



UNIVERSITÉ
DE NAMUR

University of Namur

Institutional Repository - Research Portal Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche

researchportal.unamur.be

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Caractérisation du système de sécrétion de type II chez *Caulobacter crescentus*

Hamels, Aurore

Award date:
2007

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 03. Jul. 2025



FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**Caractérisation du système de sécrétion de Type II chez
*Caulobacter crescentus***

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques

Aurore Hamels

Juin 2007

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 – 5000 NAMUR
Téléphone : +32(0)81.72.44.18 – Téléfax : +32(0)81.72.44.20
E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be – <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Caractérisation du système de sécrétion de Type II chez *Caulobacter crescentus*

HAMELS Aurore

Résumé

La sécrétion de protéines est un processus essentiel à la survie de toute espèce vivante. Chez les bactéries, elle intervient dans divers phénomènes fondamentaux, telles la virulence des bactéries pathogènes et l'adaptation des espèces non pathogènes à leur milieu.

Au sein du groupe des bactéries Gram négatives, différents systèmes de sécrétion permettent la translocation des protéines à travers leurs membranes interne et externe. Parmi ceux-ci, le système de sécrétion de Type II comporte au moins 11 gènes (*gspC-O*), dont la séquence et l'organisation en opéron sont relativement bien conservées, notamment au sein du groupe des gammaprotéobactéries. Une analyse *in silico* indique que *C. crescentus* possède l'ensemble des gènes encodant le système de sécrétion de Type II mais aucune donnée à l'heure actuelle ne permet de déterminer son rôle au sein de cette espèce.

Dans ce travail, nous avons établi que *C. crescentus* sécrète des protéines à tous les stades de croissance. De manière surprenante, la délétion des gènes Δ *gspC-N* n'induit pas de déficit dans la sécrétion lorsque la souche est cultivée en milieu riche. Cependant, un stress de carence en nutriments induit, dans la souche sauvage, la sécrétion d'une protéine particulière d'environ 50 kDa, indétectable dans les surnageants de culture de la souche Δ *gspC-N*. Il semble donc que le système de sécrétion de Type II soit activé en réponse à un appauvrissement du milieu de culture. Une synchronisation de la population bactérienne révèle également l'implication de ce système au stade prédivisionnel.

Aucune perte de mobilité ou de sensibilité aux phages CR30 ou CBK n'est associée à la délétion des gènes *gspC-N*, contrairement à des observations faites sur des souches déficientes pour le système de sécrétion de Type I ou sur des souches présentant des déficits dans la synthèse des pili. Néanmoins, des études préliminaires semblent indiquer que le système de sécrétion de Type II intervient dans la régulation directe ou indirecte de la cellule face à un stress hyperosmotique chez *C. crescentus*.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2007

Promoteur: Prof. J.-Y. Matroule

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Matroule, promoteur de ce mémoire, de m'avoir encadré et accueilli au sein de son équipe, dès son arrivée au laboratoire URBM.

Je ne remercierai probablement jamais assez ma tutrice, Sophie, de m'avoir épaulée tout au long de ce mémoire. Merci pour ta patience et pour le temps que tu m'as consacré. Merci d'avoir partagé tes connaissances scientifiques qui sont, à vrai dire, assez impressionnantes.

Merci à toutes les personnes sans qui ce mémoire n'aurait pas eu la même saveur. Merci à Vanessa, Mira, Milou, Julie, Sophie et Fané. Merci pour tous les bons moments passés ensemble et ceux encore à venir.

Merci également à Marie, Charles, Marie-Alice, Géraldine et à tous les autres étudiants biologistes pour ces années.

Je tiens à remercier tous les URBMiens pour leur gentillesse, leur sympathie, leur conseil. Merci à vous tous. C'est très agréable de travailler dans un tel cadre de vie.

Je remercie d'avance Madame Renard et Messieurs Darchambeau, Ferooz et Poumay pour le temps que vous allez consacrer à la lecture de ce mémoire.

Je ne remercierai jamais assez mes parents et mes sœurs de m'avoir toujours soutenue au cours de ces études dans les bons moments comme dans les plus difficiles. Merci pour tout.

Liste des abréviations

Abréviations	Noms complets	Explications complémentaires
ADN	Acide désoxyribonucléique	Support de l'information génétique
Amp	Ampicilline	Antibiotique
CreS	Crescentine	Protéine impliquée dans la forme concave de <i>C. crescentus</i>
GFP	Green Fluorescent Protein	Protéine fluorescente qui émet dans le vert
LB	Luria Bertani	Milieu riche <i>E. coli</i>
Kan	Kanamycine	Antibiotique
kDa	kiloDalton	10 ³ Daltons (unité de masse moléculaire 1 Dalton = poids moléculaire d'un proton)
pb	paires de base	Deux nucléotides appariés
PCR	Polymerase Chain Reaction	Technique d'amplification de fragments d'ADN
PRMM	Pyrogallol Red Molybdate-Methanol	Solution de précipitation protéique
PYE	Peptone Yeast Extract	Milieu de culture riche pour <i>C. crescentus</i>
rpm	Rotations par minute	Unité de vitesse de centrifugation

Table des matières

Introduction.....	4
I. <i>La sécrétion : un processus universel et indispensable.</i>	4
I.1. La sécrétion et la virulence.....	4
I.2. Sécrétion, morphologie et mobilité cellulaire	5
I.3. Sécrétion et formation de biofilms	5
II. <i>Les systèmes de sécrétion Sec-indépendants.</i>	6
II.1. Le système de sécrétion de Type I.....	6
II.2. Le système de sécrétion de Type III	7
III. <i>Les systèmes de sécrétion Sec-dépendants.</i>	8
III.1. La voie Sec	8
III.1.1 : La reconnaissance du peptide signal de sécrétion par la SRP (Signal recognition particle)	9
III.1.2 : La reconnaissance des complexes SecB et SRP par la translocase.....	9
III.2. Le système de sécrétion de Type IV.....	10
III.3. Le système de sécrétion de Type V	10
III.4. Le système de sécrétion de Type II	11
III.4.1 : Organisation et conservation des gènes du système de sécrétion de Type II.....	11
III.4.2 : Composants et mécanismes d'action du système de sécrétion de Type II.....	11
III.4.2.1 : <i>Le complexe de la membrane interne.</i>	11
III.4.2.2 : <i>Le complexe de la membrane externe.</i>	12
III.4.3 : Protéines sécrétées par le système de sécrétion de Type II.....	13
IV. <i>Caulobacter crescentus.</i>	13
IV.1. Généralités.....	13
IV.2. Dimorphisme et différenciation.....	14
IV.3. <i>C. crescentus</i> et le système de sécrétion de Type I.....	15
Objectifs du mémoire.....	17
Résultats.....	19
<i>Réalisation de profils protéiques de sécrétion chez Caulobacter crescentus dans différentes conditions.</i>	19
1. Détection des protéines présentes dans les surnageants de culture de <i>C. crescentus</i>	19
2. Evolution du profil de sécrétion de CB15N en fonction de l'état de croissance des cellules en milieu riche.....	20
3. Evaluation de la mortalité cellulaire.....	21
3. Evolution et comparaison des profils de sécrétion obtenus pour CB15N en milieu riche et en milieu appauvri.....	22
<i>Création d'un délétant du système de sécrétion de Type II.</i>	24
1. Le système de sécrétion de Type II étudié par une première approche bioinformatique.....	24
2. Obtention de la souche délétée pour les gènes <i>gspC-N</i>	26
A. Construction du vecteur intégratif comportant les régions flanquantes de l'opéron <i>gspC-N</i>	27
B. Délétion de l'opéron <i>gspC-N</i> chez <i>C. crescentus</i>	29
<i>Caractérisation du délétant <i>gspC-N</i>.</i>	30
1. Comparaison des profils de sécrétion entre CB15N et CB15NΔ <i>gspC-N</i> sous différentes conditions.	30
A. Comparaison des profils de sécrétion de CB15N et CB15NΔ <i>gspC-N</i> en milieu riche	30
B. Comparaison des profils de sécrétion entre CB15N et CB15NΔ <i>gspC-N</i> en milieu appauvri	31
C. Comparaison de profils de sécrétion CB15N et CB15NΔ <i>gspC-N</i> dans une population synchronisée.....	32
2. Caractérisation phénotypique de CB15NΔ <i>gspC-N</i>	33
A. Mobilité de CB15NΔ <i>gspC-N</i>	33
B. Sensibilité aux phages CR30 et CBK de CB15NΔ <i>gspC-N</i>	34
C. Résistance au stress hyperosmotique de CB15NΔ <i>gspC-N</i>	34
<i>Conclusions et perspectives.</i>	37
I. <i>C. crescentus</i> possède l'intégralité de l'opéron codant le système de sécrétion de Type II.	37
II. <i>C. crescentus</i> sécrète des protéines à tous les stades de croissance.	37

III. La sécrétion de certaines protéines est induite en réponse à un stress de carence en nutriments.....	38
IV. L'absence d'un système de sécrétion de Type II fonctionnel n'induit pas de déficit dans la sécrétion en milieu riche.....	38
V. La sécrétion de certaines protéines par le système de sécrétion de Type II est régulée au cours du cycle cellulaire.....	38
VI. Le système de sécrétion de Type II est impliqué dans la sécrétion de protéines en condition de carences nutritives.....	38
VII. Le système de sécrétion de Type II est impliqué dans l'osmorégulation chez <i>C. crescentus</i>	39
Matériels et méthodes.....	41
A. Souches et plasmides.....	41
B. Milieux de cultures.....	41
C. Tampons et solutions.....	42
<i>Techniques relatives à l'utilisation de l'ADN.....</i>	<i>45</i>
A. Polymerase chain reaction (PCR).....	45
B. Purification sur colonne.....	46
C. Electrophorèse en gel d'agarose.....	46
D. Purification d'ADN sur gel.....	46
E. Minipréparation d'ADN plasmidique.....	47
F. Restriction de plasmides.....	47
G. Ligation d'un plasmide.....	47
<i>Techniques relatives à l'utilisation de protéines.....</i>	<i>47</i>
A. Précipitation des protéines au TCA.....	47
B. Précipitation des protéines par la solution de PRMM.....	48
C. Coloration au nitrate d'argent.....	48
D. Analyse de l'expression de protéines par <i>Western Blot</i>	48
<i>Techniques relatives à l'utilisation des bactéries.....</i>	<i>50</i>
A. Transformation bactérienne par électroporation.....	50
B. Synchronisation de <i>C. crescentus</i>	51
C. Test de résistance aux phages.....	51
D. Test de mobilité.....	51
E. Test Live/Dead.....	51
<i>Techniques relatives à l'utilisation du microscope.....</i>	<i>52</i>
Bibliographie.....	54

Introduction

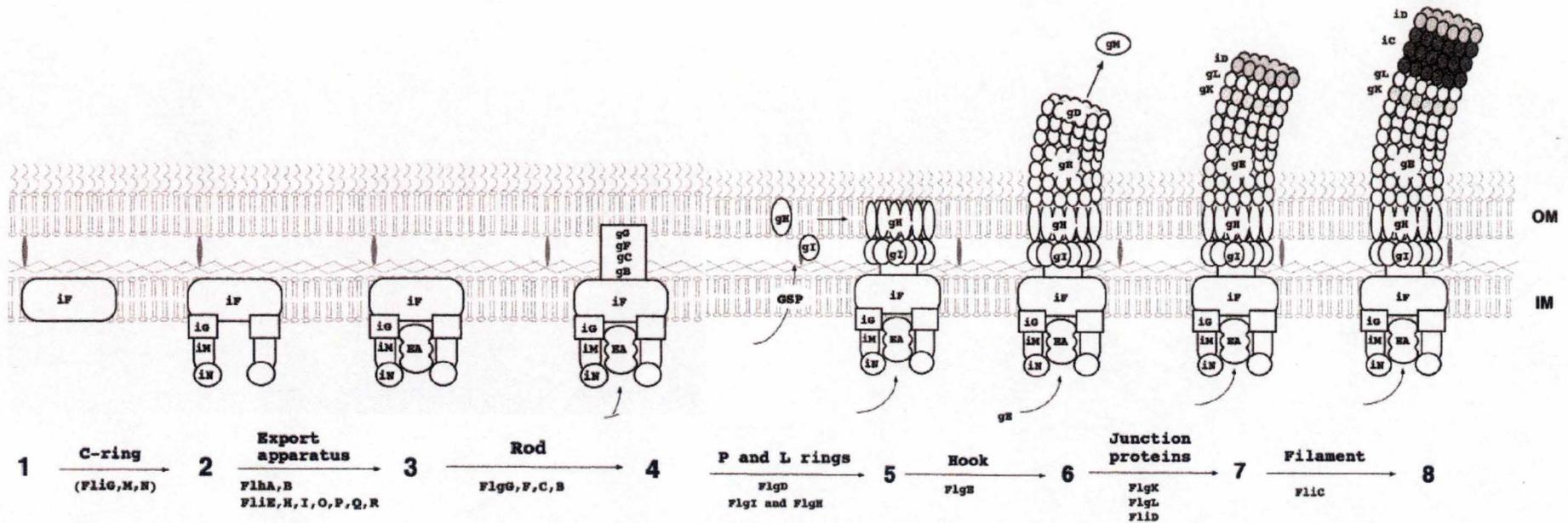


Figure 1: Schéma reprenant les étapes principales de l'assemblage du flagelle. L'assemblage du flagelle se déroule de manière séquentielle, de la partie la plus interne vers la partie la plus externe. Le flagelle est constitué de trois parties distinctes, le corps basal ancré en membrane, le coude ou crochet et le filament composé de flagelline, situé dans l'espace extracellulaire. L'assemblage des protéines FliF, FliG, M et N en membrane interne (1 à 2) et suivi de l'incorporation des protéines de l'appareil de sécrétion de la flagelline (3 à 4). La mise en place de cet appareil de sécrétion induit la formation des anneaux périplasmique et membranaire interne (5) essentiels à la synthèse du coude (6). L'ajout de protéines de jonctions à l'extrémité du coude (7) s'accompagne de la polymérisation et de la sécrétion de la flagelline pour former le filament (Fernandez & Berenguer, 2000).

Introduction

L'évolution des procaryotes est l'histoire d'une réussite qui s'étend sur plus de 3,5 milliards d'années. Bien que, depuis leur apparition, leur évolution soit moins spectaculaire que celle des eucaryotes, ils restent les organismes les plus représentés sur Terre.

Depuis leur découverte en 1683 par Antoni Van Leeuwenhoek, les bactéries ont toujours suscité un grand intérêt dans la communauté scientifique. Grâce à des mécanismes tantôt simples tantôt complexes, elles ont su s'adapter aux environnements les plus hostiles à la vie comme les fonds marins froids, les environnements très chauds que sont les cheminées volcaniques ou encore les milieux hypersalins semblables au Salt Lake des USA. Les différentes espèces bactériennes ont également conquis diverses niches biologiques grâce au développement de modes de vie particuliers telles la symbiose et la pathogénécité envers de nombreuses espèces animales et végétales. Un exemple bien connu d'espèces bactériennes symbiotiques des plantes est la bactérie Gram négative *Rhizobium* qui permet la fixation de l'azote atmosphérique nécessaire à la croissance des légumineuses. Citons également les bactéries du tractus digestif de l'Homme (plus ou moins 300 espèces) absolument nécessaires à sa survie. Les espèces bactériennes pathogènes de l'Homme ou d'autres eucaryotes sont elles aussi très nombreuses. En d'autres mots, les bactéries sont ubiquistes et utilisent un mécanisme universellement distribué sur Terre, la sécrétion.

Avant de poursuivre, il est important de définir les trois termes que sont la translocation, la sécrétion et l'exportation. La translocation réfère au transport des protéines à travers les membranes biologiques. La sécrétion se rapporte, quant à elle, au transport de la protéine du périplasma vers l'environnement extérieur (surface de la bactérie ou milieu extracellulaire). Enfin, l'export est défini comme le transport de la protéine du cytoplasme au périplasma (Desvaux et al., 2004b).

I. La sécrétion : un processus universel et indispensable.

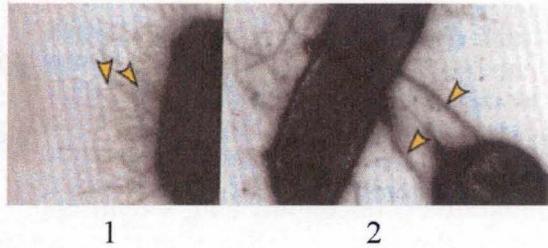
La sécrétion est un processus essentiel au développement et à la survie de toutes les espèces vivantes. Chez les eucaryotes, la sécrétion est définie comme la production d'une substance spécifique par un tissu ou par une glande qui la déverse dans le sang, dans un autre organe ou à l'extérieur de la cellule. Ces substances sont très diverses et comprennent entre autres des facteurs de croissance (GH), des stimulines (LH, FSH...) et des hormones tels les stéroïdes sécrétés par l'hypophyse ou encore les neurotransmetteurs sécrétés par les neurones. Ces différentes molécules sécrétées et bien d'autres affectent le fonctionnement de divers organes.

Chez les bactéries, la sécrétion de protéines dans l'environnement extérieur intervient dans de nombreux processus biologiques. Elle est ainsi souvent associée à la virulence de différentes espèces bactériennes et est très importante dans la croissance et le développement d'espèces non pathogènes. En effet, la sécrétion intervient dans divers mécanismes fondamentaux telles l'adhérence d'une bactérie à une surface, la colonisation du milieu extérieur, la mobilité cellulaire, la biogénèse de l'enveloppe cellulaire ou encore la communication entre bactéries.

1.1. La sécrétion et la virulence

La virulence bactérienne est liée à la synthèse de macromolécules interférant avec des fonctions physiologiques de l'organisme infecté au niveau moléculaire, cellulaire et tissulaire. La variété des maladies causées par les bactéries pathogènes chez divers organismes reflète

A)



B)

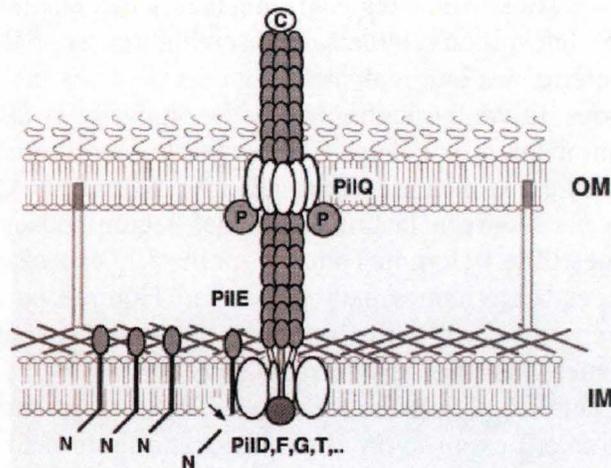


Figure 2 : Structures du pilus de type IV chez les bactéries. A) Observation en microscopie optique de deux types de pili chez les procaryotes : les pili responsables de l'adhésion (1) et de la conjugaison (2) (Lewin B., Cassimeris L. et al., *Cells*, Jones and Bartlett Publishers, 2007) B) Structure du pili de type IV. La piline, PilE, protéine structurale du pilus est transloquée du cytoplasme vers le périplasm par le complexe PilD, F, G, T de la membrane interne. PilE est libérée dans le périplasm suite à l'action d'une peptidase, PilD, qui clive la protéine au niveau de son domaine d'ancrage en membrane interne. Le pore de sécrétion est formé par PilQ et PilP en membrane externe et permet la sécrétion de PilE (Fernandez & Berenguer, 2000).

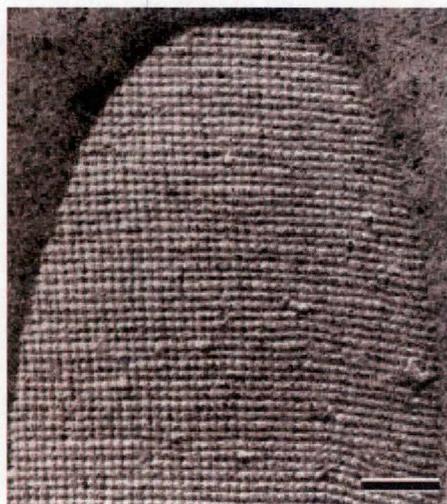


Figure 3 : Micrographie électronique de la structure tridimensionnelle de la couche S.

entre autre la multitude et la diversité de protéines sécrétées. Ces protéines sont ainsi responsables de divers phénomènes impliqués dans la virulence comme l'adhérence de la bactérie à une surface (*Escherichia coli* entéropathogène), la résistance à la phagocytose (*Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia* spp.), le remaniement du cytosquelette (*Helicobacter* spp.), la survie et la multiplication cellulaire (*Brucella* spp., *Legionella* spp.). Il a également été démontré qu'une variété de bactéries phytopathogéniques sont capables de sécréter des facteurs de virulence chez leur hôte (*Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* et *Xanthomonas*) (Hueck, 1998).

Ainsi, la sécrétion de protéines par les bactéries pathogènes permet d'induire un remaniement des mécanismes moléculaires de la cellule hôte qui permet à la bactérie de coloniser, de se répliquer et d'infecter la cellule hôte.

1.2. Sécrétion, morphologie et mobilité cellulaire

Un grand nombre de bactéries élabore à leur surface, via des processus de sécrétion, des structures complexes tels les flagelles, les pili ou la couche S. Ces structures de surface qui sont le résultat d'une polymérisation ordonnée des sous-unités protéiques, sont de forme tubulaire ou plane.

Le flagelle est un prolongement cytoplasmique complexe qui permet la mobilité des bactéries dans un milieu. Il se compose de trois parties distinctes : un long filament, une partie courbée nommée coude et un corps basal responsable de l'ancrage du flagelle à la membrane bactérienne (Fernandez & Berenguer, 2000). La mise en place du flagelle requiert plusieurs étapes et nécessite la sécrétion ordonnée et l'assemblage de nombreuses protéines au travers des membranes de la bactérie (Fig. 1).

Les pili sont de petits prolongements cytoplasmiques de structure moins complexe qui permettent l'attachement des cellules à une surface ainsi que le transport de matériel génétique entre bactéries au cours de la conjugaison. La formation du pilus débute par l'ancrage transitoire de la pré-piline, PilE, au niveau de la face périplasmique de la membrane interne de la bactérie via son domaine hydrophobe N-terminal (Fernandez & Berenguer, 2000). La peptidase, PilD, complexée à d'autres protéines en membrane interne, est capable de cliver PilE au niveau de son domaine d'ancrage et permet ainsi son détachement de la membrane interne. PilE, libre, peut alors être sécrétée dans le milieu extérieur via un pore formé par les protéines PilQ et PilP (Fig. 2).

La plupart des organismes procaryotiques sont recouverts d'une couche protectrice, la couche S, composée d'une seule protéine qui polymérise en une structure tridimensionnelle qui entoure l'entièreté de la bactérie (Fig. 3) (Sleytr et al., 2007). Cette protéine structurale est reconnue par un complexe de la membrane interne qui induit son passage dans le périplasme. Au niveau de l'espace périplasmique, la protéine structurale de la couche S est prise en charge par des chaperonnes qui favorise sa reconnaissance par un complexe en membrane externe et sa sécrétion à la surface cellulaire.

1.3. Sécrétion et formation de biofilms

Bien qu'en laboratoire, le travail s'effectue principalement sur des cellules qui se développent indépendamment les unes des autres, des études ont montré que dans la nature, de nombreuses espèces bactériennes vivent en communautés multicellulaires et sont soumises à des régulations interbactériennes importantes. Les différentes cellules qui composent ces communautés sont ainsi capables de coordonner leurs activités en réponse à différents signaux environnementaux (Parsek & Greenberg, 2000). Ainsi, après fixation à un substrat, les

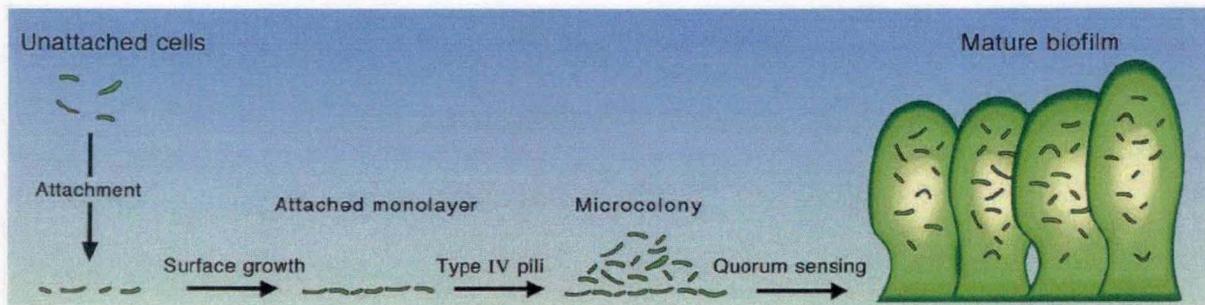


Figure 4 : Formation d'un biofilm mature chez *Pseudomonas aeruginosa*. L'attachement des cellules libres à une surface induit leur prolifération et leur développement sous forme de microcolonies. L'augmentation de la densité bactérienne dans les microcolonies induit la formation d'une structure tridimensionnelle, dite biofilm mature (Parsek & Greenberg, 2000).

