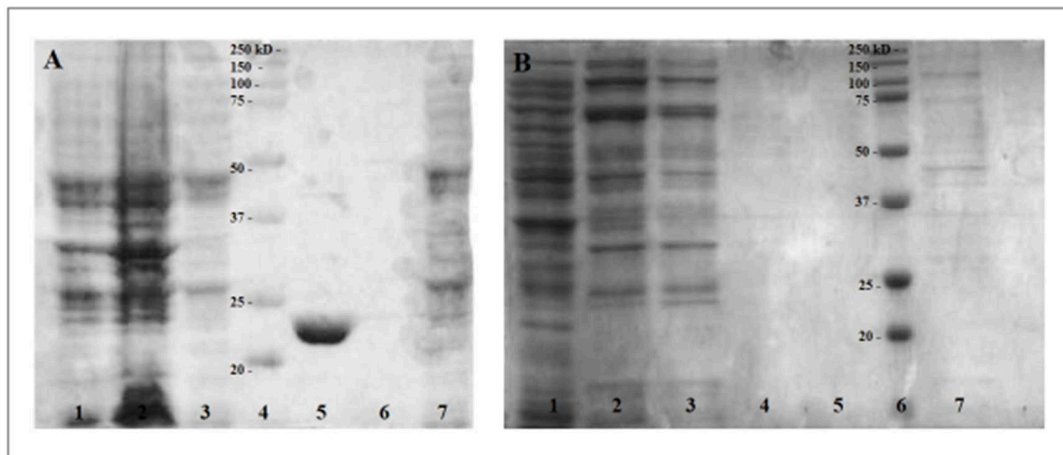
Suite à cette production infructueuse, une nouvelle stratégie a été utilisée. La production de CD2830 a été réalisée avec les nouvelles souches MD23, MD35 et MD36, construites à partir du plasmide pDP150 utilisé pour l'expression de protéines dans *B. subtilis* et non modifié comme l'avait été pMMD. Des souches différentes de *B. subtilis* (MW10, 168 et MO1813) ont également été utilisées afin de pouvoir sélectionner les constructions avec différents antibiotiques dans le cas de MO1813 et de voir si l'absence de certaines protéases sécrétées dans le cas de MW10 avait une incidence sur l'expression de la protéine CD2830. Comme cela a été décrit précédemment, la protéine CD2830-FLAG a été surexprimée avec 1 mM d'IPTG pendant 2 h dans MD23, MD25 et MD36. Suite à cette production, les surnageants des cultures de MD23 et MD36 ont été purifiés avec ANTI-FLAG M2 affinity Gel et la pureté a ensuite été analysée par SDS-PAGE (résultats non montrés). Les différentes fractions des lyses cellulaires de MD23, MD35 et MD36 ont également été analysées par SDS-PAGE et immunobuvardage (résultats non montrés). Les gels SDS-PAGE et les immunobuvardages ont été effectués en incluant les contrôles suivants; la protéine de taille connue (environ 35,1 kDa), S003 de SXT étiquetée avec le FLAG et les fractions cellulaires de cultures témoins qui ne contiennent pas le plasmide pDP150-CD2830-FLAG. Les résultats compilés lors de toutes ces expériences démontrent qu'il n'a pas été possible de purifier la protéine CD2830-FLAG, ni de la localiser dans aucune des fractions cellulaires. L'expression de la protéine dans les différentes souches pour différentes conditions de culture et d'induction avait été vérifiée par RT-qPCR (résultats non montrés). Dans plusieurs conditions des transcrits de CD2830-FLAG ont été identifiés toutefois, il n'a pas été possible de confirmer hors de tout doute que la protéine était exprimée dû à l'intensité du bruit de fond ou de vérifier l'intégrité des transcrits. Ces

résultats suggèrent donc que la protéine recombinante CD2830-FLAG n'est pas exprimée dans *B. subtilis* dans la majorité des conditions utilisées.



**Figure 14** : Analyse des fractions cellulaires de la production de CD2830-FLAG dans MD12 (A) Analyse de la production de CD2830-FLAG à partir de pMMD sur gel SDS-PAGE acrylamide 10 %. L'encadré noir représente l'endroit où la protéine CD3820FLAG devait être observée. (1) Surnageant de culture MW10 (2) surnageant de culture de MD12 (3) *Kaleidoscope Precision Plus Protein Standard* (4) lysat cellulaire de MW10 (5) lysat cellulaire de MD12 (6) culot cellulaire final de MW10 et (7) culot cellulaire final de MD12. (B) Film autographique (*Kodak BioMax light film*) suite à l'immunobuvardage avec les IgG anti-FLAG et anti-IgG couplés à la HRP pour vérifier la production de CD2830-FLAG dans *B. subtilis* MD12. L'encadré représente la zone où était attendue la protéine, du moins dans le surnageant. (1) Témoin protéine 35,1 kDa avec FLAG (S003 de SXT) (2) Culot cellulaire MD12 (3) Culot cellulaire MW10 témoin (4) Lysat cellulaire MD12 (5) Lysat cellulaire MW10 témoin (6) marqueur *Kaleidoscope Prescion Plus protein Sandard*, (7) Surnageant MD12 (8) surnageant MW10 témoin.

La dernière stratégie plus classique a permis de produire et de purifier la protéine recombinante CD2830m à partir de la souche transformée *E. coli* BL21. La protéine a été surexprimée sans son peptide signal et fusionnée à la GST à l'aide du plasmide pGCD2830m pendant 2 h avec 0,5 mM d'IPTG. La protéine a alors été purifiée sans EDTA, ou toutes autres conditions d'inactivation afin de pouvoir vérifier l'activité de la protéine recombinante. L'EDTA n'a pas été utilisé puisqu'il est un inhibiteur de métalloprotéase, soit l'activité prédite de la protéine CD2830. La pureté a été vérifiée par SDS-PAGE (Figure 15A). La concentration vérifiée par la méthode de Bradford était de 4 mg/ml après purification sans la GST. La protéine CD2830m a été utilisée pour les essais protéolytiques avec et sans traitement préalable avec un tampon de repliement contenant du  $ZnCl_2$  100 $\mu$ M comme la protéine est prédite pour être une zinc-métalloprotéase et nécessite du zinc au site actif. Une seconde purification de la protéine recombinante CD2830m, selon les mêmes conditions, a été effectuée pour les zymogrammes. La pureté a été vérifiée par SDS-PAGE (Figure 15A), mais la concentration a été estimée à 2,5 mg/ml au NanoDrop® ND-1000.



**Figure 15 :** Purification de CD2830m et CD2831mHis

SDS-PAGE acrylamide 10 % (A) Analyse de la production de la protéine CD2830m à partir de pGCD2830m et de sa purification par chromatographie d'affinité avec la GST :

(1) lysat cellulaire total (2) culot cellulaire final (3) lysat cellulaire après centrifugation (4) *Koleidoscope Precision Plus Protein Standard* (5) protéine purifiée CD2830m (6) échantillon du lavage et (7) effluents. **(B)** Analyse de la production de la protéine CD2831His à partir de pTrcHisB-CD2831m et de sa purification par chromatographie d'affinité avec résine Ni-NTA : (1) Effluents (2) protéine purifiée CD2831mHis éluat 1 (3) éluat 2 (4) éluat 3 (5) éluat 4 (6) *Koleidoscope Precision Plus Protein Standard* et (7) Échantillon de lavage avant élution.