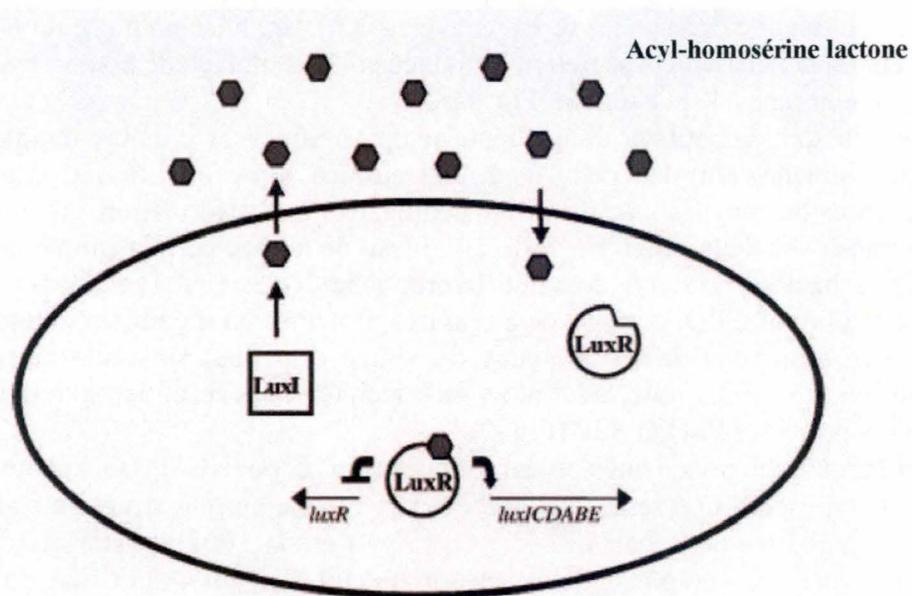


Figure 5 : Régulation de la production d'acyl-homoserine lactone par le système LuxI/LuxR chez *Vibrio fischeri*. La protéine LuxI induit la production d'acyl-homoserine lactone, molécule-signal capable de diffuser librement dans la cellule ou dans l'espace extracellulaire. Lorsque la densité de la population cellulaire augmente, la concentration d'acyl-homoserine lactone augmente également et active un régulateur transcriptionnel LuxR, qui induit l'expression ou l'inhibition de ses gènes cibles (Miller & Bassler, 2001).

bactéries s'y développent sous la forme d'une matrice multicellulaire organisée, appelée biofilm. La formation des biofilms nécessite différentes étapes à savoir, l'attachement des cellules à une surface, leur multiplication en monocouches, le développement des monocouches en microcolonies et enfin la différenciation et l'organisation des microcolonies en biofilms matures (O'Toole, Kaplan & Kolter, 2000) (Fig. 4).

Au sein des biofilms matures, les bactéries sont capables de coordonner leur croissance en communiquant par l'intermédiaire de molécules-signal. Cette notion de communication extracellulaire est connue depuis quelques années sous le nom de *Quorum Sensing* (QS). Le QS est défini comme la capacité des bactéries à délivrer ou détecter des molécules chimiques sécrétées par leurs congénères et de modifier l'expression de gènes cibles en réponse à une concentration élevée de ces molécules dans le milieu extracellulaire.

Une des voies de communication intercellulaire la mieux caractérisée au sein du monde bactérien est connue sous le nom du système acyl-HSL ou acyl-homosérine lactone. L'acyl-homosérine lactone est une petite molécule produite par une protéine cytoplasmique, Lux I, qui est capable de diffuser librement au travers de la membrane plasmique (Parsek & Greenberg, 2005). L'acyl-homosérine lactone est un autoinducteur qui va activer l'expression du régulateur transcriptionnel, Lux R, dans les cellules voisines qui induit l'expression de ses gènes cibles (Reading & Sperandio, 2006) (Fig. 5).

De manière générale, la sécrétion de molécules diverses ou de protéines est impliquée dans de nombreux aspects de la vie bactérienne et demeure un processus essentiel à la croissance et à la survie des cellules.

Si l'acyl-homosérine lactone, présente un faible poids moléculaire et des propriétés physico-chimiques qui permettent sa diffusion au travers de la membrane cytoplasmique, ce n'est pas le cas de toutes les molécules-signal. La membrane externe des bactéries présente ainsi différentes voies qui permettent la sécrétion dans le milieu extracellulaire de macromolécules telles les protéines qui constituent le flagelle ou le pilus (Stephenson, 2005). A l'heure actuelle, différents systèmes de sécrétion ont été identifiés chez les bactéries Gram négatives dont les systèmes de sécrétion de Type I, II, III, IV et V (Fig. 6).

Alors que certains systèmes permettent le transport intégral des protéines à travers l'enveloppe cellulaire bactérienne en une seule étape, sans passage par le périplasma (Type I et Type III), d'autres systèmes ne prennent en charge que le passage de la protéine à travers la membrane externe (Type II et V). Ces derniers fonctionnent dès lors en coopération avec une voie auxiliaire, la voie Sec, qui assure l'export des protéines au travers de la membrane interne et sont, par conséquent, appelés systèmes Sec-dépendant (Thanassi & Hultgren, 2000).

Le système de sécrétion de Type IV présente la particularité de permettre la sécrétion d'ADN et de protéines. Si la sécrétion d'ADN s'effectue en une seule étape et n'implique donc pas l'intervention de la voie Sec, il semble au contraire que la sécrétion de protéines, telle la toxine de *Bordetella pertusis*, soit Sec-dépendante (Thanassi & Hultgren, 2000).

II. Les systèmes de sécrétion Sec-indépendants.

II.1. Le système de sécrétion de Type I

L'appareil de sécrétion de Type I est un système fréquemment retrouvé chez les espèces bactériennes Gram négatives. Ce système est hautement conservé des procaryotes

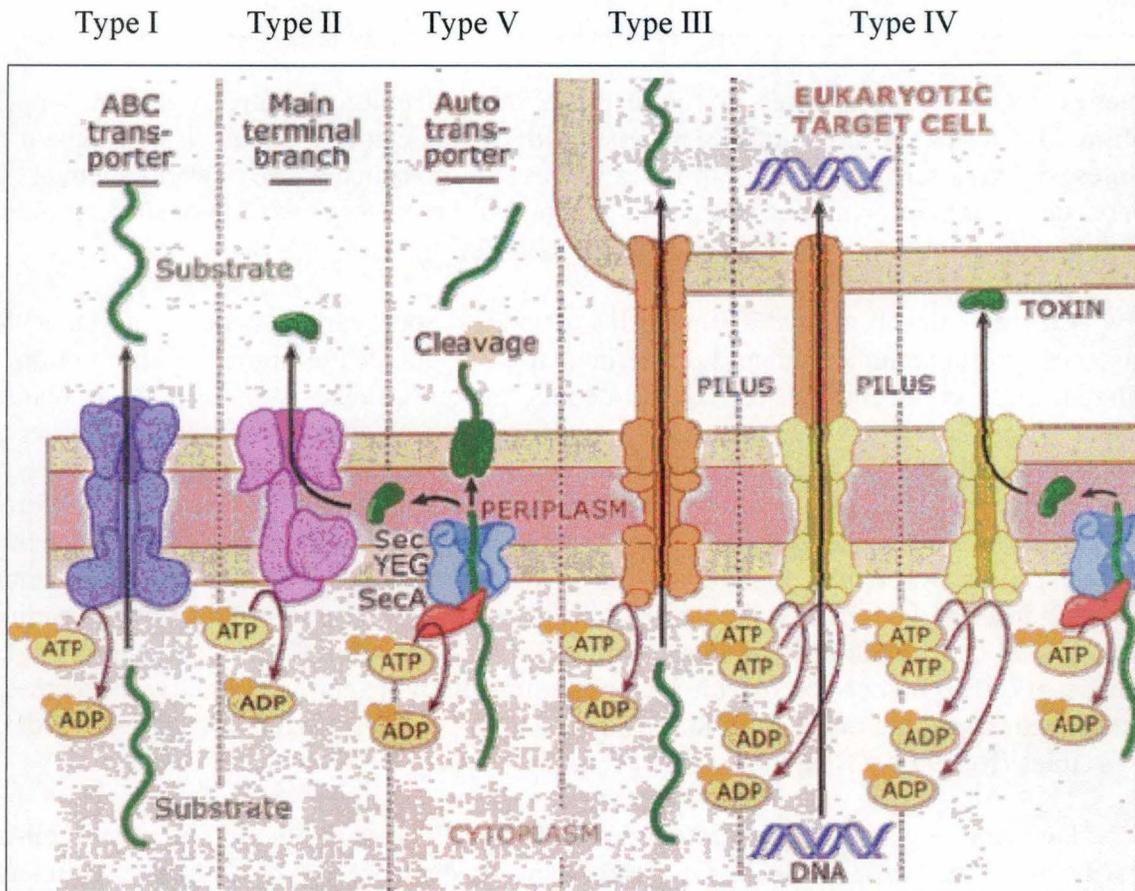


Figure 6 : Représentation des voies de sécrétion principales chez les bactéries Gram négatives. Alors que certaines voies permettent le transport des protéines du cytoplasme à l'environnement extérieur en une seule étape (Type I et III), d'autres systèmes nécessitent la présence d'une voie secondaire, le système Sec (Type II et V). Le système de sécrétion de Type IV selon la substrat sécrété, a besoin (protéines) ou non (ADN) de la voie Sec.

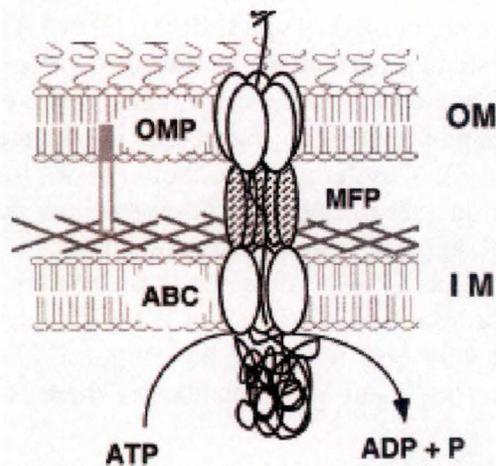


Figure 7 : Structure du système de sécrétion de Type I. Ce système de sécrétion est composé d'un ABC transporteur situé dans la membrane interne et activé par une protéine substrat cytoplasmique. Cette interaction induit son passage dans le périplasme et la déformation de la protéine MFP périplasmique. La déformation de la protéine MPF induit l'ouverture du canal en membrane externe, formé de protéines OMP, qui permet le passage de la protéine sécrétée dans le milieu extérieur. L'ABC transporteur responsable de l'hydrolyse de l'ATP, fournit ainsi l'énergie nécessaire au système (Fernandez & Berenguer, 2000).

aux eucaryotes et permet le transport transmembranaire d'une variété de polypeptides de fonctions et de tailles très différentes.

Les protéines sécrétées par le système de sécrétion de Type I possèdent un peptide signal, de plus ou moins 50 acides aminés au niveau de leur région C-terminale (Thanassi & Hultgren, 2000). La position de ce peptide signal suggère que la sécrétion ne peut se produire que de manière post-traductionnelle (Holland, Schmitt & Young, 2005).

Contrairement à de nombreux signaux d'adressage de protéines, le peptide signal de Type I n'est pas clivé lors du transport de la protéine (Delepelaire, 2004). Une autre caractéristique du système de sécrétion de Type I est la conservation de motifs riches en glycine au niveau de la protéine sécrétée. Ces motifs sont le site de liaison d'ions calcium qui sont impliqués dans la reconnaissance du peptide signal par l'appareil de sécrétion (Bingle, Nomellini & Smit, 2000).

Du point de vue de sa structure, le système de sécrétion de Type I se compose de trois protéines localisées au niveau des membranes bactériennes (Fig. 7). La première de ces protéines est un transporteur ABC ancré en membrane interne, qui procure l'énergie nécessaire à la sécrétion de la protéine par hydrolyse d'ATP. Ce transporteur composé d'un domaine transmembranaire (TMD) ainsi que d'un domaine de liaison aux nucléotides (NBD), reconnaît la protéine sécrétée via son signal de sécrétion. L'ABC transporteur est de la sorte responsable de la spécificité du processus de sécrétion (Delepelaire, 2004). Le deuxième constituant du complexe est une protéine de fusion membranaire (MFP) qui s'étend le long du périplasma. Cette protéine de fusion membranaire se lie au transporteur ABC en réponse à la liaison d'une protéine à sécréter du côté cytoplasmique. Cette interaction permet l'ouverture d'un canal, troisième acteur du complexe de sécrétion, situé en membrane externe.

Le transport de la protéine sécrétée du cytoplasme vers l'extérieur de la bactérie s'effectue dans un premier temps grâce à l'ABC transporteur en membrane interne et dans un second temps via le canal en membrane externe. Ces deux composants interagissent par l'intermédiaire de la protéine MFP périplasmique (Holland et al., 2005).

Le canal par lequel la protéine est sécrétée, au travers de la membrane externe, se compose de protéines spécifiques de la membrane externe (OMP). L'OMP la plus connue et la mieux caractérisée, en terme de structure, est la protéine trimérique TolC d'*Escherichia coli* (Delepelaire, 2004).

La première protéine identifiée comme étant sécrétée par le système de sécrétion de Type I est l'alpha hémolysine (HlyA) d'une souche d'*E. coli* uropathogène. Cette toxine est un polypeptide de 110 kDa contenant de nombreux résidus glycine et qui possède un effet cytolytique et/ou cytotoxique sur un nombre varié de types cellulaires mammaliens. Le transport de l'alpha hémolysine (HlyA) nécessite l'intervention des trois composants du système de sécrétion de Type I (Fig. 8) (Thanabalu et al., 1998) (Gentschev, Dietrich & Goebel, 2002).

II.2. Le système de sécrétion de Type III

Tout comme le système de sécrétion de Type I, le système de sécrétion de Type III est capable de prendre en charge l'intégralité du processus de transport de protéines, du cytoplasme vers l'extérieur. Le système de sécrétion de Type III est couramment nommé dans la littérature sous le terme d'injectosome et est exprimé chez les espèces bactériennes pathogènes au contact de la cellule hôte. De récentes études génétiques ont mis en évidence des homologues de structures et de séquences entre les gènes impliqués dans la formation de l'injectosome et celle du flagelle (Cornelis, 2006), ce qui suggère que ces deux systèmes sont liés évolutivement (Fig. 9).

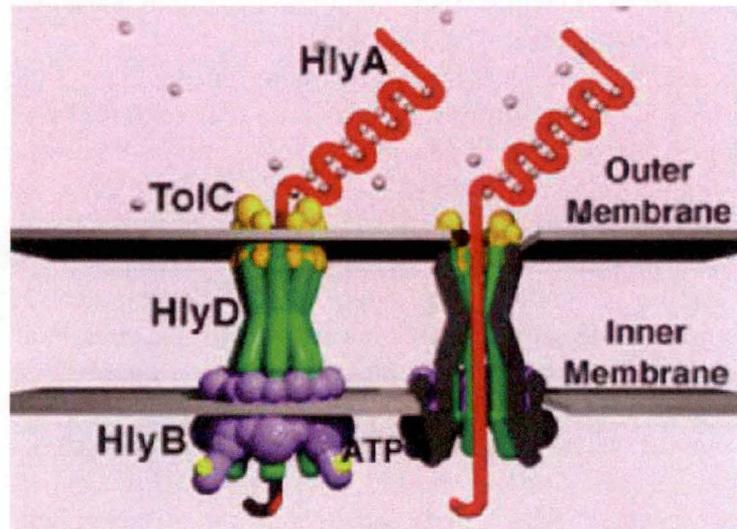


Figure 8 : Structure du système de sécrétion de Type I de l'alphahémolysine HlyA chez *E. coli*. TolC situé en membrane externe est en contact avec la protéine de fusion membranaire, HlyD qui est elle-même en contact avec l'ABC transporteur, HlyB. Ces trois composants sont activés par liaison d'HlyA à HlyB et forment un canal continu du cytoplasme vers l'environnement extérieur où l'HlyA est libérée (Holland, Schmitt & Young, 2005).

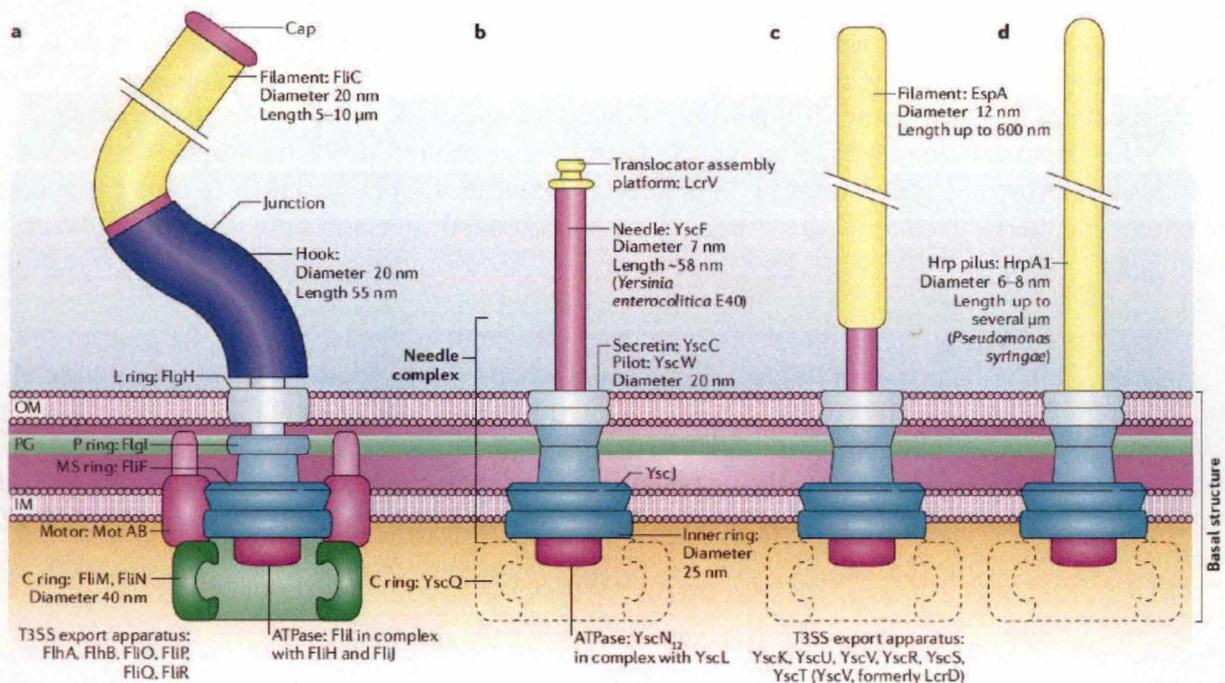


Figure 9 : Similarités entre la structure de flagelle (a) et celle de l'injectosome de différentes espèces bactériennes (b-d). Le système de sécrétion de Type III, impliqué dans la sécrétion de protéines effectrices chez des espèces bactériennes pathogènes, est constitué d'une structure très similaire à celle du flagelle qui comporte un corps ancré en membrane et une structure extracellulaire obtenue par polymérisation de molécules structurales. Les gènes qui composent les deux structures présentent de fortes homologies de séquences (Cornelis, 2006).

Le flagelle est un organe qui permet aux bactéries de se mouvoir dans un milieu grâce à un 'moteur' activé par une force proton motrice. Cette structure traverse la membrane bactérienne et exporte ses protéines flagellaires à son extrémité distale où elles polymérisent pour former le filament. Au minimum 50 gènes sont requis pour l'assemblage et la fonctionnalité du flagelle (Aldridge & Hughes, 2002).

Bien que le flagelle sécrète principalement des protéines flagellaires, il peut également être utilisé par certaines bactéries dans l'exportation de protéines impliquées dans la virulence (Journet, Hughes & Cornelis, 2005). Tel est le cas chez *Bacillus thuringiensis*, où le flagelle est responsable de la sécrétion de l'hémolysine BL qui est une toxine impliquée dans la pathogénéicité chez les insectes.

Le système de sécrétion de Type III ou injectosome joue un rôle prépondérant dans la virulence d'espèces bactériennes pathogènes de cellules animales ou végétales mais également chez des endosymbiontes. L'injectosome est ainsi constitué d'une structure basale liée à une structure en forme d'aiguille allongée et creuse (Fig. 9). Son assemblage nécessite l'expression séquentielle d'une vingtaine de protéines, généralement encodées par des gènes présents sur un même opéron qui ne s'expriment souvent que lors du contact avec la cellule hôte (Cornelis, 2006).

Les substrats du système de sécrétion de Type III sont synthétisés dans le cytoplasme bactérien, exportés dans le périplasma puis sécrétés dans l'environnement extérieur (Mota, Sorg & Cornelis, 2005). Les substrats sécrétés sont généralement des protéines, appelées translocatrices et effectrices. Les protéines translocatrices, sécrétées lors des stades précoces de l'interaction hôte/pathogène, s'ancrent dans la membrane de la cellule hôte et permettent l'entrée des protéines effectrices. Celles-ci détournent la machinerie cellulaire de l'hôte et favorisent ainsi le développement du pathogène et sa protection face au système immunitaire de l'hôte.

Certaines protéines sécrétées par le système de sécrétion de Type III sont assistées par des chaperonnes spécialisées et strictement cytoplasmiques. Elles sont essentielles à une sécrétion optimale de leur substrat. Ces chaperonnes permettent le repliement correct des protéines avant leur sécrétion et empêchent certaines interactions prématurées de protéines entre elles et/ou avec les composants du système de sécrétion (Hueck, 1998). De manière surprenante, il semble que ces chaperonnes soient également des régulateurs transcriptionnels inactifs lorsqu'elles sont liées à la protéine sécrétée. Après sécrétion, la chaperonne est alors libre de réguler ses gènes cibles. Ces chaperonnes jouent donc le rôle d'horloges moléculaires en intervenant dans la régulation de gènes à des stades spécifiques du processus de sécrétion de Type III.

III. Les systèmes de sécrétion Sec-dépendants.

III.1. La voie Sec

La voie Sec permet l'export de protéines à travers la membrane interne sécrétées par les systèmes de Type II et IV (Economou, 1999). Les différents constituants qui composent la voie Sec sont très conservés, sur base d'homologies de séquences, des procaryotes aux eucaryotes (Pohlschroder et al., 1997).

L'export de protéines par le système Sec, comprend trois étapes successives et interdépendantes : la reconnaissance de la protéine sécrétée, la translocation à travers la

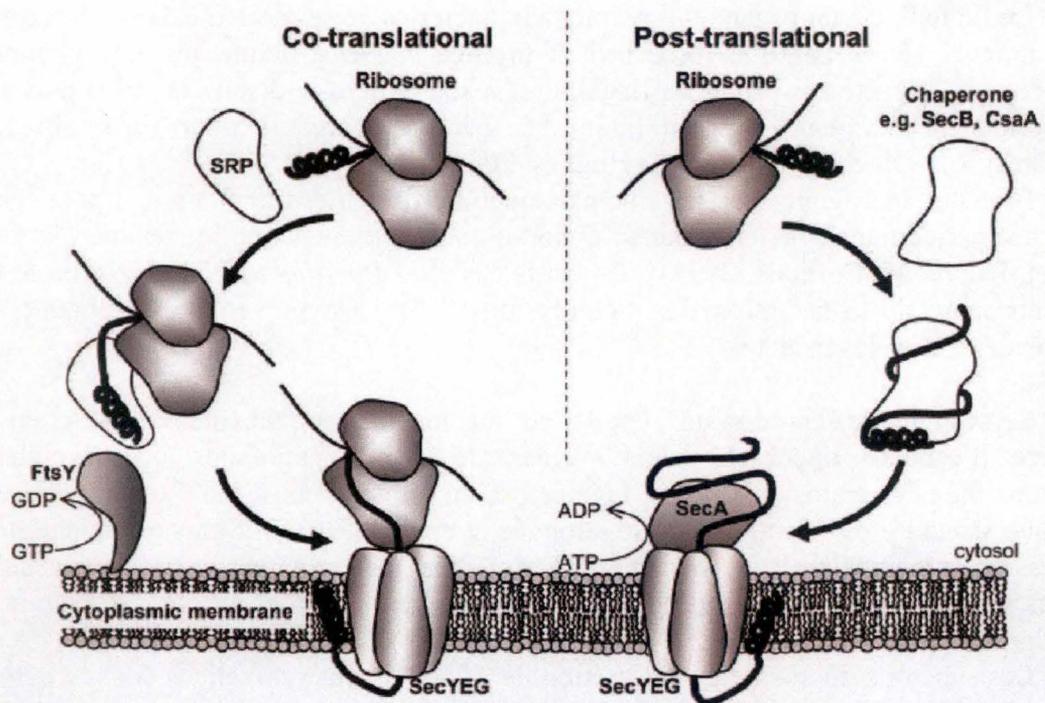


Figure 10 : Représentation de la sécrétion co- et post- traductionnelle par la voie Sec chez les bactéries. La sécrétion de certaines protéines passe par la reconnaissance et la translocation dans l'espace périplasmique de la protéine sécrétée par le complexe Sec. La protéine cytoplasmique SRP est capable de fixer un polypeptide naissant lié au ribosome et de le diriger vers le système Sec en membrane interne. L'énergie nécessaire au passage de la protéine à travers la membrane cytoplasmique est fournie par l'activité d'hydrolyse du GTP de FtsY. Une protéine sécrétée peut également être directement reconnue et de manière post-traductionnelle par la chaperone, SecB, qui prévient son repliement et permet sa reconnaissance par le complexe de translocation SecAYEG (Stephenson, 2005).

membrane interne et la libération de la protéine dans le périplasma. Ce transport qui a lieu de manière co- et post-traductionnelle chez les bactéries (Fig. 10), a été relativement bien décrit chez *E. coli*.

III.1.1 : La reconnaissance du peptide signal de sécrétion par la SRP (Signal recognition particle)

Comme toutes les protéines cellulaires, les précurseurs des protéines sécrétées sont synthétisés dans le cytoplasme par les ribosomes et doivent posséder un signal reconnaissable par la machinerie Sec. Ce signal leur permet non seulement d'être dirigés vers la membrane cytoplasmique mais également d'être reconnus spécifiquement par les composants du complexe de la voie Sec. Les précurseurs comportent ainsi un peptide signal de 20 à 30 résidus dans leur région N-terminale. Ce peptide signal est clivé par une peptidase dans le périplasma. Des protéines chaperonnes assurent dès lors la maturation de la protéine à sécréter (Stephenson, 2005).

Ainsi, à la suite de la synthèse protéique, la protéine sécrétée est reconnue soit par une chaperonne cytosolique, SecB de manière post-traductionnelle soit par un complexe ribonucléique, la SRP de manière co-traductionnelle. Alors que la SRP reconnaît spécifiquement le peptide signal de sécrétion, SecB se lie à la partie mature du précurseur protéique et empêche son repliement précoce. Les complexes ainsi formés sont dirigés vers la membrane interne (Economou, 1999).

III.1.2 : La reconnaissance des complexes SecB et SRP par la translocase

Au sein de la membrane interne se localise un complexe hétérotrimérique de protéines intramembranaires, SecYEG ou translocase, qui interagit avec une ATPase, SecA ou FtsY, qui procure l'énergie nécessaire à l'export de la protéine (Stephenson, 2005).

Lors de son arrivée en membrane interne, le complexe SecB/protéine à sécréter se lie avec une forte affinité à SecA via le peptide signal de sécrétion. Cette interaction SecA-peptide signal déstabilise la liaison de SecB avec la protéine à sécréter et induit sa libération dans le cytoplasme (Bolhuis, 2004). SecA fournit l'énergie nécessaire au passage de la protéine au travers de la membrane interne.

De manière similaire, l'interaction du complexe SRP/protéine à sécréter avec FtsY, l'autre ATPase membranaire, induit la libération de la SRP dans le cytoplasme et permet la prise en charge de la protéine à sécréter par la translocase (Stephenson, 2005).

Les protéines SecD et SecE qui interagissent avec le complexe SecYEG jouent un rôle secondaire dans la translocation des protéines mais sont cependant impliquées dans différents aspects du processus de transport tels le recyclage de SecA, l'élimination de protéines mal repliées ou pour lesquelles le peptide signal n'a pas été clivé et dans l'assemblage correct du translocon (Stephenson, 2005).

Aujourd'hui, il apparaît clairement que la plupart des bactéries possèdent une seconde voie d'exportation de protéines, qui est distinguable de la voie Sec, le système Tat (Twin arginine translocation). Celui-ci possède la caractéristique d'exporter des protéines de tailles variables sous leur forme mature (Berks, Sargent & Palmer, 2000). Les protéines destinées au système Tat sont marquées au niveau de leur peptide signal. Celui-ci, plus long, possède des résidus arginine consécutifs et invariables au niveau de leur région N-terminale ainsi que des résidus basiques en région C-terminale (Palmer & Berks, 2003).

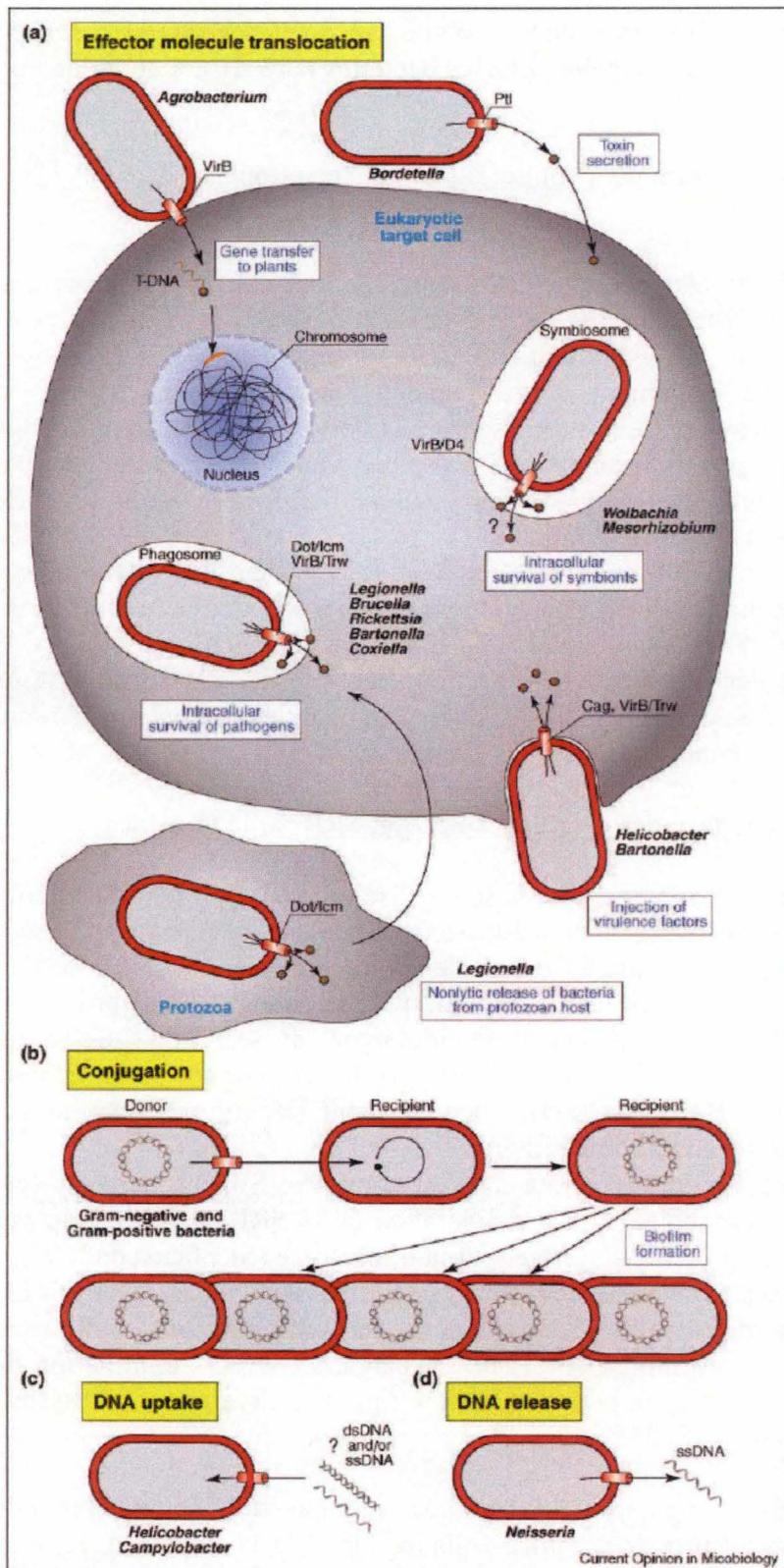


Figure 11 : Description des différentes fonctions du système de sécrétion de Type IV chez les bactéries Gram négatives. (a) Le système de sécrétion de Type IV est impliqué dans la libération de molécules effectrices par des espèces bactériennes pathogènes ou symbiotiques lors de l'interaction avec leur cellule hôte et dans (b) la translocation par conjugaison d'ADN entre bactéries ou vers des cellules eucaryotes. De plus, il est impliqué dans (c) l'absorption ou (d) la libération d'ADN qui facilitent son échange avec le milieu extracellulaire (Backert & Meyer, 2006).

Ces deux voies assurent donc l'exportation de protéines et l'une d'entre elle, la voie Sec, est essentielle au fonctionnement des systèmes de sécrétion de Type II, de Type IV et de Type V.

III.2. Le système de sécrétion de Type IV

Le système de sécrétion de Type IV est largement distribué au sein du monde bactérien et est impliqué dans le transfert de protéines ou d'ADN dans de nombreux types de cellules cibles (Ding, Atmakuri & Christie, 2003). Bien qu'il ait été décrit initialement chez *Agrobacterium tumefaciens*, ce système de sécrétion encodé par les gènes *virB-D4* est hautement conservé dans de nombreuses espèces bactériennes et, en particulier, chez des bactéries pathogènes et symbiotiques. Le système de sécrétion de Type IV intervient dans différentes fonctions dont quatre sont à ce jour décrites : la sécrétion de molécules effectrices par des pathogènes dans les cellules hôtes, l'échange d'ADN par conjugaison entre bactéries, l'absorption et la sécrétion d'ADN dans le milieu extracellulaire et l'injection de facteurs de virulence dans les cellules hôtes eucaryotes (Backert & Meyer, 2006) (Fig. 11).

Le système de sécrétion de Type IV est un complexe multiprotéique qui forme un canal à travers l'enveloppe bactérienne (Llosa & O'Callaghan, 2004) (Christie & Cascales, 2005). Chez la bactérie symbionte de plante, *A. tumefaciens*, ce système permet la sécrétion de nucléoprotéines oncogéniques et est encodé par les opérons *virB* et *virD*.

L'opéron *virB* se compose de 11 gènes, qui encodent les protéines VirB1 à VirB11. L'opéron *virD* encode cinq protéines dont VirD4 (Christie & Cascales, 2005).

Les protéines VirB/VirD sont classées en trois groupes : les composants du canal de sécrétion (VirB6-VirB10), les composants énergétiques (VirB4, VirB11 et VirD4) et les composants de l'assemblage du pilus (VirB2, VirB3 et VirB5) (Fig. 12). Il est à noter que tous les systèmes de sécrétion de Type IV connus à ce jour possèdent des homologues de chacune de ces protéines.

Différents pathogènes intracellulaires utilisent l'appareil de sécrétion de Type IV pour désorganiser le trafic membranaire des organites de l'hôte (Backert & Meyer, 2006). Ceci est le cas de *Brucella suis* dont l'expression de certains gènes impliqués dans la virulence n'a lieu qu'après phagocytose par la cellule hôte et acidification des endosomes qui contiennent le pathogène (Burns, 2003).

III.3. Le système de sécrétion de Type V

Le système de sécrétion de Type V est caractérisé par la sécrétion de protéines à travers un pore en membrane externe formé par un tonneau β (Desvaux, Parham & Henderson, 2004a). Il constitue le système de sécrétion le plus simple et a été découvert récemment chez *Neisseria gonorrhoeae*, où il est impliqué dans la sécrétion de la protéase IgA1.

Toutes les protéines transportées par ce système possèdent les mêmes caractéristiques à savoir : (i) Une séquence signal en région N-terminale qui permet l'exportation de la protéine par la voie Sec (ii) Un domaine de liaison qui permet le recrutement en membrane externe de la protéine à sécréter (iii) Un domaine passager qui induit le passage de la protéine dans le milieu extracellulaire (Thanassi et al., 2005) (Fig. 13).

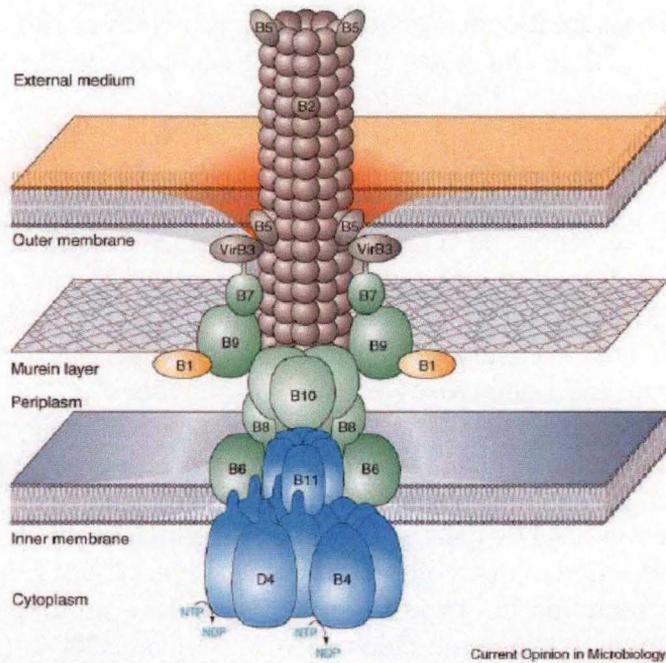


Figure 12 : Structure du système de sécrétion de Type IV chez *Agrobacterium tumefaciens*. Le système de sécrétion de Type IV traverse l'intégralité de la membrane bactérienne et se compose généralement de 11 gènes, *virB1-11* et *virD4*. Le corps périplasmique du complexe formé par les protéines VirB9 et VirB10 lie la partie en membrane interne, qui comporte une activité ATPase, aux composants situés en membrane externe. Alors que la sécrétion de protéines par ce système est Sec-dépendante, l'ATPase VirD4 comporte des domaines de liaison à l'ADN qui permettent son transport en une seule étape (Backert & Meyer, 2006).

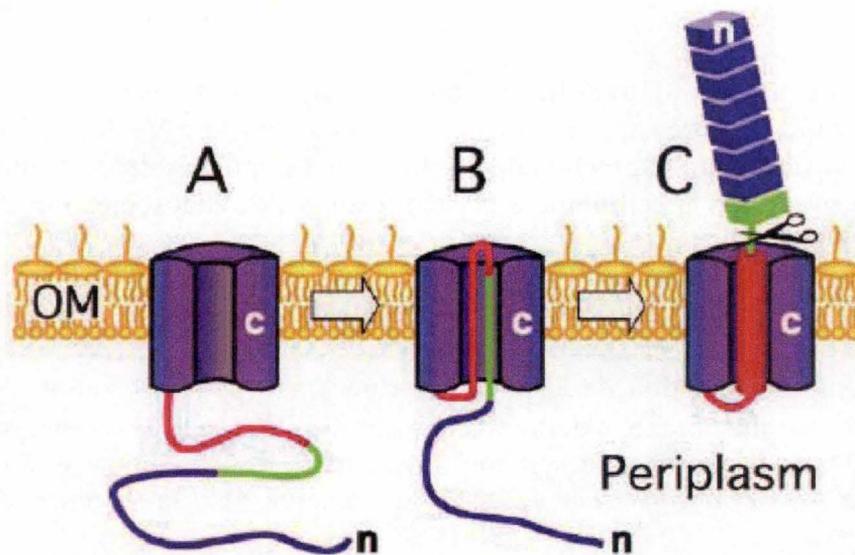


Figure 13 : Sécrétion d'une protéine par le système de sécrétion de Type V. (a) Le domaine C-terminal qui s'insère en membrane externe permet le passage du domaine de liaison (en rouge) qui forme une *hairpin* initiant la sécrétion du domaine passager de la protéine substrat (en vert) (b). Ce domaine s'ancore en surface cellulaire et permet la sécrétion de la protéine (en bleu) dans le milieu extérieur. (c) Cette sécrétion est suivie par le maintien du domaine passager en membrane ou par sa libération dans le milieu extracellulaire (Thanassi et al., 2005).

III.4. Le système de sécrétion de Type II

Le système de sécrétion de Type II est largement représenté au sein des bactéries Gram négatives, où il intervient dans la sécrétion de divers substrats de l'espace périplasmique vers le milieu extracellulaire. Des études récentes ont montré l'implication de ce système de sécrétion dans la virulence et la pathogénéité des animaux et des plantes.

III.4.1 : Organisation et conservation des gènes du système de sécrétion de Type II

Le système de sécrétion de Type II est encodé par 12 à 15 gènes selon l'espèce considérée, organisés en un simple opéron. Prévalent chez les gammaprotéobactéries, ce système a plus tard été découvert chez les alpha-, les bêta- et les deltaprotéobactéries, grâce aux alignements de séquences (Sandkvist, 2001). Ces alignements de séquences ont également permis de mettre en évidence que de nombreuses bactéries identifiées comme présentant un système de sécrétion de Type II, ne possèdent pas tous les gènes requis pour l'élaboration d'un complexe de transport complet (Tableau 1).

Ainsi, le système de sécrétion de Type II n'est pas ubiquiste mais est un système spécialisé impliqué dans des fonctions très diverses qui dépendent de l'organisme considéré et de sa niche écologique. Cette voie de transport a été identifiée chez de nombreux organismes qui sont des pathogènes de plantes, d'animaux ou de l'Homme, ainsi que chez des organismes non pathogènes et des symbiontes de plantes (Cianciotto, 2005), où il est impliqué dans le transport de multiples protéines.

Les gènes homologues et leurs produits sont désignés dans la plupart des systèmes par les lettres A-O et S (Johnson et al., 2006).

III.4.2 : Composants et mécanismes d'action du système de sécrétion de Type II

Le transport de protéines par l'intermédiaire du système de sécrétion de Type II se déroule en deux étapes distinctes tant sur le plan biochimique que sur le plan génétique. La première étape est l'export de la protéine via la voie Sec. A la suite de ce transport vers le périplasma, la protéine peut subir plusieurs modifications tels la formation de ponts disulfures et l'assemblage des différentes sous unités qui composent la protéine mature. Cette première étape de translocation par le système Sec est rapidement suivie du transport de la protéine à travers la membrane externe par le système de sécrétion de Type II (Sandkvist, 2001). Celui-ci constitue un complexe multiprotéique composé d'éléments cytoplasmiques (pseudopilines), de la membrane interne et de la membrane externe (Johnson et al., 2006) (Fig. 14).

III.4.2.1 : Le complexe de la membrane interne.

Le complexe de la membrane interne est constitué de différentes protéines à savoir les protéines GspE, GspL et GspM.

La protéine GspE est une protéine qui se localise au niveau de la membrane cytoplasmique via son interaction avec les protéines GspL et GspM (Johnson et al., 2006). De manière intéressante, la protéine GspE présente des sites de liaison à l'ATP, appelés "Walker A boxes". La présence de ces domaines impliqués dans la liaison de l'ATP suggère que la protéine GspE possède une activité d'ATPase qui fournit l'énergie nécessaire au processus de sécrétion (Sandkvist et al., 1995). Des études ont montré qu'une mutation au

Class/Genus	Species (type)	Sequenced strain(s)	Common niche(s)	Pathogenesis	T2S core genes ^D
γ-proteobacteria					
<i>Acinetobacter</i>	<i>calcoaceticus</i>	ADP1	Water, soil	Non-pathogen	-L, M
<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila</i>	Ah65	Water	Fish pathogen; septicemia	complete
<i>Erwinia</i> ^d	<i>carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	SCRI1043	Water, soil	Plant pathogen; potato blackleg and soft rot	complete
<i>Escherichia</i>	<i>chrysanthemi</i>	EC16	Water, soil	Plant pathogen; soft rot	complete
	<i>coli</i> O78:H11	H10407	Intestinal tract	Human pathogen; enterotoxigenic	complete
	<i>coli</i> O157:H7	EDL 933	Intestinal tract	Human pathogen; enterohemorrhagic	complete
	<i>coli</i> K-12	MG1655, MC4100	Laboratory strain	Non-pathogen	complete
	<i>coli</i> O15:H-	83/39	Intestinal tract	Rabbit pathogen; enteropathogenic	complete
	<i>coli</i> O6:H1	CFT073	Urinary tract	Human pathogen; cystitis	complete
<i>Idiomarina</i>	<i>loihensis</i>	L2TR	Deep sea vents	Non-pathogen	complete
<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	UNF5023	Water, soil	Human pathogen; various infections	complete
<i>Legionella</i> ^e	<i>pneumophila</i>	130b, Lens, Paris, Philadelphia-1	Water	Human pathogen; pneumonia	complete
<i>Methylococcus</i>	<i>capsulatus</i>	Bath	Water, sediment	Non-pathogen	-C
<i>Photobacterium</i>	<i>profundum</i>	SS9	Deep sea vents	Non-pathogen	complete
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	PA01, PAK	Water, soil, plants	Human pathogen; various infections	complete
	<i>alkaligenes fluorescens</i>	M-1	Soil	Non-pathogen	complete
	<i>putida</i>	Pf-5	Soil, water, plants	Non-pathogen	complete
	<i>syringae</i> pv. <i>tomato</i>	KT2440, WCS358	Soil	Non-pathogen	complete
			DC3000	Plants	Plant pathogen; tomato speck
<i>Shewanella</i>	<i>oneidensis</i>	MR-1	Water	Non-pathogen	complete
<i>Vibrio</i>	<i>cholerae</i> El Tor	TRH7000, N16961	Water, shellfish	Human pathogen; cholera	complete
	<i>fischeri</i>	ES114	Squid symbiont	Non-pathogen	complete
	<i>parahaemolyticus</i>	RIMD2210633	Water, shellfish	Human pathogen; gastroenteritis	complete
	<i>vulnificus</i>	YJO16	Water, shellfish	Human pathogen; septicemia	complete
<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodia</i> pv. <i>citri</i>	306	Water, soil	Plant pathogen; citrus canker	complete
	<i>campestris</i> pv. <i>campestris</i>	ATCC 33913, XC1701	Water, soil	Plant pathogen; black rot	complete
<i>Xylella</i>	<i>fastidiosa</i>	Temecula	Plant xylem	Plant pathogen	complete
<i>Yersinia</i>	<i>enterocolitica</i>	WA-314	Animal and human intestine	Human pathogen; gastroenteritis	complete
	<i>pestis</i> bv. <i>Mediavalis</i>	KIM	Rodents	Human pathogen; the plague	-M
	<i>pestis</i> bv. <i>Orientalis</i>	CO92	Rodents	Human pathogen; the plague	-M
	<i>pseudotuberculosis</i>	IP32953	Animal and human intestine	Human pathogen; gastroenteritis	-M
α-proteobacteria					
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	USDA110	Plant symbiont	Non-pathogen	-C, I, M
<i>Caulobacter</i>	<i>crenatus</i>	CB15	Water	Non-pathogen	complete
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>diazotrophicus</i>	SRT7	Sugarcane endophyte	Non-pathogen	-K
<i>Mesorhizobium</i>	<i>loti</i>	MAFF303099	Plant symbiont	Non-pathogen	-M
β-proteobacteria					
<i>Azoarcus</i>	sp.	EbN1	Water, soil	Non-pathogen	-M
<i>Burkholderia</i>	<i>mallei</i>	ATCC 23344	Horses, mules, donkeys	Human pathogen; glanders	complete
	<i>pseudomallei</i>	K96243	Water, soil	Human pathogen; melioidosis	complete
<i>Chromobacterium</i>	<i>violaceum</i>	ATCC 12472	Water, soil	Non-pathogen	-M
<i>Ralstonia</i>	<i>solanacearum</i>	GMI 1000	Soil	Broad-range plant pathogen	complete
δ-proteobacteria					
<i>Bdellovibrio</i>	<i>bacteriovorus</i>	HD100	Water, soil	Non-pathogen	-L, M
<i>Geobacter</i>	<i>sulfurreducens</i>	PCA	Sediments	Non-pathogen	complete

Tableau 1 : Conservation des gènes encodant le système de sécrétion de Type II chez différents groupes bactériens (Cianciotto, 2005).

niveau du site de liaison à l'ATP réduit fortement l'activité ATPase de la protéine GspE et affecte la sécrétion.

Des expériences de purification du complexe GspELM par chromatographie d'affinité ont également mis en évidence l'implication d'une quatrième protéine, la protéine GspF. Cette dernière protéine renforce l'association de la protéine GspE à la membrane cytoplasmique (Filloux, 2004).

Des analyses de séquences ont permis de mettre en évidence des homologies entre certains composants du système de sécrétion de Type II et du système de sécrétion de Type IV impliqués dans la biogénèse du pilus. Ainsi, les protéines GspG, H, I, J et K, composants du système de sécrétion de Type II, présentent de fortes similarités avec les sous unités de la piline du pilus de type IV, PilA (Johnson et al., 2006). Aux vues des similarités observées entre les protéines codées par les deux types de systèmes tant au niveau de leur séquence que de leur structure, les protéines G, H, I, J et K ont été désignées sous le terme de *pseudopilines*. Ces protéines comportent un peptide signal d'export et s'assemblent en une structure qui ressemble à un pilus (Sandkvist, 2001). Ce pseudopilus agit comme un piston et permet, grâce à des processus de polymérisation et de rétraction des pseudopilines, le passage des protéines à travers le pore de sécrétion en membrane externe (Johnson et al., 2006). L'énergie nécessaire à l'éjection de la protéine sécrétée est fournie par la protéine GspE similaire aux deux ATPases PilF et PilT, requises dans l'élaboration du pilus de type IV (Sandkvist, 2001).

L'assemblage du pseudopilus est précédé par le clivage du peptide signal des pseudopilines par la protéine GspO homologue de la prépiline peptidase, PilD (Filloux, 2004).

III.4.2.2 : Le complexe de la membrane externe.

Le complexe de la membrane externe contient la protéine nommée GspD qui est communément appelée sécrétine (Filloux, 2004). Cette protéine s'assemble sous la forme d'un multimère constitué de 12 à 14 sous-unités qui forme le pore de sécrétion.

Le domaine C-terminal de GspD est hautement conservé et nécessaire à son ancrage en membrane externe alors que son domaine N-terminal est variable et libre d'interagir avec les autres constituants périplasmiques du système de sécrétion de Type II ou avec la protéine sécrétée (Johnson et al., 2006). Ces différentes interactions induisent des changements de conformation au niveau du domaine C-terminal de GspD et permettent l'ouverture du pore de sécrétion (Sandkvist, 2001). Ce changement d'état au niveau du pore de sécrétion de la membrane externe nécessite de l'énergie, fournie par GspE.

L'énergie produite par GspE au niveau de la membrane interne est propagée à la membrane externe via la protéine GspC. GspC joue donc le rôle d'intermédiaire entre les composants des membranes interne et externe (Sandkvist, 2001).

La variabilité des séquences de GspD et GspC selon l'espèce considérée suggère leur implication dans la reconnaissance spécifique du substrat à sécréter par l'appareil de sécrétion de Type II (Filloux, 2004).

Si la majorité des composants du système de sécrétion de Type II est bien conservé au sein des protéobactéries, certaines protéines sont spécifiques de certaines espèces. Ainsi, la protéine GspS est une lipoprotéine qui stabilise GspD et permet son insertion en membrane externe chez certaines espèces bactériennes telles que *Klebsiella* et *Erwinia*. De même, les protéines GspA et GspB sont essentielles à la sécrétion de Type II chez *Aeromonas hydrophila* (Filloux, 2004). Une autre protéine, la protéine GspN, n'a été identifiée que chez très peu d'espèces bactériennes (*K. oxytoca*, *E. carotovora*, *X. campestris* et *P. putida*) où elle interagit avec la sécrétine (Filloux, 2004).