La protéine recombinante CD2831mHis a été surexprimée à partir de pTrcHisB-CD281m avec 1mM d'IPTG pendant 2 h. CD2831mHis recombinante a été purifiée par chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA. Les bandes plus foncées, à environ 109 kDa sur le gel qui correspond à la taille de la protéine étiquetée (figure 15), semblent indiquer la présence de la protéine CD2831mHis dans les deux premiers éluats de la purification. Les bandes visibles à 109 kDa pourraient cependant ne pas être la protéine CD2831mHis. Bien que les échantillons recueillis de la protéine recombinante CD2831mHis ne soient pas très purs et que les conditions d'expression et de purification doivent être optimisées, les éluats 1 et 2 ont été utilisés lors de certains essais protéolytiques. Faute de temps, cette partie du projet a été mise de côté, donc, ni l'optimisation de la purification ni la validation à l'aide d'anticorps de la protéine purifiée n'ont été effectuées.

### **3.2.1 Essais protéolytiques avec la protéine CD2830m**

Afin d'investiguer l'activité protéolytique de la protéine recombinante CD2830m, des essais avec des substrats non spécifiques et facilement quantifiables comme l'azocaséine, la caséine et la gélatine ont d'abord été réalisés. Les hypothèses émises sur la protéine CD2830 suggèrent que son activité protéolytique serait zinc-dépendante, et sont basées sur les similarités avec la séquence du domaine catalytique de la protéine LF de *B. anthracis*. Les essais ont donc été réalisés dans plusieurs tampons différents contenant du zinc, ou

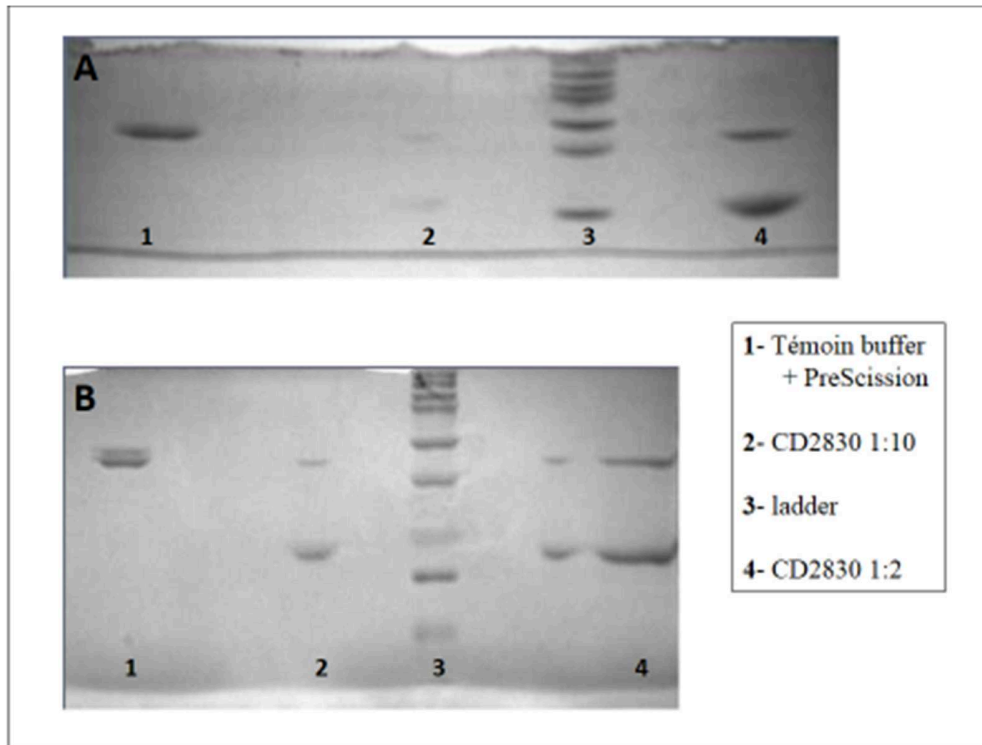


non, ainsi qu'un traitement dans un tampon de repliement qui contenait également du zinc. L'hydrolyse de l'azocaséine est détectable par une coloration jaune (*azo*) au spectrophotomètre à 440 nm. La protéinase K a été utilisée comme témoin positif et a permis de valider les essais avec ce substrat (résultats non montrés). Aucune activité protéolytique n'a été détectée lors de tous les essais avec l'azocaséine en présence ou en absence de zinc (résultats non montrés).

La protéine recombinante CD2830m a été incubée avec 1 % de caséine et 0,08 % de gélatine. Les réactions ont été analysées par SDS-PAGE afin d'observer un profil de digestion. Encore une fois, aucune activité n'a été observée (résultats non montrés).

Les essais protéolytiques ont également été effectués avec des surnageants de culture de *C. difficile* 630  $\Delta$ *erm* et *B. subtilis* MD12 et de l'azocaséine 2 %. Encore une fois aucune activité n'a été détectée pour ce substrat.

Finalement, un zymogramme a été réalisé afin de vérifier l'activité prédite de CD2830 sur CD2831. La protéine recombinante CD2830m a été diluée 1:2 et 1:10, puis déposée sur gels d'acrylamide 10 % contenant de la caséine à 0,05 % ou la protéine recombinante purifiée CD2831mHis tronquée sans aucun traitement dénaturant. L'activité enzymatique a été détectée après 48 heures d'incubation par la coloration des gels au bleu de Coomassie 0,25 %. L'apparition de zone claire indiquerait que la protéine présente dans le gel a été dégradée là où l'enzyme avait migré. Les résultats présentés à la figure 16 ne montrent aucune hydrolyse de la caséine ou de la protéine recombinante CD2831mHis (éluats 1 et 2). La bande plus élevée dans les puits contenant la protéine CD2830m correspond à la *PreScission* présente dans le tampon de clivage lors de la purification de CD2830m. Encore une fois, la protéine recombinante CD2830m ne présente aucune activité protéolytique dans les conditions utilisées lors de ces essais.



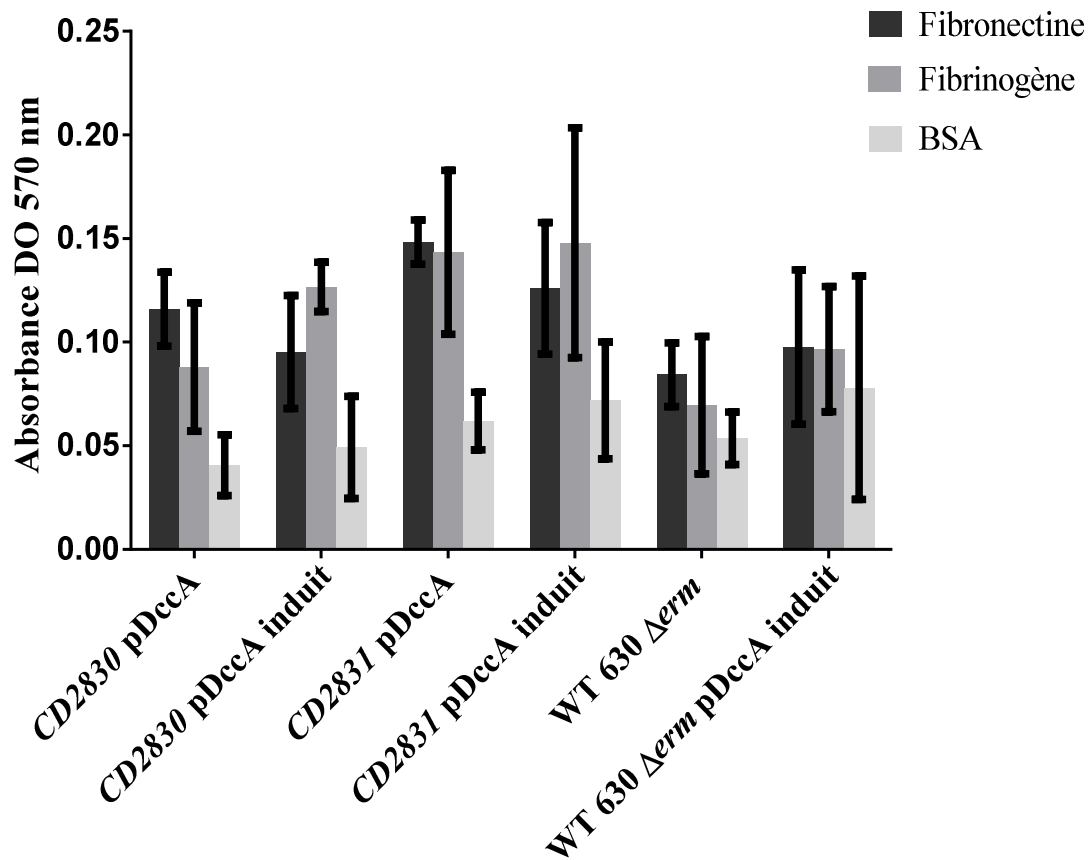
**Figure 16** : Activité de CD2830m recombinante (Zymogramme)

Gel SDS-PAGE en conditions non dénaturantes après incubation de 48 heures pour vérifier l'activité protéolytique de CD2830m recombinante sur la caséine et CD2831. Les gels ont été colorés au Bleu de Coomassie 0,25 %. Le témoin négatif (puit 1) contient le tampon de purification et la *PreScission* utilisée lors de la purification (A) la protéine CD2831 sans peptide signal a été utilisée comme substrat dans le gel. (B) La caséine a été utilisée comme substrat dans le gel.

### 3.2.2 Essais d'adhésion à la fibronectine et au fibrinogène des mutants *CD2830* et *CD2831*

Une étude récente a démontré que la protéine CD2830 de *C. difficile* 630 avait la capacité de cliver la fibronectine et le fibrinogène de plasma humain (Cafardi *et al.*, 2013). Selon les hypothèses émises précédemment dans cette étude, CD2830 et CD2831 pourraient jouer

un rôle dans l'adhésion à la matrice extracellulaire (MEC). Les résultats suivants présentent les essais d'adhésion à la fibronectine et au fibrinogène isolés de plasma humain, des mutants *CD2830* et *CD2831* par rapport à la souche sauvage. Les essais réalisés en plaques ont d'abord été effectués avec des cellules resuspendues dans du tampon PBS. Toutefois, cette méthode réduisait le taux de survie des cellules, car *C. difficile* tolère mal un tel milieu. Les essais d'adhésions ont donc été repris avec des cellules resuspendues dans du BHIS plutôt que du PBS et les résultats sont représentés à la figure 17. Des puits témoins pour chaque substrat ont également été incubés dans les mêmes conditions avec BHIS seul, puis traités selon le protocole pour s'assurer qu'il n'y avait pas d'interactions avec le milieu. Il n'y a pas de différence statistiquement significative dans l'adhésion des différentes souches pour la fibronectine ou le fibrinogène (two-ways ANOVA). Nous observons plus d'adhésion à la fibronectine et au fibrinogène pour les souches *CD2830* et *CD2831* par rapport au BSA. Toutefois, il n'y a pas de différences significatives entre les souches en conditions non induites ou induites (augmentation du niveau de c-di-GMP intracellulaire) pour chacune des conditions. Il n'est également pas possible d'observer une tendance claire dans l'adhésion avec les différentes souches et conditions.

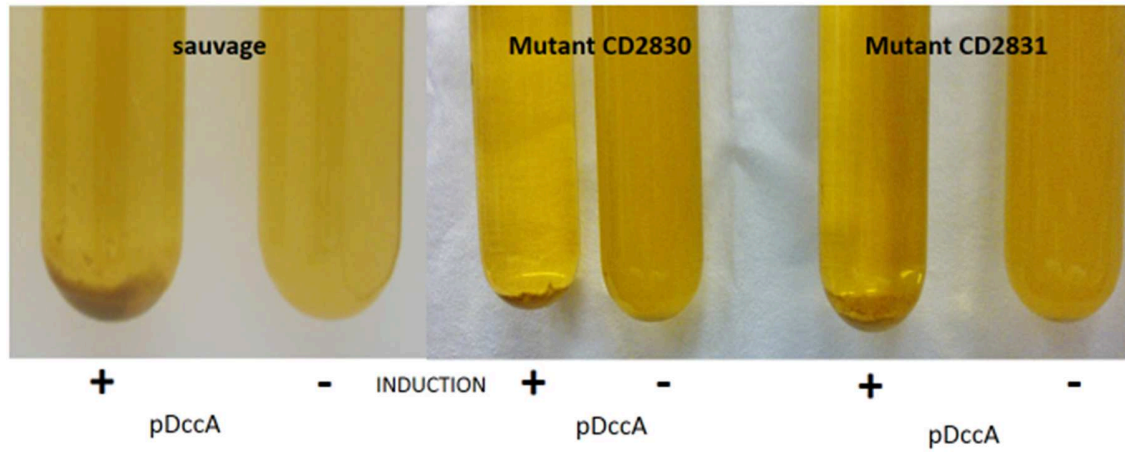


**Figure 17 :** Test d'adhésion en plaque de *CD2830* et *CD2831*

Adhésion des mutants *C. difficile* 630  $\Delta$ erm *CD2830* et *CD2831* à la fibronectine et au fibrinogène fixés en plaque 96 puits. Les cellules ont été ajoutées aux puits contenant 2  $\mu$ g de fibronectine, de fibrinogène et de BSA (contrôle négatif) et ont été incubées 2 h à 37 °C en anaérobie. Les bactéries adhérentes ont été colorées avec 0,1 % de *crystal violet* et quantifiées en mesurant l'absorbance à 570 nm. La solution d'éthanol et acétone 80:20 a été utilisée comme blanc. Les données représentent la moyenne de 3 réplicats biologiques et l'écart type.

### 3.2.3 Investigation du rôle de CD2830 et CD2831 dans l'agrégation bactérienne

Des études antérieures ont démontré que le niveau de c-di-GMP intracellulaire joue un rôle dans la motilité des bactéries et que la surexpression de DccA semble promouvoir l'agrégation des cellules de *C. difficile*. Toutefois, les mécanismes impliqués dans ce processus sont encore inconnus (Purcell *et al.*, 2012). Des expériences d'agrégation bactérienne avec les mutants *CD2830* et *CD2831* ont été réalisées afin d'investiguer si l'un ou l'autre de ces gènes pouvait avoir un rôle dans l'agrégation des cellules lorsqu'on fait varier le niveau de c-di-GMP intracellulaire. Les essais ont été réalisés avec des cultures liquides de 16 h des souches sauvages, *CD2830* et *CD2831* contenant pDccA en condition induite avec 1 µg/mL de nisine ou non. Pour chaque condition, la densité optique à 600 nm des cultures a été mesurée. Cela nous a permis de comparer les différents niveaux d'agrégation des cellules après la période d'incubation, et suite à un traitement au vortex pour comparer la densité cellulaire de chaque culture. *CD2830* et *CD2831* présentent des phénotypes semblables à celui de la souche sauvage lorsqu'on induit la surexpression de DccA. On remarque la présence d'un culot cellulaire et une  $DO_{600\text{ nm}}$  de ~ 0,2 après la période d'incubation de 16 h (figure 18). Il n'y a pas de différence observable dans l'agrégation entre les différents mutants et la souche sauvage. Ces résultats suggèrent que les protéines CD2830 et CD2831 ne semblent pas jouer un rôle dans l'agrégation modulée par le c-di-GMP dans les conditions de cultures utilisées.



**Figure 18** : Essais d'agrégation de *CD2830* et *CD2831*

Cultures de 16 heures des souches : sauvage, *CD2830* et *CD2831* de *C. difficile* 630  $\Delta$ *erm*, en présence ou non de nisine pour l'induction de pDccA. Les culots cellulaires sont présents dans toutes les cultures en conditions induites et ne présentent pas de différence notable.