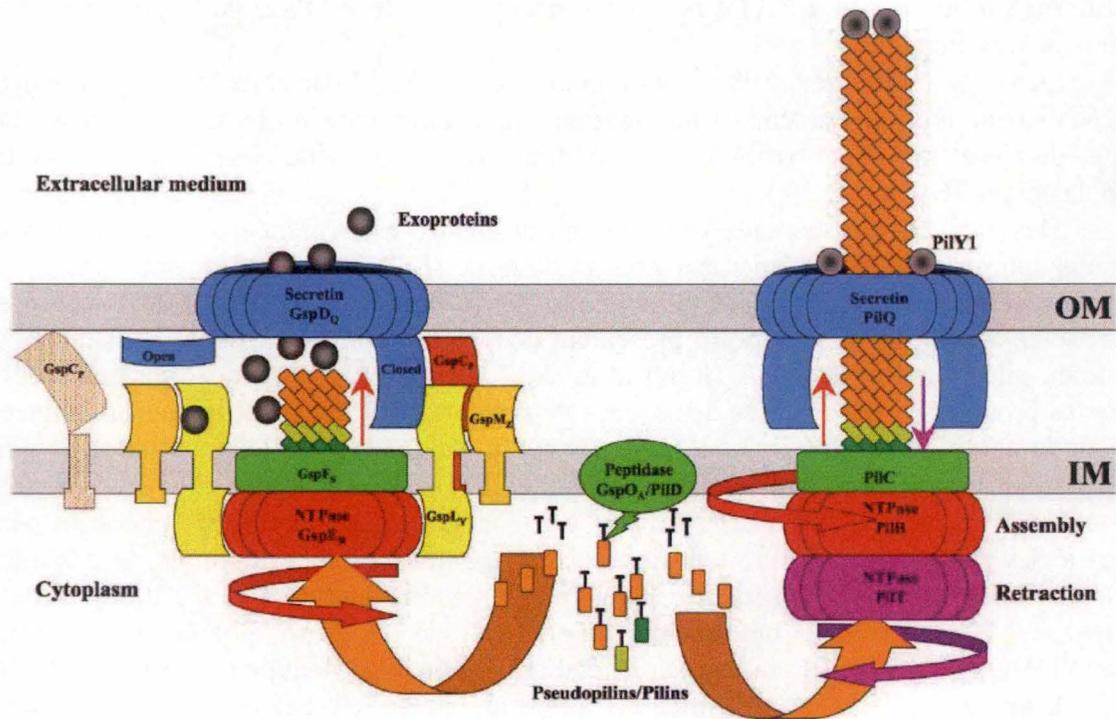


Figure 14 : Structure du système de sécrétion de Type II (à gauche) et du pilus de Type IV chez *P. aeruginosa* (à droite). Les protéines transloquées dans le périplasme par le système Sec, sont reconnues par la machinerie de sécrétion de Type II et transportées à travers la membrane externe (OM) via la sécrétine GspD. L'ATPase, GspE, en membrane interne fournit l'énergie nécessaire au processus de sécrétion et forme un complexe avec les protéines GspL et GspM. Le complexe GspEML induit la formation d'un pseudopilus composé de pseudopilines maturées par la peptidase GspO qui expulse les exoprotéines à travers le canal de sécrétion (Filloux, 2004).

III.4.3 : Protéines sécrétées par le système de sécrétion de Type II

Le système de sécrétion de Type II a été mis en évidence chez *Klebsiella oxytoca* où il est requis dans le transport de la pullulanase, une lipoprotéine qui dégrade l'amidon. Depuis lors, ce système de transport a été découvert chez d'autres organismes, pathogènes ou non (*E. coli*, *P. aeruginosa*...), et est impliqué dans la sécrétion de protéines diverses telles des toxines, des protéases, des cellulases ou des lipases (Tableau 2). Bien que chez les pathogènes d'animaux ou de l'Homme, ce système de sécrétion est requis pour l'établissement de l'infection (Scott, Dossani & Sandkvist, 2001), il participe à la sécrétion d'enzymes hydrolytiques chez les organismes non pathogènes et leur permet ainsi de s'adapter à leur environnement (Cianciotto, 2005). Ainsi, chez la bactérie non pathogène, *P. putida*, le système de sécrétion de Type II est impliqué dans la sécrétion d'enzymes capables d'oxyder le manganèse, l'un des constituants principaux de la croûte terrestre essentiel à la structure et au fonctionnement de nombreux enzymes. Des études ont montré que l'oxydation et la réduction du manganèse sont catalysées par des enzymes oxydatrices sécrétées par le système de sécrétion de Type II (De Vrind et al., 2003).

De même, chez la bactérie pathogène *P. aeruginosa*, l'appareil de sécrétion de Type II est composé de 12 gènes nommés *xcpA* et *xcpR-Z* et responsable de la sécrétion de lipases, d'élastases, de phospholipases et de l'exotoxine A. Grâce à des analyses de séquences, un deuxième système, homologue au système Xcp connu chez *P. aeruginosa*, a été découvert. Ce système porte le nom de Hxc (Homologous to xcp genes) (Ball et al., 2002).

La présence de ces deux systèmes permet à la bactérie de réguler la sécrétion d'exoenzymes adéquates par rapport au milieu dans lequel elle se trouve.

Bien que des analyses *in silico* aient permis de détecter un système de sécrétion de Type II chez diverses bactéries, à l'heure actuelle, son rôle et sa régulation sont encore mal définis. L'utilisation d'organismes modèles tels que *Caulobacter crescentus* pourrait nous permettre de comprendre ces processus plus en détails.

IV. *Caulobacter crescentus*.

IV.1. Généralités

C. crescentus est une bactérie qui appartient au groupe des alphaprotéobactéries. Ce groupe compte de nombreuses espèces bactériennes qui montrent une grande variabilité au niveau de leur capacité métabolique, de leur morphologie et de leur cycle cellulaire. Elles peuplent diverses niches écologiques et se développent souvent en associations étroites avec des eucaryotes unicellulaires ou multicellulaires (nématodes, arthropodes, plantes, etc...).

Les alphaprotéobactéries présentent des styles de vie très divers. Ce groupe comporte notamment des parasites de plantes (*Agrobacterium*), des pathogènes intracellulaires facultatifs de mammifères (*Brucella* et *Bartonella*), des symbiontes de plantes (*Rhizobium*) et des pathogènes intracellulaires obligatoires de mammifères et d'arthropodes (*Rickettsia*, *Anaplasma* et *Wolbachia*). Bien que les alphaprotéobactéries présentent une variabilité phénotypique importante, de nombreuses homologues de séquences existent entre leurs génomes et en particulier au niveau de la séquence des gènes qui encode l'ARN 16S (Kainth & Gupta, 2005).

C. crescentus est une alphaprotéobactérie qui présente la particularité de mener une vie à l'état libre et de n'être pathogène d'aucune espèce eucaryote connue. Les espèces

Species or plasmid (description)	Environmental niche(s)	Disease(s) or effect(s)	Type II secreted protein(s)
<i>V. cholerae</i> (human pathogen)	Brackish and estuarine water, associated with crustaceans, human small intestine	Cholera	CT, HAP, chitinase, neuraminidase, lipase
<i>A. hydrophila</i> (fish pathogen, opportunistic human pathogen)	Aquatic, soil	Haemorrhagic septicemia in fish, occasional gastroenteritis, septicemia and meningitis in humans	Aerolysin, amylase, phospholipase, proteases (both metallo and serine), DNase
<i>K. oxytoca</i> (opportunistic pathogen of hospitalized patients)	Aquatic, soil	Nosocomial infections	Pullulanase
<i>E. chrysanthemi</i> and <i>corotovora</i> (plant pathogen)	Aquatic, soil, plant surfaces	Soft rot in plant tissues	Plant cell wall-degrading enzymes such as cellulases, pectate lyases, pectin methylesterase, polygalacturonase
<i>P. aeruginosa</i> (opportunistic human pathogen)	Aquatic, soil, plant surfaces	Chronic infection in cystic fibrosis patients, burn victims, and cancer patients	Exotoxin A, elastase, LasA, alkaline phosphatase, lipases LipA and LipC, phospholipase C
<i>X. campestris</i> (plant pathogen)	Aquatic, soil, plant surfaces	Black rot in crucifers	Polygalacturonate lyase, α -amylase, protease and endoglucanase
<i>B. pseudomallei</i> (opportunistic human pathogen)	Aquatic, soil	Melioidosis	Protease, lipase, phospholipase C
<i>B. cepacia</i> (opportunistic human pathogen)	Aquatic, soil	Pulmonary infection in cystic fibrosis patients	Protease, lipase
<i>L. pneumophila</i> (human pathogen)	Freshwater, intracellular parasite of protozoa and human alveolar macrophages	Legionnaires' disease	Acid phosphatase, lipase, phospholipase A, RNase, protease (Msp), lipase
<i>E. coli</i> K-12 (M1655) (nonpathogenic)	Part of the normal flora in human large intestine	Nosocomial infections	Chitinase
Plasmid pO157 (from <i>E. coli</i> O157:H7, a human pathogen)		Diarrhea, hemorrhagic colitis, hemolytic uremic syndrome	?
<i>P. putida</i> (promotes plant growth)	Aquatic, soil	Rarely associated with clinical infection	?
<i>X. fastidiosa</i> (plant pathogen)	Xylem of plants	Blockage of xylem, leaf scorching, slows plant growth	?
<i>S. putrefaciens</i> (only occasionally associated with human disease)	Aquatic, soil, oil, fish products	Rare bacteremia, soft tissue infection, otitis media	?
<i>C. crescentus</i>	Aquatic, soil	?	?
<i>Y. pestis</i> (human pathogen)	Rodents, rat fleas	Bubonic and pneumonic plague	?
<i>G. sulfurreducens</i>	Aquatic sediments		?

Tableau 2 : Nature et implication des protéines sécrétées par le système de sécrétion de Type II chez différentes espèces bactériennes (Scott, Dossani & Sandkvist, 2001).

bactériennes pathogènes, si elles constituent un sujet d'étude intéressant, sont souvent plus difficiles à manipuler en laboratoire de part le danger qu'elles représentent et les normes sanitaires à respecter lors de leur utilisation.

C. crescentus est un excellent modèle d'études des mécanismes moléculaires qui régissent les alphaprotéobactéries de part sa facilité d'utilisation et des nombreux outils moléculaires disponibles. Le séquençage de son génome (+/- 4Mb), qui compte environ 3770 gènes, a permis le développement de nombreuses études génétiques, génomiques et protéomiques (Skerker & Laub, 2004). De plus, les populations de cellules qui caractérisent le cycle de division de *C. crescentus* peuvent être séparées par centrifugation en gradient et permettent, par conséquent, de travailler sur des populations synchrones.

En outre, bien que *C. crescentus* soit proche des alphaprotéobactéries, elle semble posséder des systèmes communs aux gammaprotéobactéries. Ces similarités concernent principalement les systèmes de sécrétion et notamment le système de sécrétion de Type II. En effet, ce système chez *C. crescentus* est très proche, en terme d'homologies de séquences, de celui des gammaprotéobactéries.

IV.2. Dimorphisme et différenciation

C. crescentus constitue un modèle de choix dans l'étude des processus liés au cycle cellulaire. En effet, le cycle cellulaire de *C. crescentus* est caractérisé par une division asymétrique où une cellule mère donne naissance à deux cellules filles de morphologies et de tailles différentes, à savoir une petite cellule flagellée inerte pour la réplication de l'ADN et une grande cellule pédonculée capable de répliquer son ADN (Fig. 15). Dès lors pour entamer un nouveau cycle de division, la petite cellule flagellée devra au préalable se différencier en cellule pédonculée.

Les deux cellules filles, bien que génétiquement identiques, sont morphologiquement et fonctionnellement très différentes. En effet, la cellule pédonculée est pourvue d'un appendice polaire nommé indifféremment "stalk", pédoncule ou "prostheca" qui comporte une extrémité adhésive permettant l'attachement à une surface. La petite cellule flagellée peut, elle, se déplacer dans l'environnement grâce à son flagelle (Ausmees & Jacobs-Wagner, 2003).

De manière intéressante, le dimorphisme divisionnel est une caractéristique des organismes qui sont parfaitement adaptés aux environnements pauvres en nutriments. En effet, les formes flagellées cherchent un environnement riche en nutriments, et lorsque celui-ci est trouvé, elles se différencient en cellules pédonculées qui peuvent alors coloniser la niche grâce à une réplication active. Cette bactérie aquatique est présente en eaux douces et en milieux marins où elle y joue un rôle important dans le cycle global du carbone en minéralisant les matériaux organiques dissous.

La plupart des études menées sur *C. crescentus* visent à comprendre les mécanismes liés au cycle cellulaire procaryotique et plus particulièrement ceux impliqués dans la différenciation des cellules flagellées en cellules pédonculées.

La progression du cycle cellulaire, chez tout organisme, requiert une coordination précise de quatre processus principaux : la réplication de l'ADN, la ségrégation du chromosome, la division et la croissance cellulaire (Ryan & Shapiro, 2003) (Fig. 16).

Si les cellules flagellées sont mobiles et chémotactiles, elles ne peuvent répliquer leur ADN et sont bloquées en phase G1 et cela jusqu'à ce qu'elles trouvent un endroit propice à leur survie. A ce moment là, elles se différencient en cellules pédonculées. Cette étape de différenciation induit le passage de la phase G1 en phase S du cycle cellulaire. Cette transition implique des changements morphologiques telles la perte du flagelle et des pili et

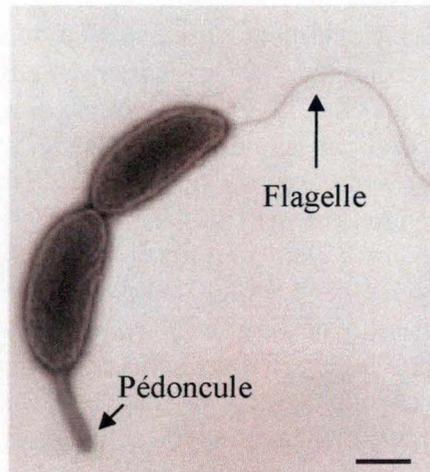


Figure 15 : Micrographie électronique à transmission (MET) montrant le dimorphisme obligatoire chez *Caulobacter crescentus*. Représentation d'une cellule prédivisionnelle en fin de cytokinèse où s'individualise déjà la petite cellule flagellée (P) et la grande cellule pédonculée (G). La barre d'échelle équivaut à 0,5 μm (Skerker & Laub, 2004).

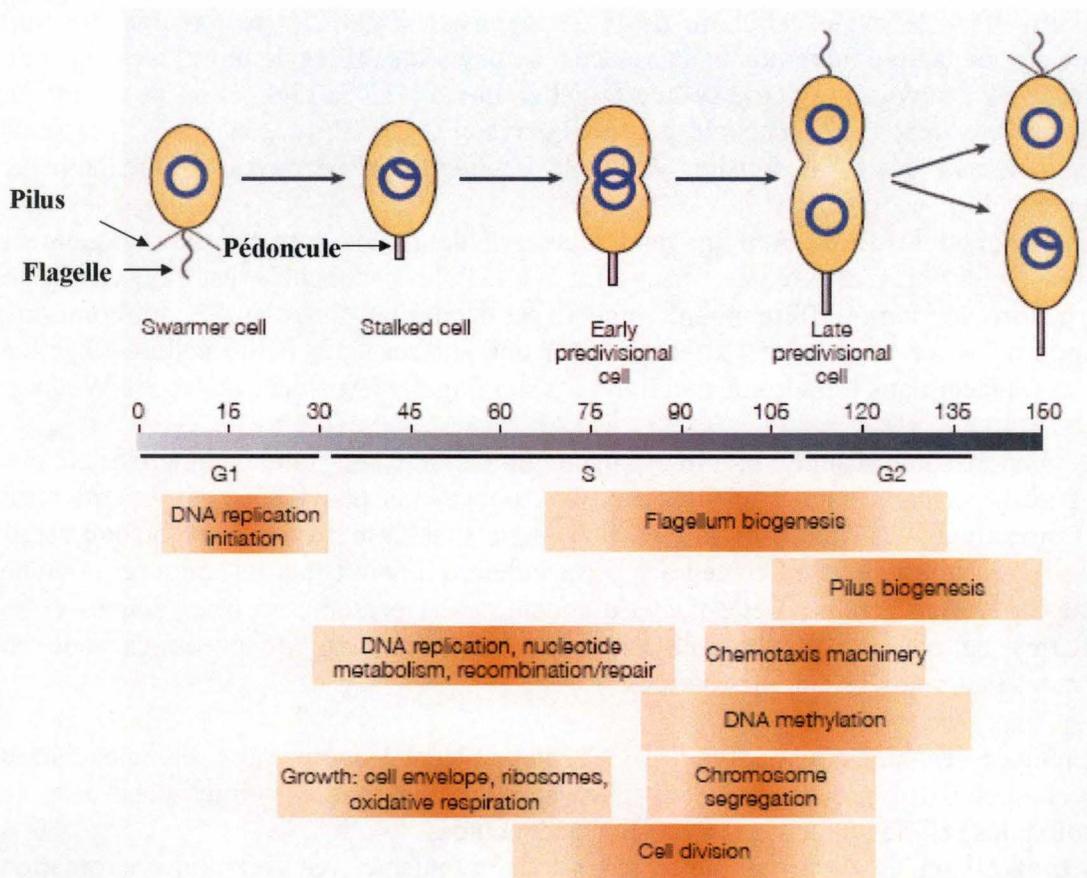


Figure 16 : Cycle de division de *Caulobacter crescentus*. *C. crescentus* présente une division asymétrique qui conduit à la formation de cellules filles de tailles et de fonctions différentes, une petite cellule flagellée capable de se déplacer dans le milieu et une cellule pédonculée capable de répliquer son ADN. Pour entamer un nouveau cycle de division les cellules flagellées doivent se différencier en cellules pédonculées. Lors de cette différenciation, les cellules perdent leur flagelle et leur pili et acquièrent un pédoncule au même pôle. La ligne du temps est exprimée en minutes (Skerker & Laub, 2004).

l'apparition d'un pédoncule à l'endroit précédemment occupé par le flagelle (Ausmees & Jacobs-Wagner, 2003). Lors de l'entrée en phase S, la cellule pédonculée initie la réplication de son ADN et s'allonge pour donner une cellule prédivisionnelle asymétrique. Avant la séparation des deux cellules filles, un nouveau flagelle immobile est synthétisé au pôle opposé à celui qui porte le pédoncule. La mise en route du moteur flagellaire ne se produit que lorsque la septation aura été établie et permettra la séparation des cellules filles néoformées. Une des cellules filles est pédonculée et réinitie directement la réplication de son ADN alors que l'autre cellule fille, flagellée, doit se différencier en cellule pédonculée avant de pouvoir répliquer son ADN (Ryan & Shapiro, 2003) (Amick & Brun, 2001).

Si les mécanismes impliqués dans la régulation intracellulaire du cycle de division et de la différenciation sont relativement bien étudiés chez *C. crescentus*, peu de données existent sur les régulations qui peuvent s'établir entre différentes cellules au niveau extracellulaire

La distribution ubiquiste de *C. crescentus* ainsi que son mode de vie (formation de biofilms) suggère que cette bactérie sécrète des protéines qui lui permettent de s'adapter à son milieu. Cependant, la caractérisation des systèmes de sécrétion chez *C. crescentus* n'est pas très documentée. En effet, bien que cette bactérie présente des homologies de séquences avec d'autres espèces bactériennes, notamment pour les systèmes de sécrétion de Type II et IV, seul le système de sécrétion de Type I est caractérisé chez cette bactérie.

Le système de sécrétion de Type I qui est principalement décrit dans la sécrétion des toxines et des enzymes chez la plupart des bactéries, trouve une toute autre fonction dans le cas de *C. crescentus*.

IV.3. *C. crescentus* et le système de sécrétion de Type I

De nombreux micro-organismes sont enveloppés d'une couche de protéines de surface, la couche S. Cette couche joue le rôle de barrière de protection et permet également l'adhésion des cellules entre elles, le maintien de la structure et de la rigidité de l'enveloppe cellulaire. De récentes études ont montré que la sécrétion de la couche S chez *C. crescentus*, et plus précisément de la protéine qui la compose, RsaA, implique le système de sécrétion de Type I, alors que chez la plupart des bactéries Gram négatives cette couche est sécrétée par le système de sécrétion de Type II (Awram & Smit, 1998). Retrouvée chez de nombreux organismes incluant les bactéries à parois Gram positives, négatives et les archés, la couche S est ancrée à la membrane externe par des lipopolysaccharides fluides (S-LPS).

Chez *C. crescentus*, la couche S agit comme une barrière physique à l'égard de *Bdellovibrio bacteriovorus*, un parasite bactérien qui se reproduit dans l'espace périplasmique de ses hôtes (Koval & Hynes, 1991). La résistance que procure la couche S à ce parasite réside dans le fait que *B. bacteriovorus* est incapable de s'attacher aux cellules recouvertes par une telle couche.

De plus, la mutation de gènes impliqués dans la formation de la couche S chez *C. crescentus* induit une résistance au bactériophage, Φ CR30 (Edwards & Smit, 1991). L'utilisation de cette couche par le bactériophage comme voie d'entrée est probablement due au fait qu'elle soit la plus externe possible et qu'elle recouvre uniformément et abondamment la cellule, tout au long du cycle de vie. Elle constitue ainsi 10 à 12% des protéines cellulaires.

Conformément aux signaux d'adressage retrouvés dans la sécrétion de l'alpha hémolysine, RsaA possède un signal de sécrétion non clivé en région C-terminale ainsi que des domaines riches en glycine. De plus, des analyses de séquences à proximité du gène *rsaA* ont révélé la présence de deux ORF qui encodent des protéines similaires à celles de l'ABC

transporteur, *rsaD* et de la MFP, *rsaE*. Ces résultats tendent à confirmer l'hypothèse que chez *C. crescentus*, la couche S est sécrétée via le système de sécrétion de Type I.

En ce qui concerne la protéine qui forme le canal de sortie en membrane externe, sa caractérisation a été plus complexe. En effet, la sécrétion de la couche S chez *C. crescentus* présente la particularité de nécessiter de la présence de deux protéines au niveau de la membrane externe pour former un système fonctionnel (Toporowski et al., 2004). Ces deux protéines, *RsaFa* et *RsaFb*, ont été identifiées sur base d'homologies de séquences entre TolC d'*E. coli* et le génome de *C. crescentus*. Des études ont montré que la délétion d'un des deux gènes, *rsaFa* ou *rsaFb*, ne s'accompagne d'aucune modification dans la sécrétion de *RsaA* mais que la double délétion conduit à une perte totale de cette sécrétion.

La découverte de ces deux OMPs, nécessaires à la sécrétion protéique, fait du système de sécrétion de Type I de *C. crescentus*, un système à part entière qui demeure, à l'heure actuelle, le seul système de sécrétion connu et caractérisé chez *C. crescentus*.

Objectifs du mémoire

Les différentes manipulations réalisées au cours de ce mémoire visent à étudier et à caractériser le système de sécrétion de Type II chez *C. crescentus*. Ce système est conservé et décrit comme intervenant dans la sécrétion de toxines et d'enzymes protéolytiques chez un nombre important d'espèces bactériennes. Cependant, à l'heure actuelle, aucune donnée n'existe quant à son rôle et sa régulation chez *C. crescentus*.

Le choix d'étude de ce système est basé sur l'analyse bioinformatique du génome de *C. crescentus* qui présente, en terme d'homologies de séquences, des caractéristiques communes avec les gammaprotéobactéries, pour le système de sécrétion de Type II.

La sécrétion est un processus essentiel à la viabilité cellulaire chez tout organisme procaryote et eucaryote. La compréhension des mécanismes qui régulent le transport de protéines vers le milieu extracellulaire, en réponse à différents stimuli, est donc un sujet d'étude intéressant. *C. crescentus* a la particularité de se reproduire par division asymétrique et de générer deux cellules filles différentes, facilement dissociables en laboratoire. L'étude du système de sécrétion chez *C. crescentus* nous permet donc d'étudier la régulation des mécanismes de sécrétion en fonction du cycle cellulaire.

Notre premier objectif a été de mettre en évidence la sécrétion de protéines par *C. crescentus* à différents stades de croissance et dans différentes conditions nutritives.

Suite à la caractérisation des profils de sécrétion de la souche sauvage, un délétant pour les gènes du système de sécrétion de Type II a été construit. L'étude de ce délétant vise à déterminer l'implication du système de sécrétion de Type II dans la sécrétion hypothétique de protéines particulières en milieu riche ou en réponse à différents stress et de mettre en évidence son rôle éventuel dans d'autres mécanismes de régulation directs ou indirects dans la cellule.

Résultats

Résultats

Réalisation de profils protéiques de sécrétion chez *Caulobacter crescentus* dans différentes conditions.

1. Détection des protéines présentes dans les surnageants de culture de *C. crescentus*.

Les fractions protéiques issues des surnageants de culture sont généralement très diluées. Ainsi, le travail avec des protéines sécrétées nécessite une concentration préalable des protéines extracellulaires avant toute manipulation ultérieure. Cette étape de concentration consiste généralement à filtrer et à précipiter les surnageants de culture à l'acide trichloroacétique (TCA). Les précipités obtenus sont alors traités et analysés par électrophorèse SDS-PAGE sur gel 12 %.

Cependant, cette méthode n'a pas donné de profils de sécrétion satisfaisants chez *C. crescentus* (souche CB15N) à la vue de la faible quantité de protéines détectées sur gel (Fig. 16).

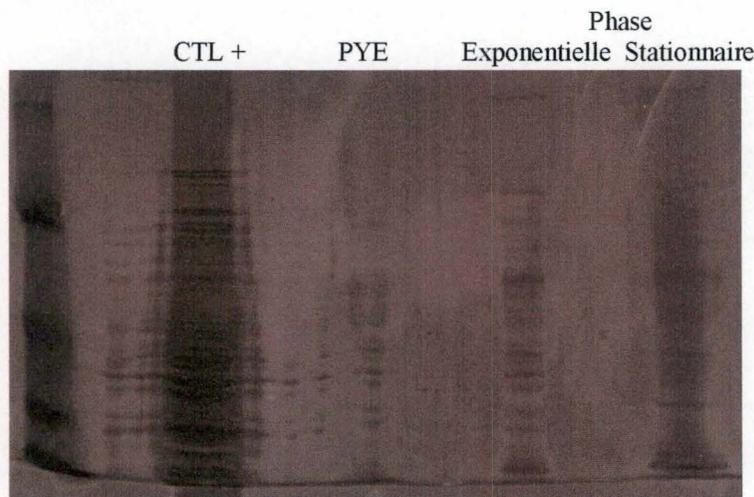


Figure 16 : Electrophorèse SDS-PAGE et détection au nitrate d'argent d'extraits protéiques obtenus par précipitation au TCA de lysats cellulaires (CTL+), de milieu nonensemencé (PYE) et de surnageants de culture de la souche sauvage à différentes phases du cycle cellulaire.

Deux hypothèses ont alors été envisagées : (i) Les surnageants de culture ne contiennent que très peu de protéines en raison d'une sécrétion extrêmement limitée par CB15N, (ii) La méthode de précipitation au TCA n'offre pas un rendement suffisant.

Pour trancher entre ces deux hypothèses, une autre méthode de précipitation des protéines, basée sur l'utilisation de pyrogallol red molybdate-methanol (PRMM), a été employée. Des études comparatives ont permis d'établir que cette méthode est plus efficace dans la précipitation des protéines que l'emploi du TCA (Caldwell & Lattemann, 2004).

L'analyse par électrophorèse SDS-PAGE d'extraits protéiques obtenus par précipitation au PRMM des surnageants de culture confirme que cette méthode de précipitation est plus efficace et garantit une meilleure résolution des profils de sécrétion (Fig. 17).

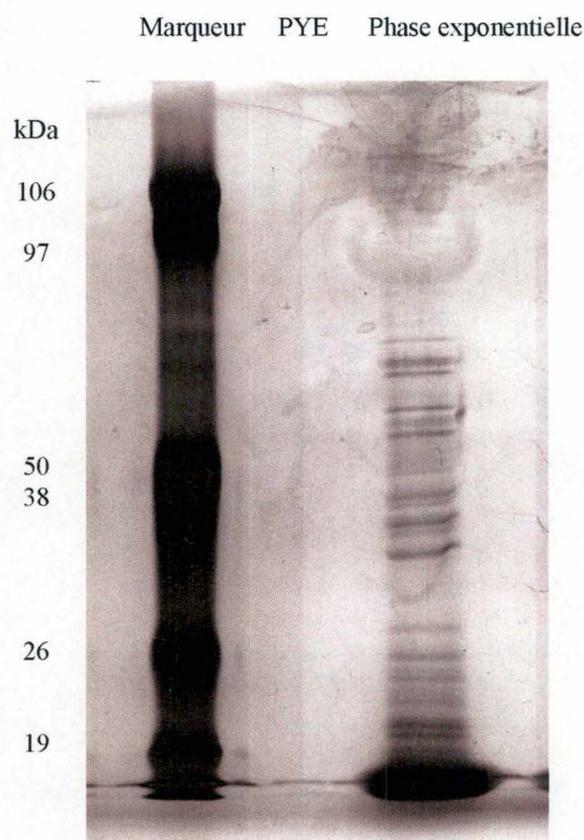


Figure 17 : Electrophorèse SDS-PAGE et coloration au nitrate d'argent d'extraits protéiques obtenus par précipitation au PRMM de surnageant de culture de la souche CB15N.

Il semble donc que *C. crescentus* sécrète des protéines dans le milieu extracellulaire. Ces résultats amènent une deuxième question : cette sécrétion est-elle modulée par la densité cellulaire ou/et les conditions nutritives ?

2. Evolution du profil de sécrétion de CB15N en fonction de l'état de croissance des cellules en milieu riche.

Plusieurs études ont montré, chez différentes espèces bactériennes, que la sécrétion de protéines est régulée par l'état de croissance ou par l'environnement dans lequel se trouve la cellule. En effet, chez les espèces bactériennes pathogènes tels *Agrobacterium* et *Helicobacter*, la sécrétion de molécules effectrices dépend du contact avec la cellule hôte.

L'analyse des profils de sécrétion obtenus après précipitation au PRMM des surnageants de culture de *C. crescentus* révèle qu'il existe une sécrétion protéique à tous les stades de croissance (Fig. 18). Il semble cependant que la quantité de protéines sécrétées augmente avec la densité optique, jusqu'à devenir étonnamment importante en condition de phase stationnaire ($DO_{660nm} = 1$). L'augmentation de la sécrétion pouvant être due à une augmentation de la densité cellulaire, il serait nécessaire de quantifier et de normaliser les échantillons avant le chargement sur gel. La numérotation des bandes indiquée, bien qu'approximative, permet une comparaison des profils de sécrétion entre eux.

Alors que certaines protéines sont détectées dans les surnageants de culture dès les premiers stades de croissance ($DO_{660nm} = 0,2$) comme l'indique les bandes annotées 7 et 8 sur

la figure 18, d'autres bandes protéiques numérotées 1, 2, 5 et 6 n'apparaissent qu'en fin de phase exponentielle de croissance ($DO_{660nm} = 0,6$).

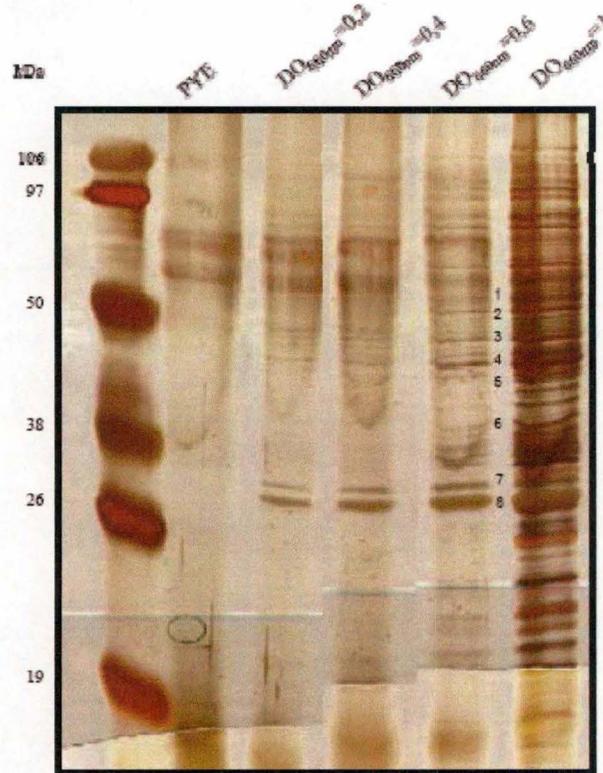


Figure 18 : Electrophorèse SDS-PAGE et coloration au nitrate d'argent d'extraits protéiques obtenus par précipitation au PRMM de milieu de culture nonensemencé (PYE) et de surnageants de culture de CB15N prélevés à différentes densités cellulaires.

3. Evaluation de la mortalité cellulaire.

La quantité importante de protéines détectée dans les surnageants de culture précipités suggère que des protéines cytoplasmiques pourraient contaminer les échantillons à la suite d'une lyse cellulaire et que, par conséquent, les protéines observées ne seraient pas réellement des protéines sécrétées. Cette hypothèse a été infirmée par l'absence des protéines cytoplasmiques, DivK et CreS-GFP, évaluée par *Western Blot*, dans les échantillons protéiques correspondant aux surnageants de culture précipités (Fig. 19).

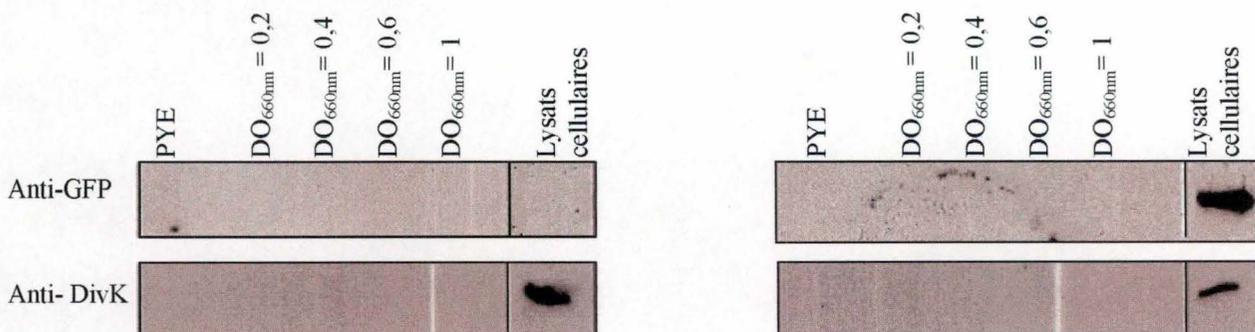


Figure 19 : Détection par *Western Blot* de DivK et de CreS-GFP dans les extraits protéiques obtenus par précipitation au PRMM du milieu de culture seul (PYE) et des surnageants de culture de CB15N prélevés à différentes densités optiques (660 nm) ainsi que dans les fractions cellulaires de la souche CB15N (à gauche) et de la souche CB15N *creS pMR10creS-gfp* (à droite).

Ces deux protéines étant respectivement un régulateur transcriptionnel et une protéine du cytosquelette fortement exprimés, sont en revanche retrouvées dans les lysats cellulaires. Ces résultats indiquent donc que s'il y a eu lyse cellulaire lors de la préparation des échantillons issus des surnageants de culture, celle-ci paraît négligeable et ne semble donc pas induire de contamination significative des échantillons par des composants cytoplasmique

Ces résultats ont, par ailleurs, été confirmés par la réalisation d'un test LIVE/DEAD sur des cellules prélevées en phase stationnaire où les cellules mortes ne représentent que 5 % de la population bactérienne totale (Fig. 20).

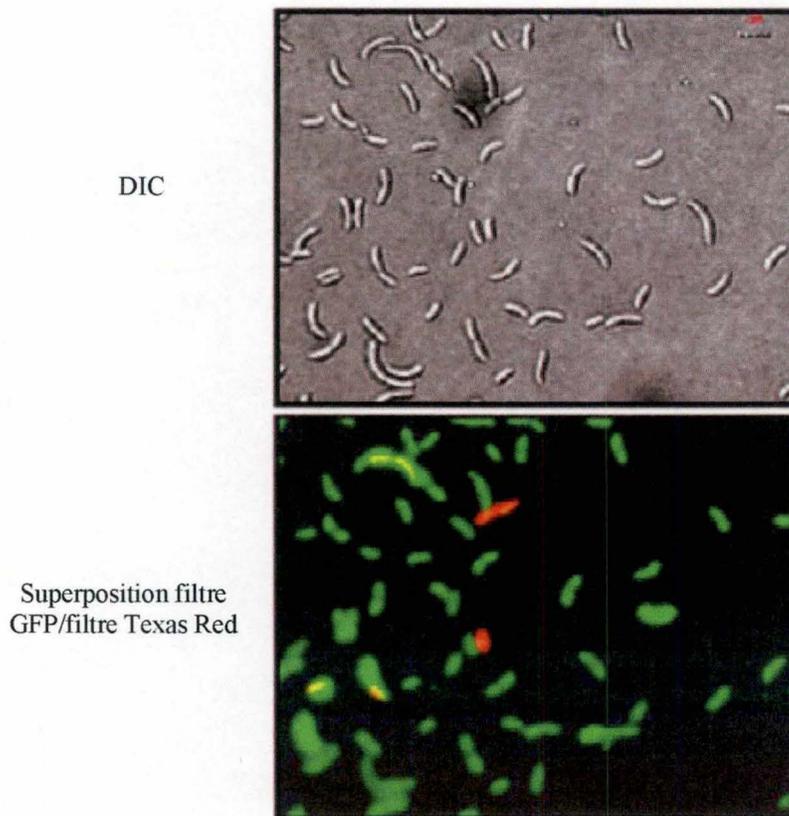


Figure 20 : Test LIVE/DEAD sur des cellules CB15N après une nuit de culture en milieu riche. Les bactéries vertes (émission de la GFP) sont considérées vivantes et les rouges (émission Texas red) mortes. Ces résultats indiquent que 95 % des cellules sont vivantes et qu'elles possèdent, par conséquent, une intégrité membranaire.

3. Evolution et comparaison des profils de sécrétion obtenus pour CB15N en milieu riche et en milieu appauvri.

Chez certaines gammaprotéobactéries, telles que *Vibrio* spp. et *Pseudomonas* spp., il semble que la sécrétion de certaines protéines et, en particulier, d'enzymes protéolytiques, soit activée par une carence en nutriments (Albertson, Nystrom & Kjelleberg, 1990).

L'analyse des profils de sécrétion obtenus à partir de cellules cultivées en milieu riche ou en milieu appauvri (cfr. matériels et méthodes) montre de manière générale que la sécrétion est favorisée en milieu riche. Cependant, et de manière similaire à ce qui a été décrit chez certaines gammaprotéobactéries (Pugsley & Francetic, 1998), la sécrétion d'une protéine (bande protéique annotée 2 sur la Fig. 21) semble être augmentée lorsque les cellules se retrouvent en milieu appauvri en nutriments.

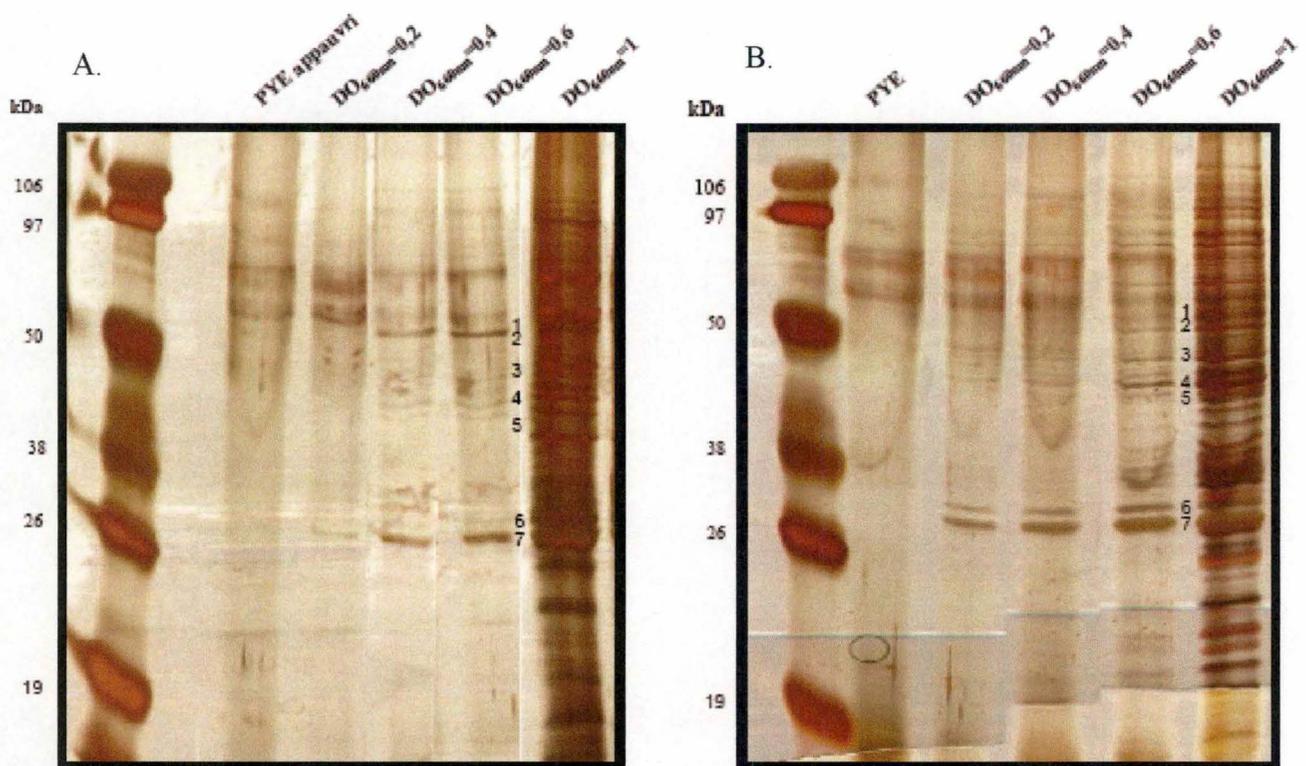


Figure 21 : Electrophorèse SDS-PAGE et coloration au nitrate d'argent d'extraits protéiques obtenus par précipitation au PRMM du milieu de culture seul (PYE et PYE appauvri) et des surnageants de culture de CB15N cultivée en milieu appauvri (A) ou en milieu riche (B) prélevés à différentes densités cellulaires.

L'ensemble de ces résultats indique que CB15N sécrète des protéines dont la quantité et la nature varient en fonction de la densité cellulaire et des conditions nutritives.

Création d'un délétant du système de sécrétion de Type II.

1. Le système de sécrétion de Type II étudié par une première approche bioinformatique.

Des analyses bio-informatiques ont mis en évidence la présence des quatre systèmes de sécrétion chez CB15N. La plupart des gènes impliqués dans ces systèmes sont conservés parmi les alphaprotéobactéries tels les gènes de l'opéron *virB* du système de sécrétion de Type IV. Cependant, de manière intéressante, les gènes de CB15N qui codent pour l'appareil de sécrétion de Type II prédit n'affichent pas d'homologies avec les alphaprotéobactéries mais présentent de hauts degrés d'homologie avec certains gènes des gammaprotéobactéries pathogènes ou non (Tableau 3). Etant donné l'absence de pathogénéicité de CB15N, il serait donc possible d'envisager que le système de sécrétion de Type II intervienne dans la détermination du mode de vie de *C. crescentus*.

Alignement avec une
gammaprotéobactérie pathogène

<i>Caulobacter crescentus</i> locus	Fonctions hypothétiques	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	E value
CC 0172 (GspC)	Protéine C du Type II	XcpP	7 exp (-05)
CC 0173 (GspD)	Protéine D du Type II	XcpQ	4 exp (-75)
CC 0174 (GspE)	Protéine E du Type II	XcpR	1 exp (-132)
CC 0175 (GspF)	Protéine F du Type II	XcpS	2 exp (-70)
CC 0176 (GspG)	Protéine G du Type II	XcpT	7 exp (-40)
CC 0177 (GspH)	Protéine H du Type II	XcpU	7 exp (-04)
CC 0178 (GspI)	Protéine I du Type II	XcpV	1 exp (-14)
CC 0179 (GspJ)	Protéine J du Type II	XcpW	5 exp (-15)
CC 0180 (GspK)	Protéine K du Type II	XcpX	2 exp (-24)
CC 0181 (GspL)	Protéine L du Type II	XcpY	5 exp (-06)
CC 0182 (GspM)	Protéine M du Type II	Pas d'homologie	
CC 0183 (GspN)	Protéine N du Type II	Pas d'homologie	
CC 0184 (GspO)	Protéine O du Type II	XcpO	8 exp (-33)

Alignement avec une
gammaprotéobactérie non pathogène

<i>Caulobacter crescentus</i> locus	Fonctions hypothétiques	<i>Pseudomonas putida</i>	E value
CC 0172 (GspC)	Protéine C du Type II	Pas d'homologie	
CC 0173 (GspD)	Protéine D du Type II	XcpQ	1 exp (-57)
CC 0174 (GspE)	Protéine E du Type II	XcpR	5 exp (-123)
CC 0175 (GspF)	Protéine F du Type II	XcpS	5 exp (-59)
CC 0176 (GspG)	Protéine G du Type II	XcpT	2 exp (-47)
CC 0177 (GspH)	Protéine H du Type II	XcpU	0,007
CC 0178 (GspI)	Protéine I du Type II	XcpV	0,003
CC 0179 (GspJ)	Protéine J du Type II	Pas d'homologie	
CC 0180 (GspK)	Protéine K du Type II	XcpX	5 exp (-20)
CC 0181 (GspL)	Protéine L du Type II	Pas d'homologie	
CC 0182 (GspM)	Protéine M du Type II	Pas d'homologie	
CC 0183 (GspN)	Protéine N du Type II	Pas d'homologie	
CC 0184 (GspO)	Protéine O du Type II	XcpO	2 exp (-33)

Alignement avec une
alphaprotéobactérie pathogène

<i>Caulobacter crescentus</i> locus	Fonctions hypothétiques	<i>Brucella melitensis</i>	E value
CC 0172 (GspC)	Protéine C du Type II	Pas d'homologie	
CC 0173 (GspD)	Protéine D du Type II	Pas d'homologie	
CC 0174 (GspE)	Protéine E du Type II	GspE	4 exp (-06)
CC 0175 (GspF)	Protéine F du Type II	Pas d'homologie	
CC 0176 (GspG)	Protéine G du Type II	Pas d'homologie	
CC 0177 (GspH)	Protéine H du Type II	Pas d'homologie	
CC 0178 (GspI)	Protéine I du Type II	Pas d'homologie	
CC 0179 (GspJ)	Protéine J du Type II	Pas d'homologie	
CC 0180 (GspK)	Protéine K du Type II	Pas d'homologie	
CC 0181 (GspL)	Protéine L du Type II	Pas d'homologie	
CC 0182 (GspM)	Protéine M du Type II	Pas d'homologie	
CC 0183 (GspN)	Protéine N du Type II	Pas d'homologie	
CC 0184 (GspO)	Protéine O du Type II	Pas d'homologie	

Alignement avec une
alphaprotéobactérie non pathogène

<i>Caulobacter crescentus</i> locus	Fonctions hypothétiques	<i>Mezorhizobium loti</i>	E value
CC 0172 (GspC)	Protéine C du Type II	Pas d'homologie	
CC 0173 (GspD)	Protéine D du Type II	GspD	9 exp (-40)
CC 0174 (GspE)	Protéine E du Type II	GspE	3 exp (-84)
CC 0175 (GspF)	Protéine F du Type II	GspF	3 exp (-29)
CC 0176 (GspG)	Protéine G du Type II	GspG	2 exp (-22)
CC 0177 (GspH)	Protéine H du Type II	GspH	1 exp (-0,5)
CC 0178 (GspI)	Protéine I du Type II	Pas d'homologie	
CC 0179 (GspJ)	Protéine J du Type II	Pas d'homologie	
CC 0180 (GspK)	Protéine K du Type II	Pas d'homologie	
CC 0181 (GspL)	Protéine L du Type II	Pas d'homologie	
CC 0182 (GspM)	Protéine M du Type II	Pas d'homologie	
CC 0183 (GspN)	Protéine N du Type II	Pas d'homologie	
C.c 0184 (GspO)	Protéine O du Type II	GspO	9 exp (-0,4)

Tableau 3 : Tableaux illustrant les alignements de séquences réalisés entre *C. crescentus*, des gamma- et des alphaprotéobactéries, pathogènes ou non, pour les composants du système de sécrétion de Type II.

Cette analyse *in silico* montre qu'il existe une homologie relativement importante entre les composants du système de sécrétion de Type II de *C. crescentus* et celui des gammaprotéobactéries et principalement de la gammaprotéobactérie pathogène, *P. aeruginosa*. Cependant, aucune donnée à ce jour, ne permet de définir le rôle de ce système chez CB15N.

Les gènes encodant l'appareil de sécrétion de Type II se disposent en opéron avec une organisation relativement bien conservée chez les différentes espèces bactériennes (Fig. 22). *C. crescentus* possède l'ensemble des gènes impliqués dans la formation de l'appareil de sécrétion de Type II, notés *gsp* (General secretion pathway) C à O. Alors que les gènes *gspC* à *gspN* sont dans la même orientation, le gène *gspO*, prédit pour encoder une pré-piline peptidase, est dans une orientation inverse du reste de l'opéron (Fig. 23).

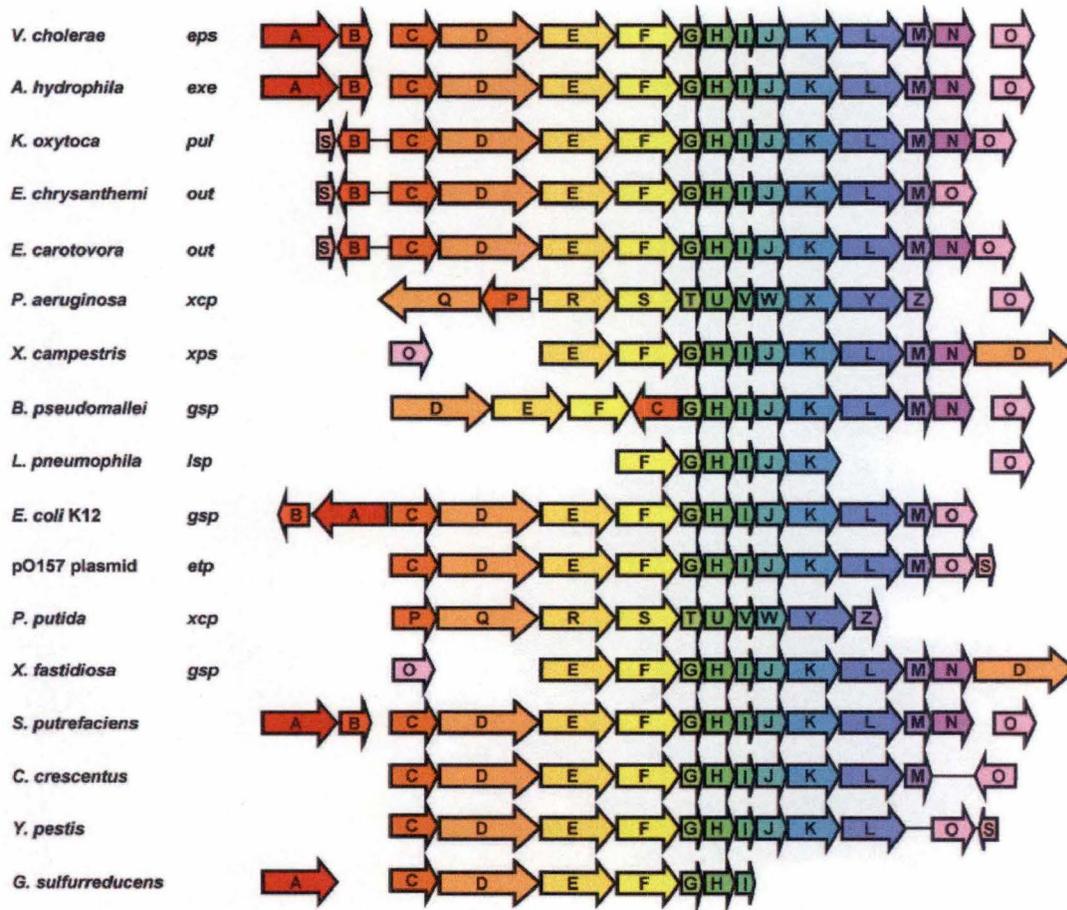


Figure 22 : Conservation et organisation des gènes qui codent le système de sécrétion de Type II chez différentes espèces bactériennes. Le système de sécrétion de Type II est constitué d'au moins 11 gènes *gspA-O*, organisé en opéron dont la structure est relativement bien conservée (Scott et al., 2001)

De manière à caractériser le rôle du système de sécrétion de Type II chez *C. crescentus*, nous avons choisi de déléter l'opéron *gsp* des gènes *gspC* (CC 0172) à *gspN* (CC 0183).