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION

Les objectifs de cette étude étaient de déterminer la régulation de l'expression des gènes CD2830 et CD2831 par les riborégulateurs à c-di-GMP prédits ainsi que déterminer la fonction et évaluer l'importance des protéines CD2830 et CD2831 chez *C. difficile*. Les résultats qui répondent aux objectifs cités ci-haut seront discutés dans ce chapitre en deux grandes sections.

#### **4.1 Implication du c-di-GMP dans la régulation de l'expression des protéines CD2830 et CD2831**

La molécule de c-di-GMP est impliquée dans plusieurs voies de signalisation qui contrôlent des fonctions biologiques essentielles chez les bactéries, telles que le passage de l'état motile au biofilm ou l'expression de gènes de virulences. Un grand nombre de protéines responsables du niveau de c-di-GMP intracellulaire ont été prédites chez *C. difficile* (Bordeleau *et al.*, 2011), ce qui suggère un rôle important de la molécule chez ce pathogène. La présence de 12 riborégulateurs à c-di-GMP de type I avec un domaine conservé GEMM RNA et 4 riborégulateurs à c-di-GMP de type II avec un motif d'activité ribozyme d'auto-clivage allostérique, ont été prédit chez *C. difficile* (tableau 1) (Lee *et al.*, 2010; Sudarsan *et al.*, 2008). Des riborégulateurs à c-di-GMP de type I et de type II sont situés en aval des gènes CD2830 et CD2831 respectivement.

L'étude de la régulation de ces deux gènes par RT-qPCR a permis de démontrer qu'en conditions élevées de c-di-GMP intracellulaire, l'expression du gène CD2831 augmente de

72 à 96 fois, tandis que l'expression du gène CD2830 diminue de 23 à 29 fois. Ces résultats suggèrent que le c-di-GMP contrôlerait de façon opposée la régulation de l'expression de ces deux gènes via leurs riborégulateurs. L'absence de différence significative entre l'expression de l'aptamère et l'expression du gène en présence de différentes concentrations de c-di-GMP intracellulaire pourrait suggérer que la molécule agit surtout au niveau du promoteur, mais pourrait également s'expliquer par une demi-vie plus grande de la structure d'ARN lorsque le c-di-GMP y est lié. Une étude publiée récemment avait observé des transcrits plus courts par immunobuvardage de type *Northern* en conditions élevés de c-di-GMP et suggère que ces bandes correspondent aux transcrits interrompus clivés pour le riborégulateur à c-di-GMP de type I transcrit (en amont de CD2830) Cdi1\_12 (Soutourina *et al.*, 2013). Ils ont également observé des transcrits plus courts pour le riborégulateur à c-di-GMP de type II (en amont de CD2831) Cdi2\_3, lorsque le niveau de c-di-GMP est faible et suggèrent donc que la traduction des ARNm peut être inhibée et peut mener à la déstabilisation des transcrits. Ces résultats supportent également l'hypothèse de départ qui proposait que les niveaux intracellulaires de c-di-GMP modulent la transcription de CD2830 et CD2831 via les riborégulateurs à c-di-GMP en amont de ces deux gènes. Comme décrit plus haut, un niveau de c-di-GMP intracellulaire plus élevé provoque un effet inverse sur la régulation de CD2830 et CD2831 selon le type de riborégulateurs à c-di-GMP. Il semble que le riborégulateur Cdi1\_12, soit « *OFF* » lorsque les niveaux de c-di-GMP sont élevés tandis que le riborégulateur Cdi2\_3 soit quant à lui « *ON* » en présence du ligand. Un tel fonctionnement avait été décrit par Sudarsan *et al.* (2008) pour les riborégulateurs à c-di-GMP de *V. cholerae*, Vc1 en amont du gène *gbpA* codant pour une protéine de liaison à la chitine impliquée lors de l'infection (Kirn *et al.*, 2005) et Vc2 en amont du gène *VC1722* codant pour une protéine analogue à un facteur de transcription connu et impliqué dans la compétence cellulaire (Meibom *et al.*, 2005). En concentration intracellulaire élevée de c-di-GMP, l'expression du gène *gbpA* diminue, tandis que l'expression du gène *VC1722* augmente, (Sudarsan *et al.*, 2008).

Dans le but de vérifier si les deux types de riborégulateurs régulent la transcription des gènes CD2830 et CD2831 en aval, des fusions transcriptionnelles du gène *lacZ* en aval des



riborégulateurs Rb2830 et Rb2831 ont été construites. En surexprimant une DGC, l'excès de c-di-GMP devrait lier l'aptamère du riborégulateur à c-di-GMP de type I et interrompre ainsi la transcription du gène *lacZ* ou du riborégulateur à c-di-GMP de type II et permettre la transcription du gène *lacZ*. En concentration élevée de c-di-GMP intracellulaire, l'expression de la  $\beta$ -galactosidase diminue sous le contrôle du riborégulateur à c-di-GMP de type I en amont de CD2830 et augmente sous le contrôle du riborégulateur à c-di-GMP de type II en amont de CD2831. Ces résultats suggèrent que les riborégulateurs à c-di-GMP de type I et de type II régulent la transcription des gènes CD2830 et CD2831 de façon opposée en fonction des concentrations de c-di-GMP intracellulaire. Ces résultats concordent également avec les résultats de RT-qPCR discutés plus haut.

À la lumière de ce qui a été observé et de nombreuses études qui démontrent l'implication du c-di-GMP dans la régulation de processus biologiques importants chez plusieurs bactéries, il est fortement envisageable que la fonction des gènes CD2830 et CD2831 soit reliée et impliquée dans des mécanismes microbiens essentiels comme par exemple le passage des bactéries motiles vers un état plus stationnaire ou encore la régulation de facteurs de virulences impliqués dans la colonisation de l'hôte.

#### **4.2 Fonction des protéines CD2830 et CD2831**

Le pathogène *C. difficile* possède un bon nombre de protéines qui font partie de l'arsenal de facteurs de virulence jouant un rôle dans l'adhésion ou la dégradation de certaines composantes de la paroi intestinale lors de la colonisation. Parmi ces protéines, seulement une minorité a été à ce jour identifiée et caractérisée. L'analyse du sécrétome de *C. difficile* (Boetzkes *et al.*, 2012) a permis d'identifier plusieurs protéines de fonction inconnue se retrouvant dans le surnageant de culture. L'identification et la caractérisation de ces protéines sécrétées chez *C. difficile* permettent de mieux comprendre les mécanismes avec

lesquels la bactérie interagit avec son hôte. Certaines de ces protéines sécrétées pourraient également être susceptibles de jouer un rôle dans les processus d'infection.

#### **4.2.1 Activité protéolytique de la zinc-métalloprotéase CD2830**

Parmi les protéines sécrétées, on retrouve entre autres une protéine de 24,3 kDa, CD2830 présente chez la souche 630 de *C. difficile* (Boetzkes, 2012). Selon des analyses bio-informatiques, la protéine CD2830 contiendrait un domaine zinc-métalloprotéase (Pruitt *et al.*, 2007). De plus, une modélisation tridimensionnelle de la protéine et les données de cristallographie de la partie catalytique C-terminale de la toxine LF de *B. anthracis* (Pannifer *et al.*, 2001) ont permis de démontrer que les acides aminés qui coordonnent les ions de zinc dans le site catalytique de la protéine LF de *B. anthracis* semblent conservés et bien orientés dans la protéine CD2830. Afin d'étudier la fonction prédite de la protéine CD2830 de *C. difficile*, celle-ci devait être produite et purifiée dans des conditions optimales pour conserver son activité. La première stratégie permettait de surexprimer la protéine intacte dans *B. subtilis* et de purifier la protéine recombinante active à partir du surnageant de culture. Cette stratégie avait été choisie en raison du peptide signal prédit en N-terminal de la protéine CD2830.

Malgré l'optimisation des conditions de cultures, le changement de vecteur d'expression et l'utilisation de différentes souches, l'expression de la protéine recombinante CD2830 dans *B. subtilis* s'est avérée impossible. La protéine, en totalité ou en partie avec l'étiquette FLAG, n'a pas pu être détectée par immunobuvardage dans aucune des fractions cellulaires. Donc bien que peu plausible, la protéine n'était peut-être pas sécrétée via les systèmes de sécrétion de *B. subtilis* ou tout simplement dégradée. Le problème peut également se situer au niveau de la transcription ou de la traduction de la protéine, mais par souci de temps, l'investigation n'a pas été poussée plus loin et la méthode a été abandonnée.

La protéine recombinante CD2830m a été surexprimée à partir de pGCD2830m dans *E. coli* BL21, puis purifiée par chromatographie d'affinité avec la protéine fusion GST. Cette méthode a permis de produire une concentration assez importante de la protéine recombinante CD2830m pour procéder aux essais protéolytiques, afin de cibler un potentiel substrat ou des sites de clivage préférentiel. Tous les essais protéolytiques effectués lors de cette étude n'ont pas permis d'identifier le substrat de la protéine CD2830. Les résultats publiés par Hensbergen *et al.* (2014) joints aux résultats néanmoins peu concluants de notre étude, ont permis de caractériser la protéine CD2830 et de confirmer nos hypothèse de départ; la protéine CD2830 est une métalloprotéase sécrétée avec une activité protéolytique sur deux protéines d'adhésion, dont CD2831. Elle possède également une préférence pour les sites riches en prolines (Hensbergen *et al.*, 2014).

#### **4.2.2 Rôle dans l'adhésion ou la dégradation de composantes de la MEC**

Comme les résultats précédents n'avaient pas permis d'observer l'activité prédite de CD2830, des essais d'adhésion ont été effectués avec les mutants *CD2830* et *CD2831*. Selon les prédictions de départ, CD2830 a une activité zinc-métalloprotéase et CD2831 semble être une adhésine. Plusieurs bactéries sécrètent des zinc-métalloprotéases qui jouent un rôle dans la pathogenèse. Les cibles de ces enzymes varient beaucoup, mais certaines de ces métalloprotéases ont démontré leur capacité à dégrader des composantes de la matrice extracellulaire (MEC) comme les collagènes et la fibronectine (Häse & Finkelstein, 1993). De plus, les adhésines sont également impliquées dans de tels mécanismes et peuvent se lier aux composantes de la MEC (Klemm & Schembri, 2000; Westerlund & Korhonen, 1993). Parmi les nombreuses protéines qui composent la MEC, la fibronectine est une glycoprotéine présente sous forme soluble ou cellulaire dans la MEC des cellules épithéliales. Plusieurs adhésines capables de lier la fibronectine chez les bactéries à Gram positif ont été caractérisées (King *et al.*, 2011). Les essais d'adhésion effectués par ce

groupe de recherche pour vérifier les propriétés d'adhésion d'une protéine de la bactérie à Gram positif *Staphylococcus saprophyticus*, ont permis d'observer des différences d'adhésion entre la souche sauvage et leur mutants. Nous avons effectué les mêmes essais avec les mutants *CD2830*, *CD2831* et la souche sauvage afin de vérifier si les protéines *CD2830* et *CD2831* sont impliquées dans l'adhésion à la fibronectine ou au fibrinogène (composantes de la MEC) comme suggéraient certaines hypothèses de cette étude. Malheureusement, l'absence des protéines *CD2830* et *CD2831* ne semblent pas modifier les propriétés d'adhésion de *C. difficile* à la fibronectine ou au fibrinogène. Les différentes concentrations intracellulaires en c-di-GMP ne semblent pas non plus affecter l'adhésion cellulaire d'aucune des souches dans les conditions utilisées lors de ces essais. On remarque bel et bien une tendance d'adhésion accrue pour toutes les souches pour la fibronectine et le fibrinogène par rapport au BSA (témoin négatif) indépendamment des niveaux de c-di-GMP. Les tests statistiques (*two-ways ANOVA*) démontrent clairement qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative d'adhésion entre la souche sauvage et les mutants *CD2830* et *CD2831* dans les conditions utilisées. Le c-di-GMP ne semble pas avoir d'implication dans l'adhésion à la fibronectine et au fibrinogène chez *C. difficile*, du moins dans les conditions de cette étude. Cependant, une étude réalisée par Cafardi *et al.* (2013) a démontré que *CD2830* avait une activité protéolytique zinc dépendante sur la fibronectine et la chaîne B $\beta$  du fibrinogène, mais pas sur d'autres substrats tels la caséine ou sur les types de collagène utilisés lors de leurs essais. En accord avec nos prédictions de départ, ils ont également démontré l'activité zinc dépendante de cette métalloprotéase en effectuant des mutations dans le motif conservé HEXXH, important pour l'activité des métalloprotéases. De cette façon, ils ont identifié le résidu H146, nécessaire pour la liaison du Zn<sup>2+</sup>. La zinc-métalloprotéase *CD2830* a alors été appelé Zmp1 par ce groupe.

#### **4.2.3 Rôle de *CD2830* et *CD2831* dans l'agrégation des cellules**

L'implication du c-di-GMP dans la régulation des changements de mode de vie bactérien tels que la motilité vers la formation de biofilm, suggère que *CD2830* et *CD2831*, dont

l'expression est régulée par le c-di-GMP, seraient impliquées dans de tels processus. Des essais d'agrégation ont été effectués pour vérifier si CD2830 et CD2831 participaient à ce phénomène. Les mutants *CD2830* et *CD2831* ne présentaient pas de différences phénotypiques par rapport à la souche sauvage pour les différentes concentrations de c-di-GMP. Les protéines CD2830 et CD2831 ne semblent pas avoir de rôle dans l'agrégation modulée par le c-di-GMP dans les conditions de cultures effectuées.

La fonction de la protéine CD2831 n'a pas pu être bien caractérisée lors de cette étude. De plus amples expériences devront être effectuées afin de mieux comprendre le rôle de cette protéine dans le modèle proposé. Notamment, l'utilisation de bactéries possédant peu de protéines de surface, comme *Lactococcus lactis*, pour la surexpression de la protéine CD2831 lors d'essais d'adhésion avec des cellules épithéliales, pourraient permettre de mieux évaluer le potentiel d'adhésion de cette protéine.

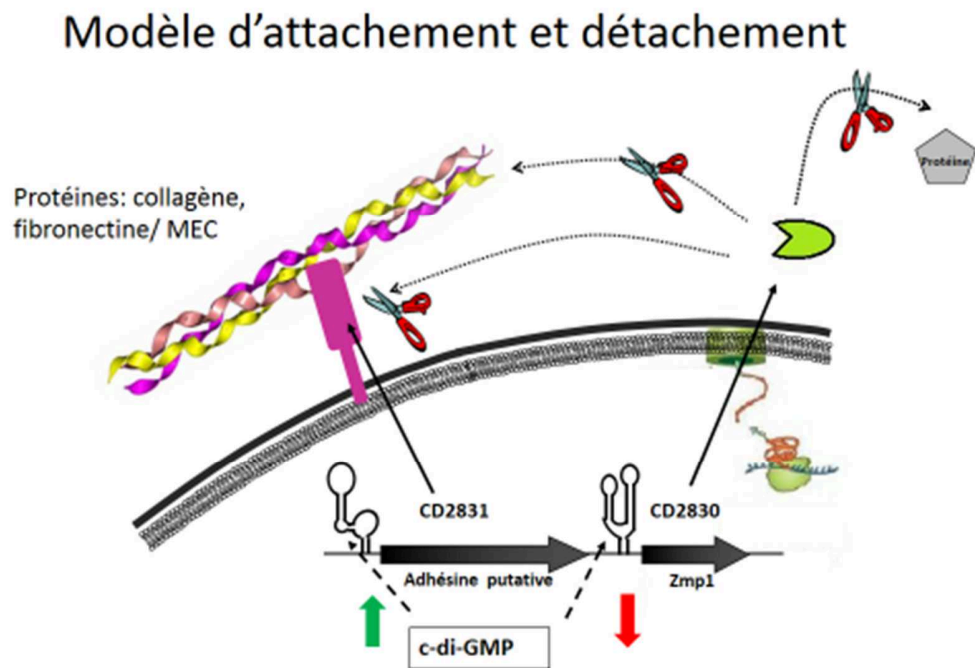
L'adhésion aux cellules de l'hôte ainsi que le clivage de protéines d'adhésion sont des mécanismes décrits chez plusieurs pathogènes afin de contrôler l'adhésion cellulaire lors de processus biologiques importants tels la colonisation (King *et al.*, 2011; Maeda & Yamamoto, 1996; Singh *et al.*, 2001). Les résultats des différentes études ont démontré l'activité de la zinc-métalloprotéase Zmp1 et suggèrent que son rôle soit impliqué, comme chez plusieurs autres pathogènes, dans les mécanismes qui permettent à la bactérie de se détacher lors de la colonisation par exemple.