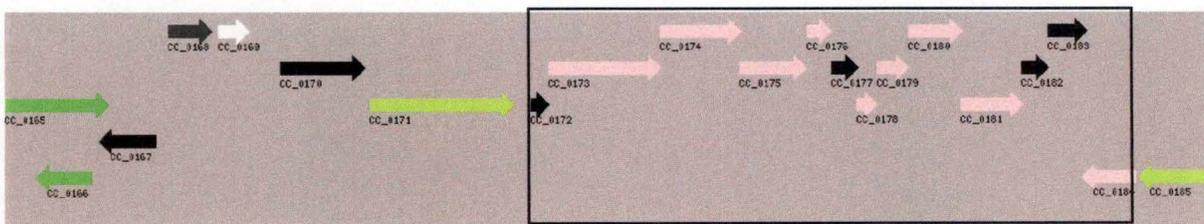


Figure 23 : Représentation de la région contenant l'opéron (encadré) codant pour les composants du système de sécrétion de Type II.

2. Obtention de la souche délétée pour les gènes *gspC-N*.

La stratégie employée pour la création de ce délétant est représentée schématiquement en figure 24 et passe par deux étapes de recombinaison, la première sélectionnable en kanamycine et la seconde sur sucrose grâce à la présence d'un marqueur de contre sélection (*sacB*).

Cette délétion est réalisée entre le locus CC 0172 et le locus CC 0183 et correspond, par conséquent à une délétion " propre ", sans insertion de cassette de résistance à un antibiotique.

Cette stratégie de délétion nécessite la construction d'un plasmide intégratif qui comporte, en plus d'un marqueur de sélection positif (généralement un gène de résistance à un antibiotique) et d'un marqueur de contre sélection, les régions flanquantes de la région d'ADN à déléter (environ 500 pb chacune).

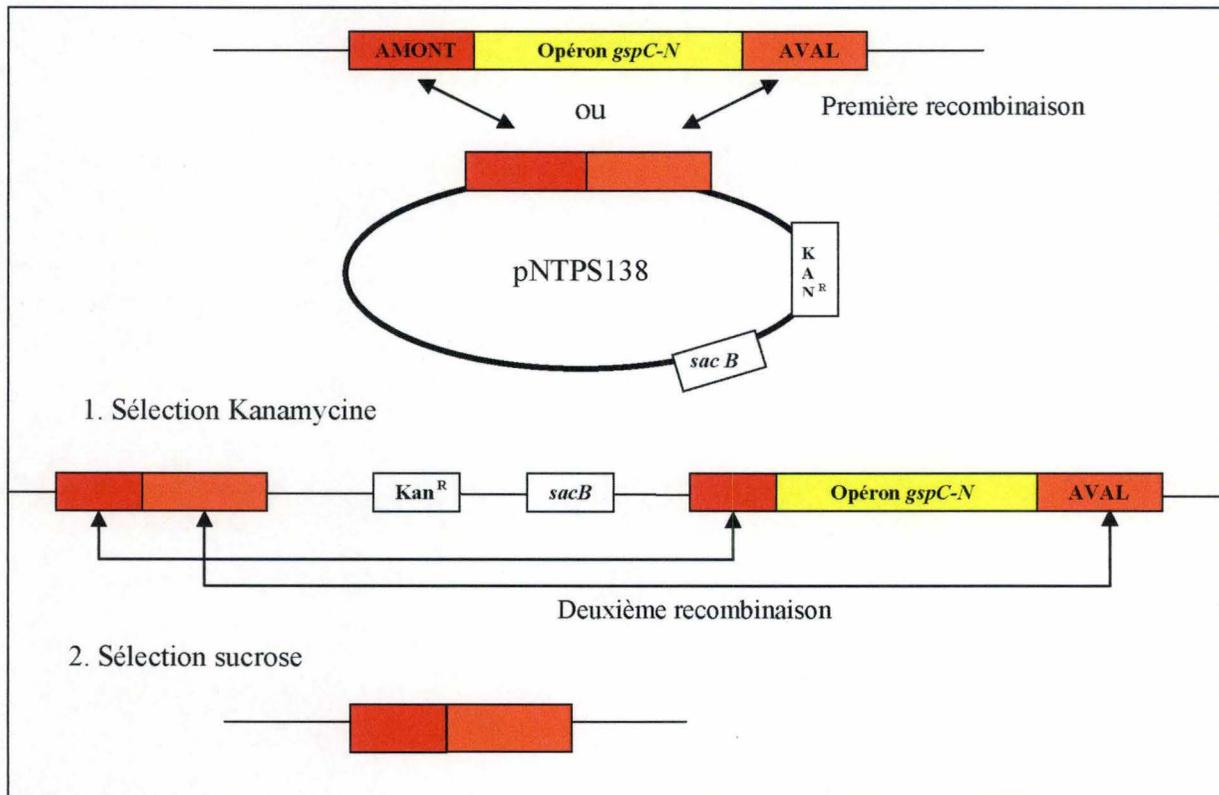


Figure 24 : Représentation schématique de la stratégie utilisée pour la délétion du système de sécrétion de Type II chez *C. crescentus*.

La première recombinaison a lieu entre l'une des régions flanquantes de l'opéron et la région correspondante clonée dans le vecteur intégratif. Les clones qui ont intégré le plasmide, par cette première recombinaison, sont sélectionnés sur un milieu contenant de la kanamycine puis remis en culture en milieu riche sans l'antibiotique. L'absence de pression de sélection permet une deuxième étape de recombinaison qui a lieu entre les régions amont ou avale dupliquées sur l'ADN génomique. Cette étape conduit à l'excision du plasmide intégratif et de la région chromosomique d'intérêt ou à la reconstitution du sauvage. Les clones ayant excisé le plasmide sont sélectionnés sur sucrose grâce à l'élimination de *sacB* qui confère une sensibilité au sucrose et les délétants sont criblés par PCR sur colonies.

A. Construction du vecteur intégratif comportant les régions flanquantes de l'opéron *gspC-N*

Le clonage des régions flanquantes de l'opéron *gspC-N* dans le pNTPS138 consiste (i) en leur amplification par PCR à l'aide d'amorces s'hybridant dans les régions amont et avale de l'opéron et comportant des sites de restriction particuliers dans leur région 5'- terminale suivi (ii) du clonage dans le vecteur intégratif, pNTPS138 (Fig. 25).

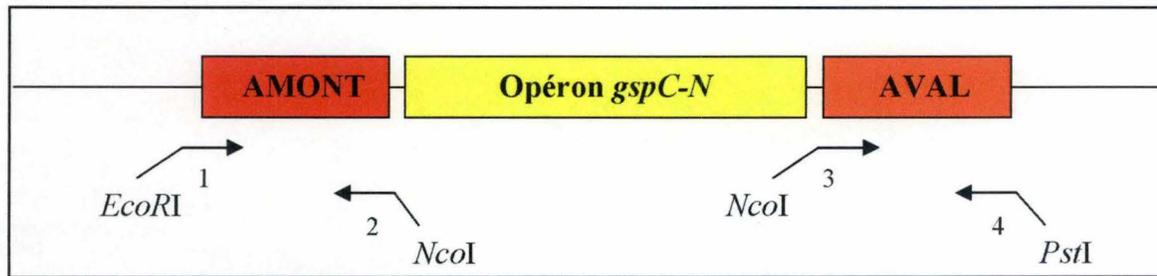


Figure 25 : Représentation des amorces utilisées dans l'amplification par PCR des régions amont et avale de l'opéron *gspC-N*. (1) Amorce Type II amont F contenant un site de restriction *EcoRI*, (2) Amorce Type II Amont R contenant un site de restriction *NcoI*, (3) Amorce Type II aval F- *NcoI* et (4) Amorce Type II aval R- *PstI*.

Les produits d'amplification obtenus sont digérés par l'enzyme *NcoI* et ligués entre eux. Ce produit de ligation de 1000 pb est amplifié par PCR (Fig. 26), digéré par les enzymes *EcoRI* et *PstI* et inséré dans le pNTPS138 restreint par les mêmes enzymes.

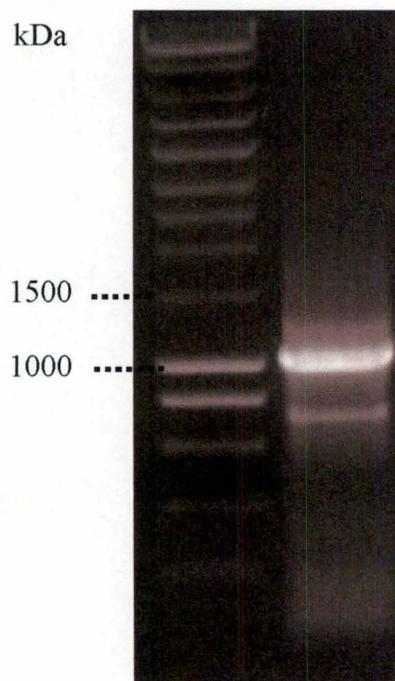


Figure 26 : Electrophorèse en gel d'agarose et détection au bromure d'éthidium du marqueur de poids moléculaire (puits de gauche) et des régions amont et avale de l'opéron *gspC-N* liguées entre elles et amplifiées par PCR (puits de droite).

Après transformation des produits de ligation chez *E. coli* DH10B, les clones ayant reçu le pNTPS138 avec l'insert sont sélectionnés sur LB + kanamycine, le pNTPS138 disposant du gène de résistance correspondant. L'ADN plasmidique de ces clones, récupéré par minipréparation, est à nouveau digéré par *EcoRI* et *PstI* afin de vérifier que l'insert a bien été intégré et enfin, séquencé de manière à s'assurer que le plasmide construit ne comporte aucune mutation.

B. Délétion de l'opéron *gspC-N* chez *C. crescentus*.

Après transformation du plasmide intégratif décrit ci-dessus par électroporation chez *C. crescentus* et double sélection sur kanamycine puis sur sucrose, les clones qui ont excisé le pNTPS138 ainsi que l'opéron *gspC-N* par recombinaison sont validés par PCR diagnostique sur colonies avec des amorces s'hybridant à 200 pb en amont et en aval des régions flanquantes de l'opéron. L'obtention de produits PCR de 1400 kDa permet de vérifier qu'il s'agit bien de délétants (Fig. 27 A).

Ainsi, parmi six clones testés, quatre se sont révélés être des délétants (Fig. 27 B). Le séquençage des clones numérotés 1 et 2, a confirmé la réussite de la délétion de l'opéron *gspC-N*.

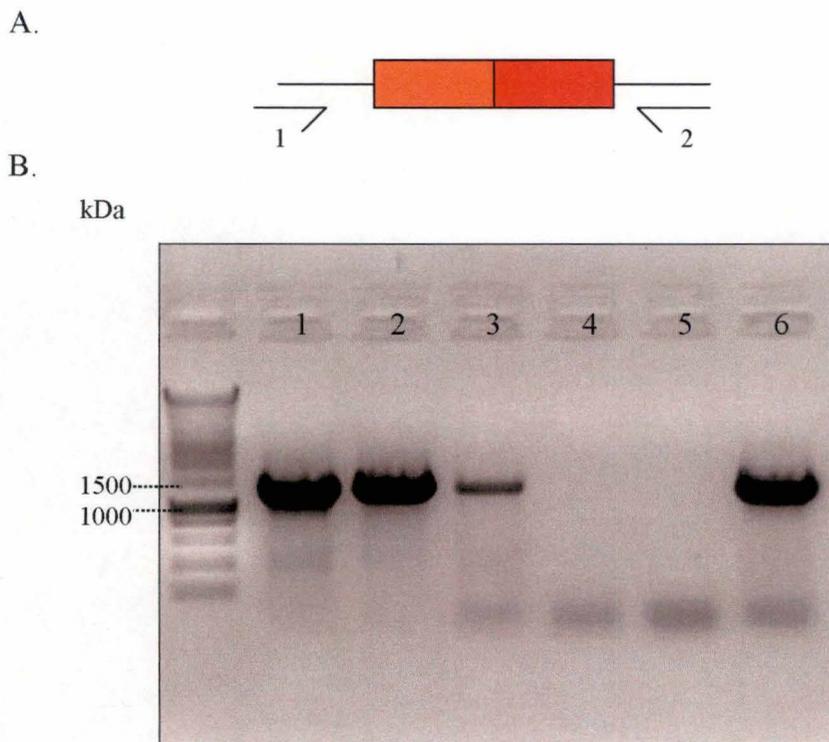


Figure 27 : (A) Représentation de la PCR diagnostique réalisée sur des délétants hypothétiques $\Delta gspC_N$. Les amorces utilisées s'hybrident à 200 pb en amont et en aval des régions flanquantes de l'opéron *gspC-N*. Amorces 1 = Type II check F Amorces 2 = Type II check R. (B) Electrophorèse en gel d'agarose et détection au bromure d'éthidium des produits d'amplification après PCR diagnostique. Quatre des six clones choisis sont positifs.

Caractérisation du délétant *gspC-N*.

1. Comparaison des profils de sécrétion entre CB15N et CB15N Δ *gspC-N* sous différentes conditions.

L'obtention du délétant *gsp* est un premier pas dans l'étude de l'implication du système de sécrétion de Type II chez *C. crescentus*. La caractérisation de ce système débute par l'obtention de profils de sécrétion pour CB15N Δ *gspC-N* et par leur comparaison avec les profils de sécrétion obtenus pour CB15N dans les mêmes conditions.

A. Comparaison des profils de sécrétion de CB15N et CB15N Δ *gspC-N* en milieu riche

La comparaison des profils de sécrétion obtenus pour CB15N et pour CB15N Δ *gspC-N*, cultivées en milieu riche, permet de mettre en évidence des différences dans l'intensité de sécrétion de certaines protéines.

De manière surprenante, il semble que la sécrétion de certaines protéines soit accrue en milieu riche chez CB15N Δ *gspC-N* (Fig. 28). Il est a priori difficile d'expliquer ce résultat mais une hypothèse serait que dans la souche Δ *gspC-N*, les protéines cibles normalement sécrétées par le système de sécrétion de Type II sont prises en charge par d'autres systèmes et que leur sécrétion ne peut donc plus être correctement régulée.

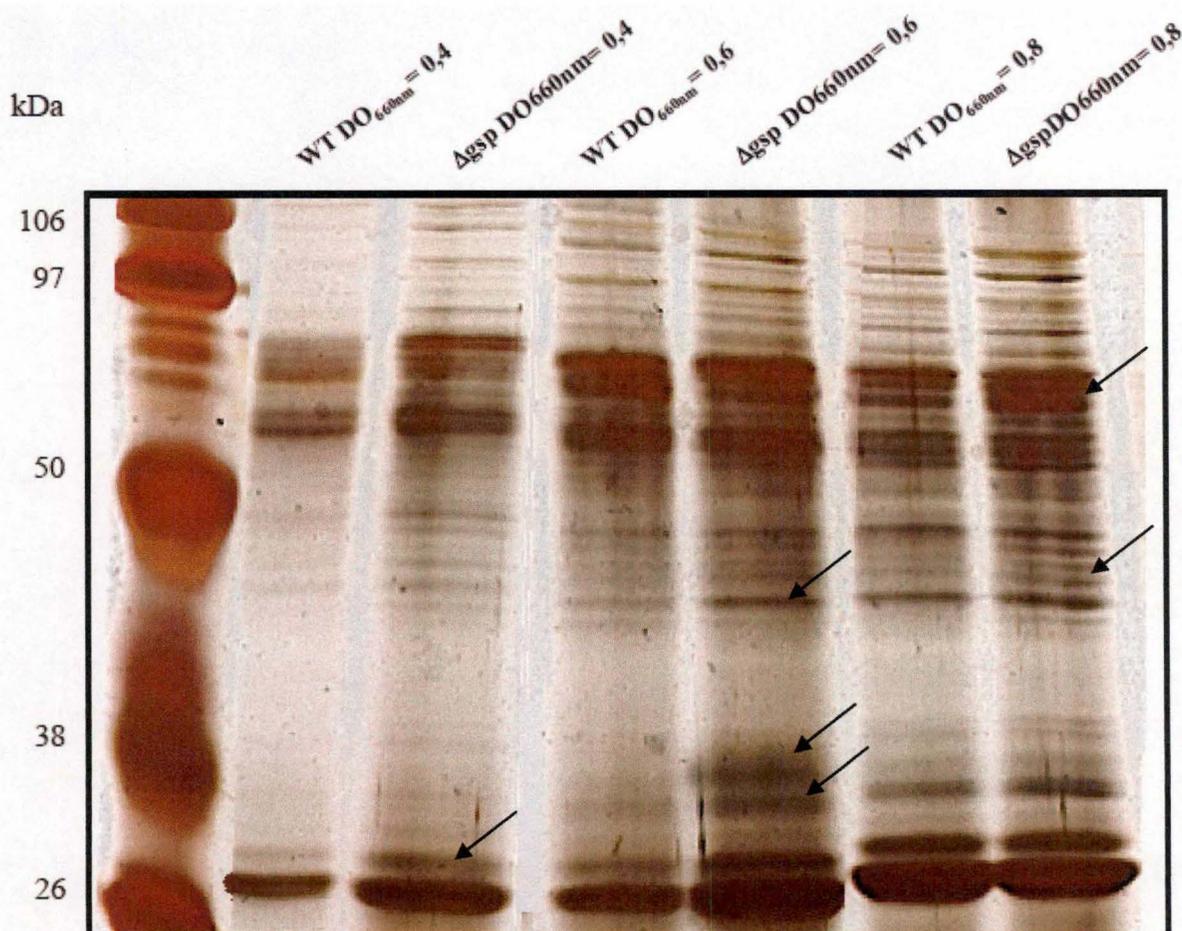


Figure 28 : Electrophorèse SDS-PAGE et coloration au nitrate d'argent d'extraits protéiques obtenus par précipitation au PRMM des surnageants de culture prélevés à différentes densités cellulaires de la souche CB15N (WT) et de la souche CB15N Δ *gspC-N* (Δ *gsp*) cultivées en milieu riche (PYE).

B. Comparaison des profils de sécrétion entre CB15N et CB15N Δ gspC-N en milieu appauvri

Si les résultats obtenus en milieu riche sont surprenants, l'analyse des profils de sécrétion obtenus pour la souche sauvage et le délétant en milieu appauvri met en évidence la disparition d'une bande protéique, marquée d'un astérisque sur la figure 29, chez la souche Δ gspC-N. De manière intéressante, cette bande est fortement exprimée chez la souche sauvage dans ces conditions.

Certaines données publiées indiquent que les gènes de l'appareil de sécrétion de Type II ne sont que faiblement exprimés en condition de laboratoire et sont induits en réponse à un stress (Pugsley & Francetic, 1998). Ainsi, il semble que *C. crescentus* soit capable d'induire la sécrétion de protéines en réponse à une carence nutritive et que cette sécrétion passe en partie par le système de sécrétion de Type II.

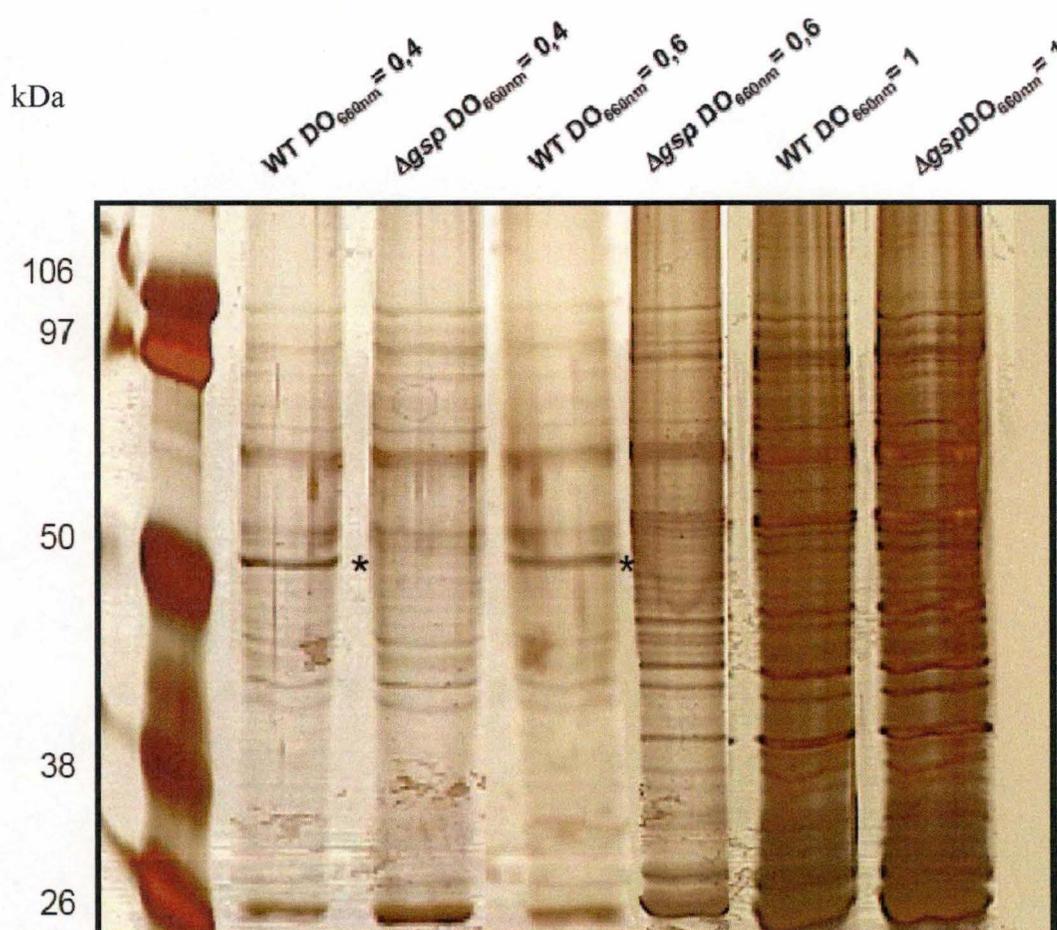


Figure 29 : Electrophorèse SDS-PAGE et coloration au nitrate d'argent d'extraits protéiques obtenus par précipitation au PRMM des surnageants de culture prélevés à différentes densités cellulaires de la souche CB15N (WT) et de la souche CB15N Δ gspC-N (Δ gsp) cultivées en milieu appauvri 5x.

Cette protéine de 50 kDa est également sécrétée par CB15N dans un milieu encore plus carencé en nutriments (PYE appauvri 10x) sans que sa quantité ne semble augmentée (Fig. 30). En revanche, cette protéine reste indétectable dans les surnageants de culture de CB15N Δ gspC-N cultivée dans les mêmes conditions.

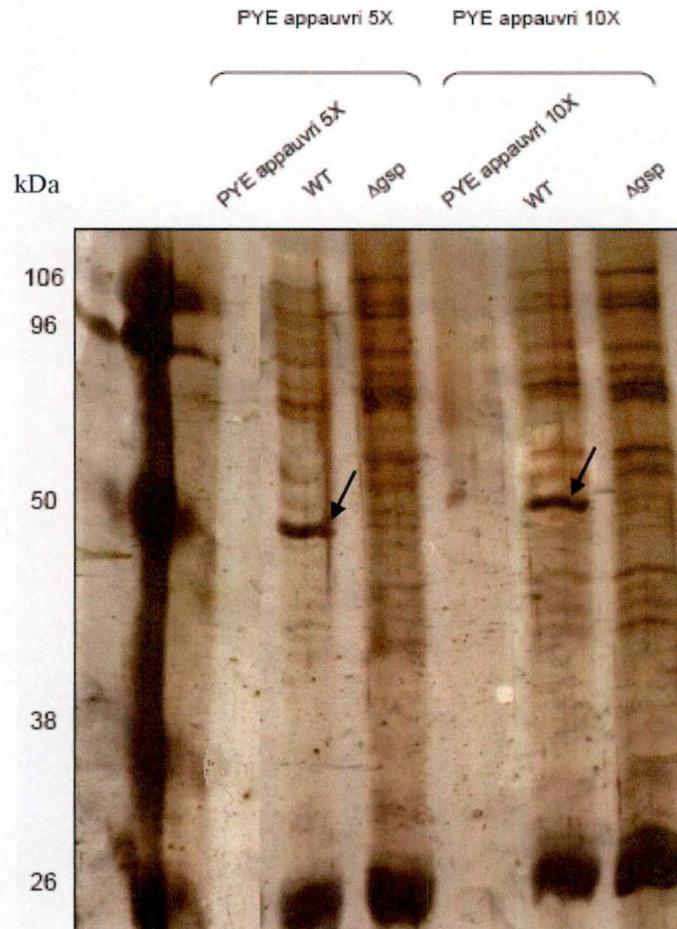


Figure 30 : Electrophorèse SDS-PAGE et coloration au nitrate d'argent d'extraits protéiques obtenus après précipitation au PRMM des milieux de culture nonensemencés (PYE appauvri 5 et 10x) et des surnageants de culture en phase exponentielle de croissance de la souche CB15N (WT) et de la souche CB15NΔgspC-N (Δgsp).

C. Comparaison de profils de sécrétion CB15N et CB15NΔgspC-N dans une population synchronisée.

Chaque cycle de division chez *C. crescentus* génère deux cellules filles morphologiquement et fonctionnellement différentes. Ces deux types de population cellulaire peuvent être séparées par centrifugation en gradient et permettent, par conséquent, de travailler sur des populations synchrones.

L'analyse des profils de sécrétion réalisés à partir de populations synchronisées de CB15N et CB15NΔgspC-N, après une heure de croissance en milieu riche, révèle que les cellules prédivisionnelles des deux souches engagent très rapidement une sécrétion protéique (Fig. 31). Cependant, certaines bandes protéiques apparaissant dans la souche sauvage sont absentes du délétant gspC-N (bandes annotées 1 et 2 sur la Fig. 31). Ces résultats suggèrent que la sécrétion de protéines via le système de sécrétion de Type II est régulée lors du cycle cellulaire et en particulier au stade prédivisionnel.