## CONCLUSION

Cette étude visait à répondre aux objectifs suivants : 1) Déterminer la régulation de l'expression des gènes CD2830 et CD2831 par des riborégulateurs c-di-GMP prédits et 2) Déterminer la fonction et évaluer l'importance des protéines CD2830 et CD2831 chez *C. difficile*.

Les résultats présentés dans cette étude suggèrent que le c-di-GMP est impliqué dans la régulation de l'expression de CD2830 et CD2831, plus précisément au niveau transcriptionnel. Bien que ces résultats doivent être validés, il semble que la transcription des gènes CD2830 et CD2831 soit régulée de façon inversée par des riborégulateurs à c-di-GMP chez *C. difficile* 630  $\Delta$ erm. Lorsque le niveau de c-di-GMP intracellulaire est élevé dans la cellule, celui-ci semble lier le riborégulateur à c-di-GMP de type I et empêcher, du moins réduire, la transcription du gène CD2830. Tandis qu'à l'inverse, il augmente l'expression de CD2831 en liant le riborégulateur à c-di-GMP de type II. L'investigation de la fonction des protéines CD2830 et CD2831 s'est avérée fastidieuse. Les essais effectués avec la protéine recombinante CD2830m n'ont pas permis d'observer l'activité protéolytique prédite. La protéine CD2831 n'a pas été purifiée de façon efficace et tous les essais qui ont été effectués avec celle-ci se sont avérés non concluants. Les mutants d'insertion *CD2830* et *CD2831* n'ont pas permis d'observer un phénotype d'agrégation différent par rapport à la souche sauvage dans les conditions de cultures utilisées. L'adhésion à la fibronectine ou au fibrinogène des mêmes mutants n'est pas significativement différente par rapport à l'adhésion de la souche sauvage, lorsque le niveau de c-di-GMP intracellulaire augmente. Ces résultats ne nous permettent pas d'associer le c-di-GMP à un phénotype d'adhésion ni de déterminer le rôle que pourrait avoir CD2830 ou CD2831 dans ce même phénotype dans les conditions utilisées. Les dernières études publiées ont toutefois permis de valider nos hypothèses de départ. Elles ont démontré que CD2830 était une zinc-métalloprotéase avec une activité sur la fibronectine et le fibrinogène de plasma humain (Cafardi *et al.*, 2013). L'activité avait la

capacité de cliver une protéine extracellulaire soit la protéine CD2831 (Hensbergen *et al.*, 2014). Les dernières publications sur la caractérisation de la zinc-métalloprotéase Zmp1 (CD2830) ainsi que l'analyse de l'expression des gènes CD2830 et CD2831 présentée lors de cette étude semblent appuyer le modèle d'attachement/détachement illustré ci-dessous (figure 19). C'est-à-dire qu'un niveau intracellulaire élevé en c-di-GMP pourrait permettre l'expression de CD2831 et donc l'attachement de la bactérie à son hôte. Puis, lorsque les niveaux de c-di-GMP diminuent, Zmp1 (CD2830) participerait au détachement de la bactérie en clivant les motifs (préférentiellement riche en proline) des différentes protéines qui participent à l'attachement, dont CD2831. Plusieurs aspects restent encore à approfondir afin de comprendre l'importance de ces deux protéines dans l'adhésion et la motilité. Une étude plus poussée dans un contexte d'infection permettrait une meilleure compréhension de l'implication de ces protéines dans la pathogenèse de *C. difficile*.



**Figure 19 :** Modèle prédit d'attachement et détachement des protéines CD2830 et CD2831  
 En concentration élevée de c-di-GMP, la protéine CD2831 (adhésine putative) va être exprimée puis sécrétée. Ancrée dans la paroi cellulaire par son motif LPXTG, la protéine va lier une composante de la MEC. Lorsque le niveau de c-di-GMP diminue, la protéine Zmp1 (CD2830) va être exprimée puis sécrétée et va aller cliver les protéines de la MEC

ou encore la protéine CD2831 qui va permettre le détachement de la bactérie. L'expression des gènes est modulée par les niveaux c-di-GMP intracellulaires via leurs riborégulateurs respectifs en amont.



## BIBLIOGRAPHIE

- Amikam, D., & Galperin, M. Y. (2006). PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* 22(1), 3-6.
- Barketi-Klai, A., Hoys, S., Lambert-Bordes, S., Collignon, A., & Kansau, I. (2011). Role of fibronectin-binding protein A in *Clostridium difficile* intestinal colonization. *J Med Microbiol.* 60(Pt 8), 1155-1161.
- Bartlett, J. G. (2008). Historical perspectives on studies of *Clostridium difficile* and *C. difficile* infection. *Clin. Infect. Dis.* 46 *Suppl 1*, S4-11.
- Bastet, L., Dubé, A., Massé, E., & Lafontaine, D. A. (2011). New insights into riboswitch regulation mechanisms. *Mol Microbio.* 80(5), 1148-1154.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., *et al.* (2013). GenBank. *Nucleic Acids Res.* 41(Database issue), D36-42.
- Boetzkes, A., Felkel, K. W., Zeiser, J., Jochim, N., Just, I., & Pich, A. (2012). Secretome analysis of *Clostridium difficile* strains. *Arch Microbiol.* 194(8), 675-687.
- Bordeleau, E., Fortier, L. C., Malouin, F., & Burrus, V. (2011). c-di-GMP turn-over in *Clostridium difficile* is controlled by a plethora of diguanylate cyclases and phosphodiesterases. *PLoS Genet.* 7(3), e1002039.
- Borriello, S. P. (1998). Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother.* 41 *Suppl C*, 13-19.
- Breaker, R. R. (2008). Complex riboswitches. *Science* 319(5871), 1795-1797.
- Burge, S. W., Daub, J., Eberhardt, R., Tate, J., Barquist, L., Nawrocki, E. P., *et al.* (2013). Rfam 11.0: 10 years of RNA families. *Nucleic Acids Res.* 41(Database issue), D226-232.
- Burholder, P. R., & Giles, N. H. (1947). Induced biochemical mutations in *Bacillus subtilis*. *Am J Bot* 34(6), 345-348.
- Cafardi, V., Biagini, M., Martinelli, M., Leuzzi, R., Rubino, J. T., Cantini, F., *et al.* (2013). Identification of a novel zinc metalloprotease through a global analysis of *Clostridium difficile* extracellular proteins. *PLoS One* 8(11), e81306.
- Calabi, E., Calabi, F., Phillips, A. D., & Fairweather, N. F. (2002). Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. *Infect. Immun.* 70(10), 5770-5778.

- Calabi, E., Ward, S., Wren, B., Paxton, T., Panico, M., Morris, H., *et al.* (2001). Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*. *Mol Microbiol.* 40(5), 1187-1199.
- Carrion, A. F., Hosein, P. J., Cooper, E. M., Lopes, G., Pelaez, L., & Rocha-Lima, C. M. (2010). Severe colitis associated with docetaxel use: A report of four cases. *World J. Gastrointest. Oncol.* 2(10), 390-394.
- Carter, G. P., Rood, J. I., & Lyras, D. (2010). The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile*-associated disease: Past and present perspectives. *Gut Microbes* 1(1), 58-64.
- Carter, G. P., Rood, J. I., & Lyras, D. (2012). The role of toxin A and toxin B in the virulence of *Clostridium difficile*. *Trends Microbiol.* 20(1), 21-29.
- Casadaban, M. J., & Cohen, S. N. (1980). Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 138(2), 179-207.
- Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N. C., Giese, B., Jenal, U., *et al.* (2004). Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101(49), 17084-17089.
- Chin, K. H., Lee, Y. C., Tu, Z. L., Chen, C. H., Tseng, Y. H., Yang, J. M., *et al.* (2010). The cAMP receptor-like protein CLP is a novel c-di-GMP receptor linking cell-cell signaling to virulence gene expression in *Xanthomonas campestris*. *J. Mol. Biol.* 396(3), 646-662.
- Christen, B., Christen, M., Paul, R., Schmid, F., Folcher, M., Jenoe, P., *et al.* (2006). Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *J. Biol. Chem.* 281(42), 32015-32024.
- Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A., & Jenal, U. (2005). Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J. Biol. Chem.* 280(35), 30829-30837.
- Cutting, S. M., & Hardwood, C. R. (1990). Molecular biological methods for *Bacillus*.
- D'Argenio, D. A., & Miller, S. I. (2004). Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology* 150(Pt 8), 2497-2502.
- Dingle, T. C., Mulvey, G. L., & Armstrong, G. D. (2011). Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters. *Infect. Immun.* 79(10), 4061-4067.
- Eveillard, M., Fourel, V., Barc, M. C., Kernéis, S., Coconnier, M. H., Karjalainen, T., *et al.* (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(3), 371-381.
- Galperin, M. Y. (2004). Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ. Microbiol.* 6(6), 552-567.
- Gibson, D. G., & Christopher, V. (2011). Chapter fifteen - Enzymatic Assembly of Overlapping DNA Fragments *Methods in Enzymology Vol. Volume 498*, 349-361.
- Govind, R., & Dupuy, B. (2012). Secretion of *Clostridium difficile* toxins A and B requires the holin-like protein TcdE. *PLoS Pathog.* 8(6).
- Guérout-Fleury, A. M., Frandsen, N., & Stragier, P. (1996). Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* 180(1-2), 57-61.
- Heap, J. T., Pennington, O. J., Cartman, S. T., Carter, G. P., & Minton, N. P. (2007). The Clostron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *Journal of Microbiological Methods* 70(3), 452-464.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Genome Biol* 8(2), R19.
- Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 7(4), 263-273.
- Hensbergen, P. J., Klychnikov, O. I., Bakker, D., van Winden, V. J., Ras, N., Kemp, A. C., et al. (2014). A Novel Secreted Metalloprotease (CD2830) from *Clostridium difficile* Cleaves Specific Proline Sequences in LPXTG Cell Surface Proteins. *Mol. Cell Proteomics* 13(5), 1231-1244.
- Hickman, J. W., & Harwood, C. S. (2008). Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol. Microbiol.* 69(2), 376-389.
- Hussain, H. A., Roberts, A. P., & Mullany, P. (2005). Generation of an erythromycin-sensitive derivative of *Clostridium difficile* strain 630 (630Deltaerm) and demonstration that the conjugative transposon Tn916DeltaE enters the genome of this strain at multiple sites. *J. Med. Microbiol.* 54(Pt 2), 137-141.
- Häse, C. C., & Finkelstein, R. A. (1993). Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. *Microbiol Rev.* 57(4), 823-837.

- Janoir, C., Péchiné, S., Grosdidier, C., & Collignon, A. (2007). Cwp84, a surface-associated protein of *Clostridium difficile*, is a cysteine protease with degrading activity on extracellular matrix proteins. *J. Bacteriol.* *189*(20), 7174-7180.
- Jenal, U., & Malone, J. (2006). Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* *40*, 385-407.
- Kaltwasser, M., Wiegert, T., & Schumann, W. (2002). Construction and application of epitope- and green fluorescent protein-tagging integration vectors for *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* *68*(5), 2624-2628.
- Karjalainen, T., Waligora-Dupriet, A. J., Cerquetti, M., Spigaglia, P., Maggioni, A., Mauri, P., et al. (2001). Molecular and genomic analysis of genes encoding surface-anchored proteins from *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* *69*(5), 3442-3446.
- Kearns, D. B., & Losick, R. (2005). Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* *19*(24), 3083-3094.
- King, N. P., Beatson, S. A., Totsika, M., Ulett, G. C., Alm, R. A., Manning, P. A., et al. (2011). UafB is a serine-rich repeat adhesin of *Staphylococcus saprophyticus* that mediates binding to fibronectin, fibrinogen and human uroepithelial cells. *Microbiology* *157*(Pt 4), 1161-1175.
- Kirn, T. J., Jude, B. A., & Taylor, R. K. (2005). A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. *Nature* *438*(7069), 863-866.
- Klemm, P., & Schembri, M. A. (2000). Bacterial adhesins: function and structure. *Int. J. Med. Microbiol* *290*(1), 27-35.
- Kuehne, S. A., Cartman, S. T., Heap, J. T., Kelly, M. L., Cockayne, A., & Minton, N. P. (2010). The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. *Nature* *467*(7316), 711-713.
- Kuijper, E. J., Coignard, B., Tüll, P., difficile, E. S. G. f. C., States, E. M., & Control, E. C. f. D. P. a. (2006). Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* *12 Suppl 6*, 2-18.
- Lee, E. R., Baker, J. L., Weinberg, Z., Sudarsan, N., & Breaker, R. R. (2010). An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger. *Science* *329*(5993), 845-848.
- Lessa, F. C., Gould, C. V., & McDonald, L. C. (2012). Current status of *Clostridium difficile* infection epidemiology. *Clin. Infect. Dis.* *55 Suppl 2*, S65-70.

- Liu, N., Pak, T., & Boon, E. M. (2010). Characterization of a diguanylate cyclase from *Shewanella woodyi* with cyclase and phosphodiesterase activities. *Mol. Biosyst.* 6(9), 1561-1564.
- Lukomski, S., Montgomery, C. A., Rurangirwa, J., Geske, R. S., Barrish, J. P., Adams, G. J., et al. (1999). Extracellular cysteine protease produced by *Streptococcus pyogenes* participates in the pathogenesis of invasive skin infection and dissemination in mice. *Infect. Immun.* 67(4), 1779-1788.
- Lyras, D., O'Connor, J. R., Howarth, P. M., Sambol, S. P., Carter, G. P., Phumoonna, T., et al. (2009). Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature* 458(7242), 1176-1179.
- Maeda, H., & Yamamoto, T. (1996). Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 377(4), 217-226.
- Malone, J. G., Williams, R., Christen, M., Jenal, U., Spiers, A. J., & Rainey, P. B. (2007). The structure-function relationship of WspR, a *Pseudomonas fluorescens* response regulator with a GGDEF output domain. *Microbiology* 153(Pt 4), 980-994.
- McKee, R. W., Mangalea, M. R., Purcell, E. B., Borchardt, E. K., & Tamayo, R. (2013). The second messenger cyclic Di-GMP regulates *Clostridium difficile* toxin production by controlling expression of sigD. *J. Bacteriol.* 195(22), 5174-5185.
- Meibom, K. L., Blokesch, M., Dolganov, N. A., Wu, C. Y., & Schoolnik, G. K. (2005). Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science* 310(5755), 1824-1827.
- Mills, E., Pultz, I. S., Kulasekara, H. D., & Miller, S. I. (2011). The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. *Cell Microbiol* 13(8), 1122-1129.
- Newell, P. D., Monds, R. D., & O'Toole, G. A. (2009). LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106(9), 3461-3466.
- Pannifer, A. D., Wong, T. Y., Schwarzenbacher, R., Renatus, M., Petosa, C., Bienkowska, J., et al. (2001). Crystal structure of the anthrax lethal factor. *Nature* 414(6860), 229-233.
- Paul, R., Weiser, S., Amiot, N. C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B., et al. (2004). Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev* 18(6), 715-727.