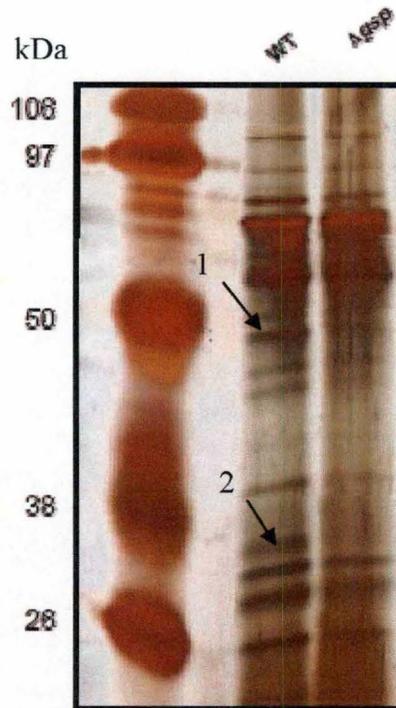


Figure 31: Electrophorèse SDS-PAGE et coloration au nitrate d'argent des extraits protéiques obtenus après précipitation au PRMM de surnageants de culture de CB15N (WT) et de CB15N Δ *gspC-N* (Δ *gsp*) après une heure de synchronisation en PYE.

2. Caractérisation phénotypique de CB15N Δ *gspC-N*.

A. Mobilité de CB15N Δ *gspC-N*

La mobilité de *C. crescentus* est permise grâce à l'élaboration d'un flagelle polaire via un système de sécrétion phylogénétiquement proche du système de sécrétion de Type III. Alors que la souche Δ *pleC*, déletée pour une histidine kinase pléiotropique impliquée dans le contrôle de la morphogenèse cellulaire, montre un déficit de mobilité et de chémotactisme, la souche Δ *gspC-N* présente une mobilité similaire à la souche sauvage indiquant l'absence de fonctions du système de Type II dans la mobilité et/ou le chémotactisme de *C. crescentus* (Fig. 32).

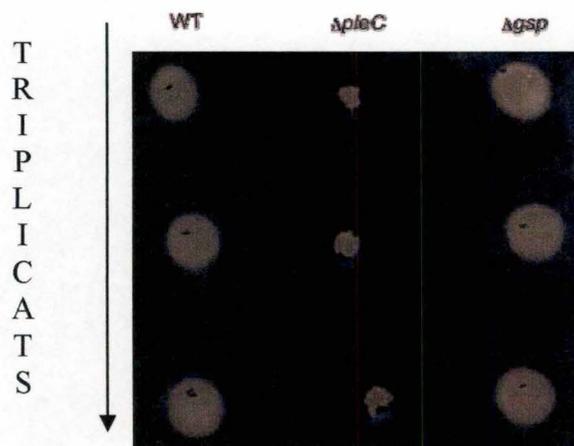


Figure 32 : Test de mobilité réalisé en triplicats pour la souche sauvage (WT), un Δ *pleC* et le Δ *gsp*.

B. Sensibilité aux phages CR30 et CBK de CB15N Δ *gspC-N*

Le phage CBK est capable d'infecter *C. crescentus* en se fixant au niveau de ses pili. Alors que le phage CR30 reconnaît et utilise spécifiquement la couche S protectrice des cellules comme voie d'entrée.

L'obtention de plages de lyse, à la suite d'un test de sensibilité aux phages, indique une sensibilité similaire de CB15N et CB15N Δ *gspC-N* aux phages CBK et CR30. Ces résultats renforcent l'idée que le système de sécrétion de Type II n'est impliqué ni dans la biogénèse de la couche S chez *C. crescentus*, contrairement à de nombreuses espèces bactériennes, ni dans la formation des pili (Fig. 33).

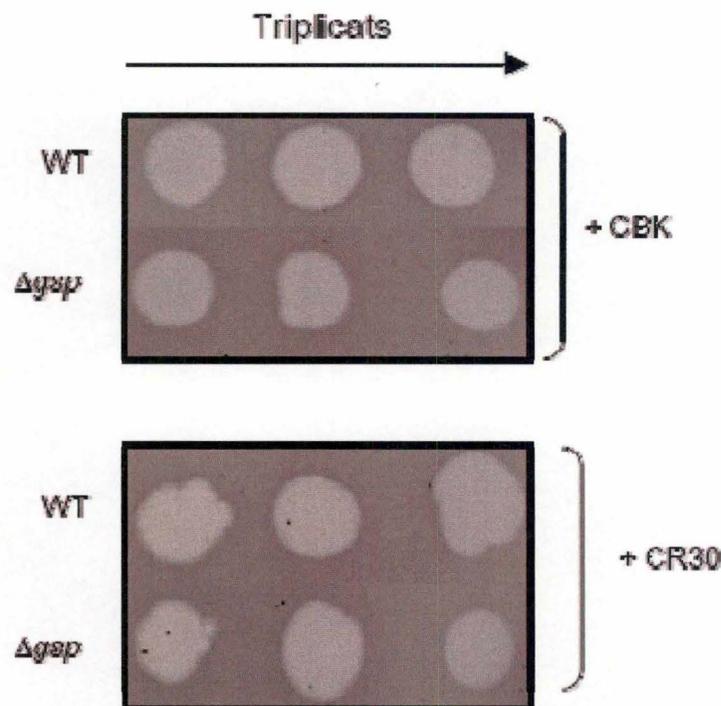


Figure 33 : Test de sensibilité aux phages CBK et CR30 de CB15N (WT) et de CB15N Δ *gspC-N* (Δ *gsp*) réalisé en triplicats. Des gouttes de lysats phagiques sont déposées sur des tapis bactériens des deux souches obtenus en milieux semi solides. Les diamètres des plages de lyse reflétant la sensibilité des cellules sont obtenus après 48 h d'incubation à 30 °C.

C. Résistance au stress hyperosmotique de CB15N Δ *gspC-N*

De récentes études de puces à ADN (Aspedon, Palmer & Whiteley, 2006) chez *P. aeruginosa* ont montré que des homologues des gènes *gspC* à *L* sont activés en réponse à un stress hyperosmotique. De manière surprenante, la souche CB15N Δ *gspC-N* montre une meilleure résistance au stress hyperosmotique estimée sur milieux riches additionnés de NaCl 0,1M ou de saccharose 0,2M (Fig. 34). Il semble donc que le système de sécrétion de Type II intervienne comme un régulateur négatif de la réponse au stress hyperosmotique. Si la souche CB15N Δ *gspC-N* semble présenter un avantage sélectif sur ce type de milieu, nous pouvons envisager, qu'à long terme, la dérégulation de la réponse au stress osmotique s'accompagne d'effets délétères pour la cellule.

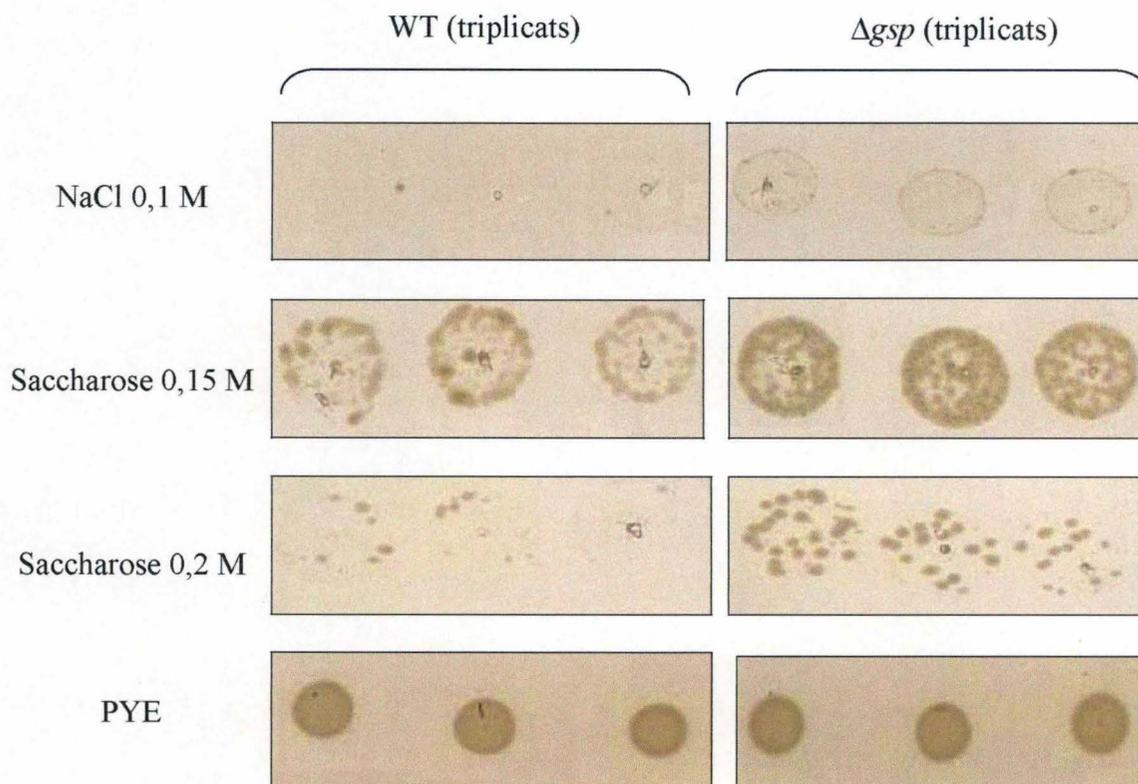


Figure 34 : Croissance des souches CB15N (WT) et CB15N $\Delta gspC-N$ (Δgsp) sur milieu riche (PYE) et sur milieux riches additionnés de NaCl 0,1M ou de saccharose 0,15 et 0,2 M. Les tests ont été réalisés en triplicats. Des cellules en phase stationnaire sont déposées sous forme de gouttes sur ces différents milieux et incubées 48 h à 30 °C.

Conclusions et Perspectives

Conclusions et perspectives

La sécrétion de protéines est un processus essentiel à la survie de toute espèce vivante. Chez les bactéries, elle intervient dans divers phénomènes fondamentaux telles la virulence chez les bactéries pathogènes et l'adaptation des espèces non pathogènes à leur milieu, notamment par la sécrétion d'enzymes hydrolytiques capables de dégrader différents substrats protéiques ou sucrés et de fournir ainsi des nutriments utilisables pour la cellule (Cianciotto, 2005). Au sein du groupe que forme les bactéries Gram négatives, la sécrétion des protéines s'effectue par l'intermédiaire de différents systèmes qui permettent le transport spécifique de substrats à travers les membranes interne et externe. Parmi ceux-ci, le système de sécrétion de Type II permet le passage de la protéine à travers la membrane externe et nécessite, par conséquent, l'intervention d'une voie secondaire pour l'export des protéines du cytoplasme au périplasme, le complexe Sec (Economou, 1999). Le système de sécrétion de Type II se compose d'au moins 11 gènes notés *gsp* (general secretion pathway) C à O, dont la séquence et l'organisation sont conservées chez de nombreuses espèces bactériennes et notamment au sein des gammaprotéobactéries. En effet, les gènes *gsp* forment un opéron dont la structure est retrouvée chez pratiquement toutes les espèces bactériennes concernées (Scott et al., 2001). Cependant et de manière intéressante, peu d'alphaprotéobactéries présentent un système de sécrétion de Type II et seulement l'une d'entre elle possède l'entièreté des gènes qui codent pour cet appareil de sécrétion, *C. crescentus* (Cianciotto, 2005).

Le groupe des alphaprotéobactéries est caractérisé par la présence de bactéries menant des styles de vie très diversifiés. Il comprend ainsi de nombreuses bactéries pathogènes et symbiotiques d'organismes eucaryotes supérieurs ainsi que des bactéries présentant un mode de vie à l'état libre telle *C. crescentus*. Cette bactérie facilement manipulable présente la particularité de se diviser de manière asymétrique et de générer, en fin de chaque cycle cellulaire, deux cellules filles morphologiquement et fonctionnellement différentes (Ryan & Shapiro, 2003), ce qui en fait un modèle bactérien privilégié dans l'étude du cycle cellulaire et des mécanismes impliqués dans la différenciation. Bien qu'appartenant aux alphaprotéobactéries, *C. crescentus* possède des caractéristiques communes aux gammaprotéobactéries et qui plus est aux gammaprotéobactéries pathogènes telle *P. aeruginosa*, notamment pour le système de sécrétion de Type II.

I. *C. crescentus* possède l'intégralité de l'opéron codant le système de sécrétion de Type II.

Le système de sécrétion de Type II, depuis sa caractérisation chez *K. oxytoca* dans le transport de la pullulanase, a été identifié chez plusieurs espèces bactériennes comme intervenant dans la sécrétion de toxines ou d'enzymes protéolytiques. Des analyses bioinformatiques ont confirmé la présence de la totalité des gènes encodant l'appareil de sécrétion de Type II chez *C. crescentus* mais aucune donnée à ce jour ne permet de définir le rôle précis de ce système chez cette bactérie. Il pourrait cependant exister une corrélation entre l'absence de ce système chez la plupart des alphaprotéobactéries et le mode de vie non pathogène que mène *C. crescentus* par rapport aux autres bactéries de son groupe.

II. *C. crescentus* sécrète des protéines à tous les stades de croissance.

Au cours de ce mémoire, nous avons montré que *C. crescentus* est capable de sécréter des protéines dans le milieu extracellulaire à tous les stades de croissance et que cette sécrétion est surtout abondante en fin de phase exponentielle et en phase stationnaire.

III. La sécrétion de certaines protéines est induite en réponse à un stress de carence en nutriments.

De manière intéressante, des études menées chez *E. coli* ont montré que les gènes de l'opéron *gsp* ne sont que faiblement exprimés en condition de laboratoire mais activés en réponse à un stress environnemental (Pugsley & Francetic, 1998). Cependant, aucune donnée n'existe à ce jour quant à la nature de ce stress.

Bien que *C. crescentus* montre une diminution globale de la quantité de protéines sécrétées lorsqu'elle est cultivée dans un milieu carencé en nutriments, il semble que la sécrétion de certaines protéines soit au contraire activée en réponse à ce stress. En effet, nous avons pu mettre en évidence, et cela de manière très reproductible, l'apparition d'une protéine de masse moléculaire voisine de 50 kDa dans les surnageants de culture de *C. crescentus* cultivée en milieu appauvri. Cependant, un appauvrissement supplémentaire du milieu de culture n'induit pas d'augmentation de la quantité de cette protéine dans le milieu extracellulaire.

IV. L'absence d'un système de sécrétion de Type II fonctionnel n'induit pas de déficit dans la sécrétion en milieu riche.

L'étude d'une souche de *C. crescentus* délétée pour les gènes *gspC-N* indique qu'en milieu riche, le délétant sécrète de manière plus abondante que la souche sauvage. Ce phénotype, bien que surprenant, peut éventuellement être expliqué par l'existence d'une dérégulation de la sécrétion chez la souche CB15N Δ *gspC-N* en milieu riche. Nous pouvons peut-être envisager que certaines protéines substrats normalement sécrétées par le système de sécrétion de Type II, soient prises en charge par d'autres systèmes qui ne parviennent pas à réguler leur sécrétion au cours du cycle cellulaire.

V. La sécrétion de certaines protéines par le système de sécrétion de Type II est régulée au cours du cycle cellulaire.

L'analyse des profils de sécrétion de populations asynchrones de la souche CB15N Δ *gspC-N* ne révèle pas de disparition de protéines dans les surnageants de culture par rapport à CB15N. Cependant, des expériences menées sur des populations synchrones de cellules prédivisionnelles indiquent que plusieurs protéines présentes dans les surnageants de culture de CB15N, sont absentes chez CB15N Δ *gspC-N*. Il semble donc que, chez *C. crescentus*, la sécrétion de protéine par le système de sécrétion de Type II soit régulée par le cycle cellulaire et que certaines protéines soient transportées vers le milieu extracellulaire à certains stades de la division.

VI. Le système de sécrétion de Type II est impliqué dans la sécrétion de protéines en condition de carences nutritives.

Si aucune diminution des protéines sécrétées n'a pu être mise en évidence pour CB15N Δ *gspC-N* lorsqu'elle est cultivée en milieu riche et de manière asynchrone, elle présente cependant un déficit dans la sécrétion de la protéine de 50 kDa, produite en milieu appauvri par CB15N. Il est donc probable que cette protéine soit sécrétée par le système de sécrétion de Type II en réponse à un stress de carence nutritive dans le milieu extracellulaire. L'identification de cette protéine, déterminée par spectrométrie de masse, pourrait donner des indications quant au rôle du système de sécrétion de Type II chez *C. crescentus* dans des conditions environnementales particulières. Nous pouvons donc imaginer qu'il existe des

senseurs capables de détecter des conditions de stress environnementaux et de réguler l'activité du système de sécrétion de Type II. Nous pouvons également penser que la protéine sécrétée n'est produite qu'en réponse au stress de carence nutritive. Afin de trancher entre ces deux hypothèses il faudrait, dans un premier temps, identifier la protéine d'intérêt. Son identification permettra de la fusionner à une étiquette spécifiquement reconnue par un anticorps et étudier sa localisation et son abondance dans les souches CB15N et CB15N Δ *gspC-N*.

VII. Le système de sécrétion de Type II est impliqué dans l'osmorégulation chez *C. crescentus*.

Des études de puces à ADN menées chez *P. aeruginosa* montrent que les gènes *pscC-L*, qui présentent des homologies avec les gènes *gspC-L* de *C. crescentus*, sont activés en réponse à un stress hyperosmolaire (Aspedon et al., 2006). Alors que la croissance de la souche CB15N est fortement affectée sur milieu hyperosmotique, la souche CB15N Δ *gspC-N* est capable de se développer sur ce type de milieu. Ces résultats indiquent donc que le système de sécrétion de Type II chez *C. crescentus* est probablement impliqué de manière directe ou indirecte dans la régulation négative de la réponse à un stress osmotique. Bien que ces résultats paraissent surprenants, nous pouvons envisager que le système de sécrétion de Type II intervienne dans le relargage de protéines capable d'éteindre la réponse induite par un stress osmotique. Chaque réponse induite par un stress de quelque nature qu'il soit doit être contrôlée dans le temps et donc soumise à une régulation cellulaire. Tout comme la réponse SOS induite par des dommages sur l'ADN est à terme néfaste pour la cellule, nous pouvons imaginer qu'une perte de la régulation de la réponse au stress osmotique s'accompagne d'effets délétères. Nous n'avons cependant pas encore mis au point de conditions limites qui permettent d'induire la réponse au stress osmotique sans affecter dramatiquement la survie des cellules et par conséquent, de caractériser les effets délétères d'un tel stress sur *C. crescentus*.

De récentes études ont montré que les appareils de sécrétion de Type II et IV sont localisés de manière polaire chez *Vibrio* ou *Agrobacterium*. Rien aujourd'hui ne permet de définir l'avantage biologique de cette localisation (Li et al., 2005; Scott et al., 2001). Nous avons tenté au cours de ce mémoire de construire une fusion traductionnelle de GspE qui encode l'ATPase cytoplasmique du système de sécrétion de Type II avec la GFP de manière à localiser la protéine. Cependant, cette protéine fusion n'est produite chez *C. crescentus* ou trop instable pour être détectée. Un prochain objectif sera de construire des fusions GFP avec d'autres protéines du système de sécrétion de Type II.

Si notre première approche est d'étudier le rôle du système de sécrétion de Type II par la nature des protéines qu'il sécrète, il est également possible de caractériser ce système par l'étude de ses partenaires protéiques. Ces partenaires pourraient être identifiés par un crible utilisant la méthode du double hybride.

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

A. Souches et plasmides

Souches

➤ ***Escherichia coli* DH10B**

Cette souche est utilisée pour l'amplification de plasmides. L'introduction d'ADN plasmidique s'effectue suivant la technique dite de transformation bactérienne. Génotype : F- *mcrA* Δ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *deoR* *recA1* *endA1* *araD139* Δ (*ara*, *leu*)7697 *galU* *galK* *l-rpsL* *mupG*. (GibcoBRL(Invitrogen)).

➤ ***Caulobacter crescentus* CBN15 *creS* pMR10*creS-gfp***

Cette souche possède une fusion traductionnelle de la crescentine et de la GFP sur un plasmide. Elle porte les gènes de résistance à la kanamycine et à la gentamycine. Génotype : CBN15 *creS* pMR10*creS-gfp*.

Plasmides

➤ **pNTPS138**

Plasmide *low copy* intégratif chez *C. crescentus* et qui possède une origine de réplication chez *E. coli*. Ce plasmide est sélectionnable sur kanamycine et comporte un marqueur de contre sélectionnable (*sacB*) sur sucrose.

B. Milieux de cultures

Milieux de culture bactériens

Milieu riche pour *Escherichia coli* : milieu Luria Bertani (LB)

Pour 1 litre d'eau désionisée	Milieu liquide	Milieu solide
Hydrolysate de caséine (peptone)	10 g	10 g
NaCl	5 g	5 g
Yeast extract	5 g	5 g
Agar	-	15 g

Milieu riche pour *Caulobacter crescentus* : milieu Peptone Yeast Extract (PYE)

Pour 1 litre d'eau désionisée	Milieu liquide	Milieu solide
Bactopeptone	2 g	2 g
Yeast extract	1 g	1 g
MgSO ₄	1 mM	1 mM
CaCl ₂	0,5 mM	0,5 mM
Agar	-	15 g

Milieu pauvre pour *Caulobacter crescentus* : milieu Peptone Yeast Extract (PYE) appauvri 5 fois.

Pour 1 litre d'eau désionisée	Milieu liquide
PYE	200 ml
CaCl ₂	1 mM
MgSO ₄	1 mM
Glucose 0,2%	100 ml

Top agar.

Ce milieu est utilisé dans la réalisation des tests de caractérisation phénotypique. Il est composé de PYE agar 0,3%.

C. Tampons et solutions

➤ Solutions d'antibiotiques

Noms	Solution de dissolution	Concentration stock	Concentration finale pour <i>E. coli</i>	Concentration finale pour <i>C. crescentus</i>
Amp	Eau	100 mg/ml	100 µg/ml	100 ng/ml
Kan	Eau	50 mg/ml	50 µg/ml	50 ng/ml

➤ PBS 20x

Pour 1 litre d'eau désionisée	
K ₂ HPO ₄ 2 mM	4 g
Na ₂ HPO ₄ 10 mM	28,2 g
KCl 2,7 mM	4 g
NaCl 137 mM	160 g

➤ PBS Tween 0,05%

Pour 1 litre d'eau désionisée	
PBS stock 20 X	50 ml
Tween 20%	500 µl
H ₂ O	950 ml

➤ Solution de blocking (Western Blot)

Pour 1 litre d'eau désionisée	
PBS Tween 0,05%	1 l
Lait en poudre	50 gr

➤ Solutions de la solution de précipitation protéiques (PRMM)

Pour 1 litre d'eau désionisée	
Pyrogallol red 0,05 mM	0,02 g
Molybdate de sodium 0,16 mM	0,32 g
Oxalate de sodium 1 mM	0,134 g
Acide succinique 50 mM	13,5 g
Méthanol 20%	200 ml

➤ **Mix M2 20X**

Pour 1 litre d'eau désionisée	
Na ₂ HPO ₄	17,4 g
KH ₂ PO ₄	10,6 g
NH ₄ Cl	10 g

➤ **Tampon de chargement protéique 5x**

Pour 30 ml	
Glycérol 50 %	10 ml
β-mercaptoéthanol 5 %	5 ml
SDS 10 %	2 g
Tris 1,5 M pH 6,8	13 ml
Bleu de bromophénol	0,0005 g

➤ **Tampon TE**

TrisHCl pH 8	10 mM
EDTA	1 mM

➤ **Tampon de transfert : Towbeen buffer (Western Blot)**

Pour 1 litre d'eau désionisée	
Tris Base	48 mM
Glycine	39 mM
SDS	0,04 %
Méthanol	200 ml

➤ **Tampon SDS-PAGE**

Pour 1 litre d'eau désionisée	
Tris Base	30,35 g
Glycine	144 g
SDS	10 g

➤ **Tampons Coloration à l'argent**

Tampon de fixation (200 ml)	
Ethanol 40 %	80 ml
Acide acétique 20 %	20 ml
Eau	100 ml

Tampon d'incubation (250 ml)	
Ethanol	75 ml
Glutaraldéhyde	1,5 ml
Acétate de sodium	17 g
Thiosulfate de sodium	0,5 g
Eau	Complété à 250 ml

Tampon à l'argent (250 ml)	
Nitrate d'argent	0,25 g
Formaldéhyde	50 µl
Eau	Complété à 250 ml

Tampon de développement (250 ml)	
Carbonate de sodium	6,25 g
Formaldéhyde	25 µl
Eau	Complété à 250 ml

Tampon d'arrêt (250 ml)	
EDTA	3,65 g
Eau	Complété à 250 ml

➤ **Tampons minipréparation**

Tampon S1	
RNAase A	100 µg/ml
Tris HCl pH 8	50 mM
EDTA	10 mM

Tampon S2	
NaOH	200 mM
SDS	1 %

Tampon S3	
Acétate de potassium pH 5,5	3 M

➤ **Gel de concentration et de migration**

Running 12 %	10 ml	20 ml
H ₂ O	4,2 ml	8,4 ml
38,5% Acrylamide	3,1 ml	6,2 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,2 ml
10% APS	0,1 ml	0,2 ml
TEMED	0,008 ml	0,016 ml
Running 15 %	10 ml	20 ml
H ₂ O	3,4 ml	6,8 ml
38,5% Acrylamide	3,9 ml	7,8 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,2 ml
10% APS	0,1 ml	0,2 ml
TEMED	0,008 ml	0,016 ml
Stacking	3 ml	6 ml
H ₂ O	1,8 ml	3,6 ml
38,5% Acrylamide	0,39 ml	0,78 ml
1,5 M Tris pH 8,8	0,75 ml	1,5 ml
10% SDS	0,03 ml	0,06 ml
10% APS	0,03 ml	0,06 ml
TEMED	0,003 ml	0,006 ml

Méthodes

Techniques relatives à l'utilisation de l'ADN

A. Polymerase chain reaction (PCR)

Cette technique est utilisée pour amplifier rapidement un fragment d'ADN d'intérêt. Les séquences qui bordent le fragment doivent être connues pour pouvoir concevoir des amorces oligonucléotidiques, appelées primers, qui leur sont complémentaires.