- Perutka, J., Wang, W., Goerlitz, D., & Lambowitz, A. M. (2004). Use of computer-designed group II introns to disrupt *Escherichia coli* DExH/D-box protein and DNA helicase genes. *J. Mol. Biol.* 336(2), 421-439.
- Poilane, I., Karjalainen, T., Barc, M. C., Bourlioux, P., & Collignon, A. (1998). Protease activity of *Clostridium difficile* strains. *Can. J. Microbiol.* 44(2), 157-161.
- Poutanen, S. M., & Simor, A. E. (2004). *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *CMAJ* 171(1), 51-58.
- Pratt, J. T., Tamayo, R., Tischler, A. D., & Camilli, A. (2007). PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. *J. Biol. Chem.* 282(17), 12860-12870.
- Pruitt, K. D., Tatusova, T., & Maglott, D. R. (2007). NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res.* 35(Database issue), D61-65.
- Purcell, E. B., McKee, R. W., McBride, S. M., Waters, C. M., & Tamayo, R. (2012). Cyclic diguanylate inversely regulates motility and aggregation in *Clostridium difficile*. *J. Bacteriol.* 194(13), 3307-3316.
- Purdy, D., O'Keefe, T. A., Elmore, M., Herbert, M., McLeod, A., Bokori-Brown, M., *et al.* (2002). Conjugative transfer of clostridial shuttle vectors from *Escherichia coli* to *Clostridium difficile* through circumvention of the restriction barrier. *Mol Microbiol.* 46(2), 439-452.
- Péchiné, S., Janoir, C., & Collignon, A. (2005). Variability of *Clostridium difficile* surface proteins and specific serum antibody response in patients with *Clostridium difficile*-associated disease. *J. Clin. Microbiol.* 43(10), 5018-5025.
- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., *et al.* (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* 325(6101), 279-281.
- Rupnik, M., Wilcox, M. H., & Gerding, D. N. (2009). *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 7(7), 526-536.
- Ryan, R. P., Fouhy, Y., Lucey, J. F., & Dow, J. M. (2006). Cyclic di-GMP signaling in bacteria: recent advances and new puzzles. *J. Bacteriol.* 188(24), 8327-8334.
- Ryjenkov, D. A., Simm, R., Römling, U., & Gomelsky, M. (2006). The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J. Biol. Chem.* 281(41), 30310-30314.

- Römling, U., & Amikam, D. (2006). Cyclic di-GMP as a second messenger. *Curr. Opin. Microbiol.* 9(2), 218-228.
- Römling, U., Gomelsky, M., & Galperin, M. Y. (2005). C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol. Microbiol.* 57(3), 629-639.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). The inoue method for preparation and transformation of competent e. Coli: "ultra-competent" cells. *CSH Protoc.* 2006(1).
- Schirmer, T., & Jenal, U. (2009). Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nat. Rev. Microbiol.* 7(10), 724-735.
- Schmidt, A. J., Ryjenkov, D. A., & Gomelsky, M. (2005). The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J. Bacteriol.* 187(14), 4774-4781.
- Shanahan, C. A., Gaffney, B. L., Jones, R. A., & Strobel, S. A. (2011). Differential analogue binding by two classes of c-di-GMP riboswitches. *J. Am. Chem. Soc.* 133(39), 15578-15592.
- Shaw, L., Golonka, E., Potempa, J., & Foster, S. J. (2004). The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 150(Pt 1), 217-228.
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimitz, M., & Römling, U. (2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* 53(4), 1123-1134.
- Singh, B., Fleury, C., Jalalvand, F., & Riesbeck, K. Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host. *FEMS microbiology reviews* 36 (6), 1122-1180.
- Snyder, E. E., Kampanya, N., Lu, J., Nordberg, E. K., Karur, H. R., Shukla, M., *et al.* (2007). PATRIC: the VBI PathoSystems Resource Integration Center. *Nucleic Acids Res.* 35(Database issue), D401-406.
- Soutourina, O. A., Monot, M., Boudry, P., Saujet, L., Pichon, C., Sismeiro, O., *et al.* (2013). Genome-wide identification of regulatory RNAs in the human pathogen *Clostridium difficile*. *PLoS Genet.* 9(5), e1003493.
- Sudarsan, N., Lee, E. R., Weinberg, Z., Moy, R. H., Kim, J. N., Link, K. H., *et al.* (2008). Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* 321(5887), 411-413.
- Sára, M., & Sleytr, U. B. (2000). S-Layer proteins. *J. Bacteriol.* 182(4), 859-868.

- Tal, R., Wong, H. C., Calhoun, R., Gelfand, D., Fear, A. L., Volman, G., *et al.* (1998). Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J. Bacteriol.* *180*(17), 4416-4425.
- Tasteyre, A., Barc, M. C., Collignon, A., Boureau, H., & Karjalainen, T. (2001). Role of *FliC* and *FliD* flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infect. Immun.* *69*(12), 7937-7940.
- Tenover, F. C., Novak-Weekley, S., Woods, C. W., Peterson, L. R., Davis, T., Schreckenberger, P., *et al.* (2010). Impact of strain type on detection of toxigenic *Clostridium difficile*: comparison of molecular diagnostic and enzyme immunoassay approaches. *J. Clin. Microbiol.* *48*(10), 3719-3724.
- Thelestam, M., & Chaves-Olarte, E. (2000). Cytotoxic effects of the *Clostridium difficile* toxins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *250*, 85-96.
- Twine, S. M., Reid, C. W., Aubry, A., McMullin, D. R., Fulton, K. M., Austin, J., *et al.* (2009). Motility and flagellar glycosylation in *Clostridium difficile*. *J. Bacteriol.* *191*(22), 7050-7062.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., *et al.* (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* *3*(7).
- Vojcic, L., Despotovic, D., Martinez, R., Maurer, K. H., & Schwaneberg, U. (2012). An efficient transformation method for *Bacillus subtilis* DB104. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *94*(2), 487-493.
- Voth, D. E., & Ballard, J. D. (2005). *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin. Microbiol. Rev.* *18*(2), 247-263.
- Waligora, A. J., Hennequin, C., Mullany, P., Bourlioux, P., Collignon, A., & Karjalainen, T. (2001). Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infect. Immun.* *69*(4), 2144-2153.
- Westerlund, B., & Korhonen, T. K. (1993). Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* *9*(4), 687-694.
- Wolf, M., Geczi, A., Simon, O., & Borriss, R. (1995). Genes encoding xylan and beta-glucan hydrolysing enzymes in *Bacillus subtilis*: characterization, mapping and construction of strains deficient in lichenase, cellulase and xylanase. *Microbiology* *141* ( Pt 2), 281-290.
- Wolfe, A. J., & Visick, K. L. (2008). Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *J. Bacteriol.* *190*(2), 463-475.



Zar, F. A., Bakkanagari, S. R., Moorthi, K. M., & Davis, M. B. (2007). A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity. *Clin. Infect. Dis.* 45(3), 302-307.