La matrice d'ADN à amplifier est dénaturée par chauffage à 95 °C en présence des oligonucléotides et de dNTP. Le mélange est ensuite soumis à une diminution de température qui permet l'hybridation spécifique des amorces sur la matrice. La séquence d'intérêt est alors amplifiée à partir des primers, de 5' en 3' pour le brin néosynthétisé, par une ADN polymérase thermosensible (la Taq DNA polymérase de Promega ou l'Expand High Fidelity de Roche). Le cycle de dénaturation/hybridation/élongation est répété plus de 30 fois et permet de cette façon une amplification exponentielle.

➤ Mix PCR :

Réactifs	Quantités
Mélange dNTP	2 µl
DMSO	2,5 µl
Primer 1 (20 µM)	0,5 µl
Primer 2 (20 µM)	0,5 µl
Tampon 5X _{Taq} ou 10X _{HF}	10 µl ou 5 µl
GoTaq ou HF	0,5 µl
Matrice (ADN)	~ 20 ng
Eau	Compléter à 50 µl

➤ Programme :

1. Dénaturation de 10 minutes à 99 °C (PCR sur colonies)
2. 33 cycles d'amplification qui comprend plusieurs étapes :
 - a. 30 secondes à 94 °C pour dénaturer.
 - b. 30 secondes à X °C pour hybrider. $X = T_m - 10 \text{ °C}$ ($T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$).
 - c. Y minute(s) à 72 °C pour l'élongation. Y = taille du fragment à amplifier.
3. Elongation finale de 10 minutes à 72 °C

➤ Amorces utilisés :

Amorces	Séquences (de 5' en 3')
Type II Amont F (EcoRI)	ctgggacggactagaattcCCGACGTCGAGGCCTATC
Type II Amont R (NcoI)	gtaccgtaggcaattacccatggCGAGGCGCGCCGCTGG
Type II Aval F (NcoI)	attacgtgactagcaaatcgcgccatggAGCATTTTCCGACGAAGTGG
Type II Aval R (PstI)	agtccaggtacgttacgggactgctgcagTCCCGACAGGCTGACCCT
Type II check R	GTCAGCTTTCTTGTGTCTGC
Type II check F	CTGGGTCTTGAGGACACCGAG

B. Purification sur colonne

Le protocole suivi pour purifier des fragments d'ADN obtenus par réactions PCR est celui du kit MSB Spin PCRapace d'Invitex.

C. Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN dans un champ électrique en fonction de leur taille. La taille des fragments est estimée à l'aide d'un marqueur d'ADN de tailles connues, l'HyperLadder de Bioline. La révélation d'ADN est réalisée grâce au bromure d'éthidium, composé fluorescent qui rend la double hélice visible sous UV, en s'intercalant entre ses bases. La fluorescence d'un fragment est proportionnelle à sa taille, ainsi qu'à la quantité d'ADN déposée, qui peut être calculée par comparaison des intensités de fluorescence des bandes du marqueur.

➤ Fabrication du gel :

1. Dissoudre par chauffage 1 g d'agarose dans 100 ml de tampon TAE 1X.
2. Couler le gel dans un support adéquat muni de peignes.
3. Ajouter 5 µl de bromure d'éthidium.
4. Laisser polymériser et charger les échantillons et le marqueur moléculaire.

Bromure d'éthidium	Solution d'alourdisseur	Tampon TAE 50X
2 mg/ml d'eau	Glycérol 50% EDTA 100 mM SDS 1% Bleu de bromophénol ou méthyl orange	Tris HCl pH 8 40 mM EDTA 50 mM Acide acétique froid 57,1 ml/litre

D. Purification d'ADN sur gel

La purification d'ADN à partir du gel se fait à l'aide du kit QIAquick™ Gel extraction de Qiagen. Ce kit permet d'extraire et de purifier de l'ADN à partir d'un gel d'agarose standard.

- Extraire le fragment d'intérêt à l'aide d'un scalpel et le peser
- Ajouter 3 volumes de *Binding solution* pour un volume de gel
- Incuber 5 minutes à 55 °C pour dissoudre l'agarose
- Ajouter 5 µl de *silica powder suspension* qui est au préalable vortexé pour remettre les billes de silices en suspension
- Incuber 5 minutes à 55 °C en vortexant toutes les 2 minutes
- Centrifuger pendant 5 secondes
- Retirer le surnageant et ajouter 500 µl de *wash buffer* froid
- Répéter l'opération 3 fois
- Après le dernier lavage, laisser 10 minutes à l'air
- Resuspendre le culot dans 20 µl d'eau stérile
- Incuber 5 minutes à 55°C
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm
- Récupérer le surnageant et le conserver à - 20 °C

E. Minipréparation d'ADN plasmidique

Cette technique permet d'isoler et de purifier les plasmides présents chez les bactéries.

- Centrifuger 5 minutes à 12500 rpm les cultures (~ 1,5 ml)
 - Eliminer le surnageant et ajouter 300 µl de solution S1
 - Resuspendre et ajouter 300 µl de solution S2
 - Retourner les eppendorfs et laisser 5 minutes à température ambiante
 - Ajouter 300 µl de solution S3
 - Retourner les eppendorfs et centrifuger 5 minutes à 12500 rpm
 - Récupérer le surnageant et ajouter 700 µl d'isopropanol
 - Centrifuger 15 minutes à 12500 rpm
 - Enlever le surnageant et ajouter 300 µl d'éthanol 70% froid
 - Centrifuger 5 minutes à 12500 rpm
 - Enlever le surnageant et laisser sécher le culot à 37 °C pendant 3 minutes
 - Resuspendre le culot dans 30 µl d'eau
- Il existe également un kit, le kit Nucleospin® (Marcherey-Nagel).

F. Restriction de plasmides

Les enzymes de restriction permettent de cliver l'ADN double brin de manière spécifique.

- 1 µl de tampon en fonction des enzymes utilisés (A, B, L, M ou H)
- 1 µl d'enzymes de restriction
- X µl de plasmide
- Porter à un volume final de 10 µl avec de l'eau
- Incuber 1 heure dans un bain-marie à 37 °C. Les enzymes de restriction et leur tampon proviennent de chez Roche

G. Ligation d'un plasmide

Réaction réalisée pendant 1 heure à température ambiante sur pailleasse.

- Vecteur et insert dans un rapport moléculaire 1/1 pour un clonage directionnel et 1/3 pour un non directionnel
- 2 µl de tampon 5X T4 DNA ligase
- 1 µl de T4 DNA ligase
- Porter à volume final (10 µl) avec de l'eau

Techniques relatives à l'utilisation de protéines

A. Précipitation des protéines au TCA

- Ajouter 1 volume de TCA 100% pour 4 volumes d'extraits protéiques
- Incuber 10 minutes à 4 °C
- Centrifuger 5 minutes à 14000 rpm
- Enlever le surnageant
- Laver le culot dans 200 µl d'acétone froid
- Centrifuger 5 minutes à 14000 rpm
- Répéter le lavage 1 fois

- Enlever l'acétone en incubant à 100 °C pendant 5 minutes
- Ajouter 20 µl du tampon de chargement 2x et bouillir les échantillons 10 minutes avant de charger sur gel

B. Précipitation des protéines par la solution de PRMM

- Lancer environ 50 ml de culture la veille des prélèvements
- Prélever 7 ml de culture à différentes densités optiques et du milieu non ensemencé
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm
- Filtrer le surnageant à l'aide de filtre 0,22 µm (dans un tube Corex de 15 ml)
- Ajouter 1 volume de la solution PRMM
- Précipiter la nuit à 4 °C
- Centrifuger 1 heure à 10000 rpm
- Laver le culot avec 5 ml d'acétone froid
- Centrifuger 10 minutes à 10000 rpm
- Répéter l'opération 3 fois
- Resuspendre le culot dans 20 µl de tampon de chargement protéique 5x
- Déposer sur gel 12 % ou 15 % selon les protéines à mettre en évidence

C. Coloration au nitrate d'argent

La coloration à l'argent des protéines est une méthode très sensible qui permet de détecter quelques nanogrammes de protéines (Patton, 2002 (detection technologies in proteome analysis)).

- Laver le gel 15 minutes dans le tampon de fixation
- Incuber le gel 15 minutes dans le tampon d'incubation
- Laver 3 x 3 minutes avec de l'eau désionisée
- Incuber 30 minutes avec la solution à l'argent
- Révéler les bandes protéiques dans la solution de développement.
- Incuber 2 x 10 minutes le gel avec la solution d'arrêt
- Laver le gel 3 x 3 minutes avec de l'eau

D. Analyse de l'expression de protéines par Western Blot

Le *Western Blot* est une technique qui permet de détecter une protéine parmi d'autres grâce à la reconnaissance cognitive d'un anticorps. Cette méthode combinant l'électrophorèse en gel de polyacrylamide et la spécificité des anticorps comporte 3 étapes :

- La séparation des protéines par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS
- L'électrotransfert des protéines du gel sur une membrane de nitrocellulose
- La détection immunologique de la protéine d'intérêt

➤ **Electrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)**

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) est une technique qui permet la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaires. Le gel de polyacrylamide est le résultat de la polymérisation de monomères d'acrylamide. La réaction est initiée par le persulfate d'ammonium (APS) et catalysée par le TEMED. Les gels de polyacrylamide présentent l'avantage d'avoir une taille

de pores sélectionnable, puisque la concentration totale en acrylamide est inversement proportionnelle à la quantité d'agent réticulant.

Le β -mercaptoéthanol présent dans le mélange protéique permet la rupture des ponts disulfures. Le SDS, détergent anionique déroule les structures protéiques et se fixe stoechiométriquement à leurs chaînes leur conférant une charge négative égale par unité de masse. Dans un champ électrique, les protéines sont donc séparées en fonctions de leur poids moléculaires uniquement. Les petites protéines auront moins de difficultés à traverser le réseau de polyacrylamide que les grosses. Elles migreront donc plus rapidement et plus loin dans le gel.

Le gel de polyacrylamide est constitué de deux parties : le gel de concentration qui a pour rôle de concentrer les protéines avant la séparation dans le gel de migration.

➤ Migration

L'appareil est fixé sur 30 mA et le voltage peut varier jusqu'à un maximum de 600 volts. La durée de migration est fonction du pourcentage du gel.

➤ Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose

Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est un transfert semi-sec dans du tampon Towbeen. Le gel d'acrylamide est déposé au contact d'une membrane de nitrocellulose entre des couches de papiers imbibés de tampon. Un courant de haute intensité permet le transfert des protéines chargées négativement d'être transférées sur la membrane de nitrocellulose.

Protocole :

- Découper 6 papiers Whatman ainsi qu'une membrane de cellulose de la dimension du gel
- Les imbiber avec du tampon Towbeen
- Déposer 3 papiers Whatman, le gel, la membrane et les 3 derniers papiers Whatman (Biorad) (La disposition de la membrane par rapport au gel peut varier. Cela dépend de la machine utilisée.)
- Afin que le transfert des protéines soit optimal, l'ampérage doit être environ égal à 3 mA par cm² de membrane de nitrocellulose. Le voltage doit varier entre 10 et 14 V maximum.

➤ Immunodétection

Cette étape se base sur une technique de révélation dite indirecte où un anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt reconnaît son épitope et s'y fixe. Un anticorps secondaire reconnaissant l'anticorps primaire et couplé à une activité enzymatique, permet de détecter la protéine d'intérêt.

• Etape de blocage :

Avant de mettre la membrane de nitrocellulose en présence de l'anticorps primaire, une étape préliminaire consiste à saturer les sites non spécifiques grâce à une incubation pendant une nuit à 4°C dans du lait 5 % PBST 0,05 %.

La membrane est lavée 3x5 minutes dans du PBST 1x. A l'issue de l'étape de blocage la protéine cible est détectée par l'anticorps primaire.

• Mise en présence de l'anticorps primaire :

La membrane de nitrocellulose est incubée dans une solution de PBS Lait 5 % contenant l'anticorps primaire spécifique à la dilution adéquate, pendant une à deux heures sous agitation. Après récupération de l'anticorps, la membrane est lavée de 3 à 8 fois avec du PBST 1x pendant 3 minutes.

- Mise en présence de l'anticorps secondaire :

La membrane lavée est incubée, pendant une heure sous agitation, avec une solution de PBS lait 5 % contenant l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase qui permet sa détection.

La membrane est ensuite lavée 3 à 8 fois avec du PBST 1x pendant 3 minutes.

- Révélation de l'activité peroxydase :

La technique de détection, dite ECL, utilise les réactifs chémiluminescents du kit, ECL S1 et S2 (Amersham Pharmacia Biotech).

Protocole :

- La membrane est mise en contact d'un mélange en volume égal de deux solutions ECL
- Incuber durant 1 minute
- Placer la membrane dans un film plastique, après avoir enlever l'excès de solution, et la déposer dans la cassette de révélation pendant 10 minutes.
- Ensuite, révéler les bandes par un bain de révélation pendant 4x20 secondes
- Passer le film dans la solution de fixation pendant 10 secondes
- Rincer abondamment à l'eau de ville et laisser sécher

Techniques relatives à l'utilisation des bactéries

A. Transformation bactérienne par électroporation

La transformation bactérienne consiste à faire entrer de l'ADN exogène dans une bactérie.

Protocole :

- Décongeler les cellules compétentes pour la transformation, gardées à -80 °C, sur glace
- Mettre 5 à 10 µl de plasmides dans des cuvettes à électroporation, gardées sur glace
- Ajouter 100 µl de cellules électrocompétentes
- Appliquer une pulsion de 2 kV, capacité de 25 µF
- Ajouter 1 ml de milieu de culture riche
- Transvaser le contenu de la cuvette dans un eppendorf
- Placer les cellules sous agitation pendant 1 heure à une température de croissance optimale
- Etaler sur un milieu sélectif
- Incuber 24 h à 48 h à température optimale de croissance

B. Synchronisation de *C. crescentus*

La synchronisation d'une population de *C. crescentus* résulte dans la séparation par centrifugation des deux types cellulaires.

Protocole :

- Prélever X ml de culture et y ajouter Y ml de Ludox ajusté à pH 7 (Sigma), dans un rapport 1: 4
- Centrifuger 30 minutes à 9000 rpm
- Deux bandes apparaissent et aspirer jusqu'à 1 cm de la bande du bas
- Ajouter 13 ml de mix M2 1x
- Centrifuger 10 minutes à 8000 rpm
- Répéter l'opération 3 fois
- Ajouter 12 ml de milieu de culture
- Transvaser dans des falcons et placer dans une étuve
- Prélever X ml de culture après 60 à 120 minutes

C. Test de résistance aux phages

- Prélever 200 µl de cellules de culture de la veille et les mélanger à 4 ml de Top agar
- Couler le mélange sur milieu solide en surcouche
- Laisser sécher et déposer 5 µl de phages sous forme de goutte
- Incuber 24 h à 30 °C

D. Test de mobilité

- Sélectionner une colonie et la piquer, à l'aide d'un cure-dent, dans du PYE agar 0,25%
- Placer les boîtes à l'étuve

E. Test Live/Dead

➤ Préparation de l'échantillon

- Lancer une culture de 50 ml sur la nuit
- Centrifuger les bactéries le jour suivant 15 minutes à 5000 rpm à 4 °C
- Décanter le surnageant et resuspendre le culot dans 4 ml d'eau filtrée sur 0,2 µm
- Préparer des tubes séparés contenant soit 20 ml d'eau filtrée (bactéries vivantes) soit 20 ml 70% isopropanol (bactéries mortes). Ajouter 2 ml de suspension bactérienne à chaque tube
- Incuber les tubes à température ambiante pendant 1 heure sous agitation
- Centrifuger les échantillons 15 minutes à 5000 rpm et décanter le surnageant
- Resuspendre chaque échantillon dans 20 ml d'eau filtrée
- Centrifuger les échantillons 15 minutes à 5000 rpm et décanter le surnageant
- Resuspendre chaque échantillon dans 10 ml d'eau filtrée
- Prendre la DO à 660 nm et l'ajuster avec de l'eau à environ 2×10^8 bactéries/ml

- Préparer des tubes stériles contenant :

Tubes	Ratio bactéries vivantes/mortes	Volume de suspension « bactéries vivantes »	Volume de suspension « bactéries mortes »
1	0:100	0 ml	1 ml
2	25:75	0,25 ml	0,75 ml
3	75:25	0,75 ml	0,25 ml
4	100:0	1 ml	0 ml

➤ Coloration des échantillons

- Dans un eppendorf, vortexer X µl de sondes SYTO 9 et X µl d'iodure de propidium
- Ajouter 3 µl de mélange de coloration pour chaque ml de suspension bactérienne (l'étalon et échantillons à tester)
- Déposer 200 à 300 µl de suspension bactérienne sur une lame couvre objet
- Monter les lames couvre objet sur lame
- Observer au microscope à fluorescence à deux longueurs d'ondes : les bactéries vivantes apparaissent vertes (émission de la GFP), les bactéries mortes apparaissent rouges (émission du Texas red).

Techniques relatives à l'utilisation du microscope

➤ Préparation des échantillons pour la microscopie

• Agarose PAD :

- 1) Préparer une solution de PBS 1x et d'agarose 1% dans une bouteille
- 2) Chauffer au micro-onde afin de dissoudre l'agar
- 3) Déposer ~ 1 ml du mélange sur une lame de microscopie et la recouvrir d'un autre
- 4) Laisser sécher et détacher doucement les deux lames
- 5) Déposer 5 µl de la culture à observer et recouvrir avec une lame couvre objet

Bibliographie

Bibliographie

- ALBERTSON, N. H., NYSTROM, T. & KJELLEBERG, S. (1990). Exoprotease Activity of Two Marine Bacteria during Starvation. *Appl Environ Microbiol* **56**, 218-223.
- ALDRIDGE, P. & HUGHES, K. T. (2002). Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol* **5**, 160-5.
- AMICK, J. D. & BRUN, Y. V. (2001). Anatomy of a bacterial cell cycle. *Genome Biol* **2**, REVIEWS1020.
- ASPEDON, A., PALMER, K. & WHITELEY, M. (2006). Microarray analysis of the osmotic stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**, 2721-5.
- AUSMEES, N. & JACOBS-WAGNER, C. (2003). Spatial and temporal control of differentiation and cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *Annu Rev Microbiol* **57**, 225-47.
- AWRAM, P. & SMIT, J. (1998). The *Caulobacter crescentus* paracrystalline S-layer protein is secreted by an ABC transporter (type I) secretion apparatus. *J Bacteriol* **180**, 3062-9.
- BACKERT, S. & MEYER, T. F. (2006). Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **9**, 207-17.
- BALL, G., DURAND, E., LAZDUNSKI, A. & FILLoux, A. (2002). A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **43**, 475-85.
- BERKS, B. C., SARGENT, F. & PALMER, T. (2000). The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* **35**, 260-74.
- BINGLE, W. H., NOMELLINI, J. F. & SMIT, J. (2000). Secretion of the *Caulobacter crescentus* S-layer protein: further localization of the C-terminal secretion signal and its use for secretion of recombinant proteins. *J Bacteriol* **182**, 3298-301.
- BOLHUIS, A. (2004). The archaeal Sec-dependent protein translocation pathway. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**, 919-27.
- BRANDON, L. D., GOEHRING, N., JANAKIRAMAN, A., YAN, A. W., WU, T., BECKWITH, J. & GOLDBERG, M. B. (2003). IcsA, a polarly localized autotransporter with an atypical signal peptide, uses the Sec apparatus for secretion, although the Sec apparatus is circumferentially distributed. *Mol Microbiol* **50**, 45-60.
- BURNS, D. L. (2003). Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* **6**, 29-34.
- CALDWELL, R. B. & LATTEMANN, C. T. (2004). Simple and reliable method to precipitate proteins from bacterial culture supernatant. *Appl Environ Microbiol* **70**, 610-2.
- CHRISTIE, P. J. & CASCALES, E. (2005). Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems (review). *Mol Membr Biol* **22**, 51-61.
- CIANCIO, N. P. (2005). Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol* **13**, 581-8.
- CORNELIS, G. R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**, 811-25.
- DE VRIND, J., DE GROOT, A., BROUWERS, G. J., TOMMASSEN, J. & DE VRIND-DE JONG, E. (2003). Identification of a novel Gsp-related pathway required for secretion of the manganese-oxidizing factor of *Pseudomonas putida* strain GB-1. *Mol Microbiol* **47**, 993-1006.
- DELEPELAIRE, P. (2004). Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 149-61.
- DESVAUX, M., PARHAM, N. J. & HENDERSON, I. R. (2004a). Type V protein secretion: simplicity gone awry? *Curr Issues Mol Biol* **6**, 111-24.
- DESVAUX, M., PARHAM, N. J., SCOTT-TUCKER, A. & HENDERSON, I. R. (2004b). The general secretory pathway: a general misnomer? *Trends Microbiol* **12**, 306-9.

- DING, Z., ATMAKURI, K. & CHRISTIE, P. J. (2003). The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. *Trends Microbiol* **11**, 527-35.
- ECONOMOU, A. (1999). Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol* **7**, 315-20.
- EDWARDS, P. & SMIT, J. (1991). A transducing bacteriophage for *Caulobacter crescentus* uses the paracrystalline surface layer protein as a receptor. *J Bacteriol* **173**, 5568-72.
- FERNANDEZ, L. A. & BERENQUER, J. (2000). Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 21-44.
- FILLOUX, A. (2004). The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 163-79.
- GENTSCHKEV, I., DIETRICH, G. & GOEBEL, W. (2002). The *E. coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol* **10**, 39-45.
- HOLLAND, I. B., SCHMITT, L. & YOUNG, J. (2005). Type I protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol Membr Biol* **22**, 29-39.
- HUECK, C. J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 379-433.
- JOHNSON, T. L., ABENDROTH, J., HOL, W. G. & SANDKVIST, M. (2006). Type II secretion: from structure to function. *FEMS Microbiol Lett* **255**, 175-86.
- JOURNET, L., HUGHES, K. T. & CORNELIS, G. R. (2005). Type III secretion: a secretory pathway serving both motility and virulence (review). *Mol Membr Biol* **22**, 41-50.
- KAINTH, P. & GUPTA, R. S. (2005). Signature proteins that are distinctive of alpha proteobacteria. *BMC Genomics* **6**, 94.
- KOVAL, S. F. & HYNES, S. H. (1991). Effect of paracrystalline protein surface layers on predation by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Bacteriol* **173**, 2244-9.
- LI, J., WOLF, S. G., ELBAUM, M. & TZFIRA, T. (2005). Exploring cargo transport mechanics in the type IV secretion systems. *Trends Microbiol* **13**, 295-8.
- LLOSA, M. & O'CALLAGHAN, D. (2004). Euroconference on the Biology of Type IV Secretion Processes: bacterial gates into the outer world. *Mol Microbiol* **53**, 1-8.
- MOTA, L. J., SORG, I. & CORNELIS, G. R. (2005). Type III secretion: the bacteria-eukaryotic cell express. *FEMS Microbiol Lett* **252**, 1-10.
- O'TOOLE, G., KAPLAN, H. B. & KOLTER, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**, 49-79.
- PALMER, T. & BERKS, B. C. (2003). Moving folded proteins across the bacterial cell membrane. *Microbiology* **149**, 547-56.
- PARSEK, M. R. & GREENBERG, E. P. (2000). Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8789-93.
- PARSEK, M. R. & GREENBERG, E. P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* **13**, 27-33.
- POHLSCHRODER, M., PRINZ, W. A., HARTMANN, E. & BECKWITH, J. (1997). Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme. *Cell* **91**, 563-6.
- PUGSLEY, A. P. & FRANCETIC, O. (1998). Protein secretion in *Escherichia coli* K-12: dead or alive? *Cell Mol Life Sci* **54**, 347-52.
- READING, N. C. & SPERANDIO, V. (2006). Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **254**, 1-11.
- RYAN, K. R. & SHAPIRO, L. (2003). Temporal and spatial regulation in prokaryotic cell cycle progression and development. *Annu Rev Biochem* **72**, 367-94.
- SANDKVIST, M. (2001). Biology of type II secretion. *Mol Microbiol* **40**, 271-83.

- SANDKVIST, M., BAGDASARIAN, M., HOWARD, S. P. & DIRITA, V. J. (1995). Interaction between the autokinase EpsE and EpsL in the cytoplasmic membrane is required for extracellular secretion in *Vibrio cholerae*. *Embo J* **14**, 1664-73.
- SCOTT, M. E., DOSSANI, Z. Y. & SANDKVIST, M. (2001). Directed polar secretion of protease from single cells of *Vibrio cholerae* via the type II secretion pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13978-83.
- SKERKER, J. M. & LAUB, M. T. (2004). Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Nat Rev Microbiol* **2**, 325-37.
- SLEYTR, U. B., EGELSEER, E. M., ILK, N., PUM, D. & SCHUSTER, B. (2007). S-Layers as a basic building block in a molecular construction kit. *Febs J* **274**, 323-34.
- STEPHENSON, K. (2005). Sec-dependent protein translocation across biological membranes: evolutionary conservation of an essential protein transport pathway (review). *Mol Membr Biol* **22**, 17-28.
- THANABALU, T., KORONAKIS, E., HUGHES, C. & KORONAKIS, V. (1998). Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E. coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *Embo J* **17**, 6487-96.
- THANASSI, D. G. & HULTGREN, S. J. (2000). Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 420-30.
- THANASSI, D. G., STATHOPOULOS, C., KARKAL, A. & LI, H. (2005). Protein secretion in the absence of ATP: the autotransporter, two-partner secretion and chaperone/usher pathways of gram-negative bacteria (review). *Mol Membr Biol* **22**, 63-72.
- TOPOROWSKI, M. C., NOMELLINI, J. F., AWRAM, P. & SMIT, J. (2004). Two outer membrane proteins are required for maximal type I secretion of the *Caulobacter crescentus* S-layer protein. *J Bacteriol* **186**, 8000-9.