

Synthèse bibliographique

Tableau 1: Types trophiques vis-à-vis de la température de croissance bactérienne	2
Tableau 2: Sièges des infections selon le résultat de l'enquête de prévalence de 2001	6
Tableau 3: Présentation des différentes familles de PFT	20
Tableau 4: Participation des phospholipases dans la virulence bactérienne	23
Tableau 5: Principales différences de propriétés biologiques retrouvées entre les métallophospholipases C à zinc et le groupe de PC-PLCs des bactéries à Gram-négatif	28
Tableau 6: Caractéristiques biochimiques des PLCs produites par différentes souches de <i>P. fluorescens</i>	30
Tableau 7: Représentation non exhaustive des phénotypes régulés par des mécanismes de variation de phase	42
Figure 1: Facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	9
Figure 2: Modèle de formation du biofilm	12
Figure 3: Structure du Lipopolysaccharide (LPS)	13
Figure 4: Modélisation de la structure du flagelle et des systèmes de sécrétion de type III de différentes bactéries à Gram négatif	16
Figure 5: Schéma des différents sites de clivage des phospholipides par les phospholipases	21
Figure 6: Représentation schématique de quelques phospholipides	22
Figure 7: Structure de la sphingomyéline	22
Figure 8: Mécanisme de colonisation intracellulaire de <i>L. monocytogenes</i>	26
Figure 9: Modèle de régulation de l'expression du régulon PlcR	32
Figure 10: Représentation de la variation de phase de l'opéron <i>fim</i> par un mécanisme de recombinase spécifique de site	36
Figure 11: Représentation du SSM transcriptionnel du gène <i>opc</i> de <i>N. meningitidis</i>	38
Figure 12: Représentation du SSM traductionnel du gène <i>mod</i> de <i>H. influenzae</i>	39
Figure 13: Schéma simplifié de la régulation du SSTT	40
Figure 14: Modèle de la variation de phase de l'opéron Pap	40
Figure 15: Modèle de fonctionnement du système à deux composantes GacS/GacA	44
Figure 16: Modèle de régulation des gènes dans la cascade Gac/Rsm de <i>P. fluorescens</i> CHA0	44
Figure 17: Modèle de la régulation génétique des mutations spontanées du système Gac	45

Tableau 8: Liste des souches utilisées lors de ce travail	48
Tableau 9: Liste des plasmides utilisés lors de ce travail	48
Tableau 10: Composition et préparation des milieux de culture	49
Tableau 11: Composition des gels SDS-PAGE	57
Tableau 12: Noms et séquences des amorces utilisées pour le séquençage du gène <i>plcC</i> et de ses régions amont et aval	61
Tableau 13: Programmes PCR utilisés pour l'amplification du gène <i>plcC</i> et des régions amont et aval	61
Figure 18: Carte du vecteur pMosBlue	63

Résultats-Discussion

Tableau 14: Tests d'assimilation des sucres par MFN1032	69
Tableau 15: Antibiogramme de la souche MFN1032 incubée à 28°C et 37°C	71

Tableau 16: Biosurfactants (CLPs) caractérisés dans les surnageants de culture de MFN1032 en milieu LB à 28°C et 17°C	79
--	----

Tableau 17: Activité pNPPC hydrolase de MFN1032, MF37 et PAO1 en fonction de la température de croissance	81
--	----

Tableau 18: Comparaison des PLCs produites par les souches de <i>P. fluorescens</i> dont la PLC est séquencée	87
--	----

Tableau 19: Comparaison de l'activité hémolytique de la souche MFN1032 avec les mutants <i>plcC</i>	91
--	----

Tableau 20: Production des biosurfactants CLPs chez MFN1032 et les mutants <i>plcC</i>	95
---	----

Tableau 21: Détermination des fréquences d'apparition des variants phénotypiques de la souche MFN1032	102
--	-----

Tableau 22: Regroupement des variants formant des colonies translucides sur King B en fonction des activités extracellulaires	105
--	-----

Tableau 23: Comparaison de l'activité hémolytique sécrétée dans le surnageant de culture de la souche MFN1032 et de ses variants Pyo- et Pyo++	106
---	-----

Tableau 24: Activité hémolytique sécrétée des variants V1 à V8 cultivés à 17°C	106
---	-----

Tableau 25: Production de biosurfactant par la souche MFN1032 et les variants phénotypiques	107
--	-----

Tableau 26: Fréquences d'apparition des variants phénotypiques de la souche MFN1032 complémentée en <i>trans</i> par les gènes <i>gacA</i> ou <i>gacS</i>	113
--	-----

Tableau 27: Synthèse des caractères phénotypiques recherchés chez MFN1032 et chez les différents variants	114
--	-----

Résultats-Discussion

Figure 19: Clés de détermination utilisées pour l'identification des <i>Pseudomonas</i> fluorescents saprophytiques	70
Figure 20: Courbe d'Arrhénius (ln k en fonction de la réciproque de la température absolue) de MFN1032 en milieu LB	71
Figure 21: Activités extracellulaires de la souche MFN1032	72
<hr/>	
Figure 22: Suivi de croissance et de la production de l'activité hémolytique de MFN1032	74
Figure 23: Effet de la température de croissance sur l'activité hémolytique sécrétée de la souche MFN1032	75
Figure 24: Comparaison de l'activité hémolytique de MFN1032 à celles de différentes souches de <i>Pseudomonas</i>	76
Figure 25: Effet de la congélation sur l'activité hémolytique de MFN1032 cultivée à 28°C	76
Figure 26: Effet de la chaleur sur l'activité hémolytique de MFN1032	77
Figure 27: Influence de la dilution du surnageant de culture sur l'activité hémolytique de MFN1032	77
Figure 28: Effet de la concentration du surnageant de culture sur filtre Amicon sur le pouvoir hémolytique du surnageant	78
Figure 29: Caractérisation des biosurfactants produits dans le surnageant de culture de la souche MFN1032 par HPLC-MS	79
Figure 30: Activité lécithinase de MFN1032 incubée à 37°C	80
Figure 31: Cinétique de production de l'activité pNPPC hydrolase de la souche MFN1032 comparée à celle de l'activité hémolytique	81
Figure 32: Influence du pH et de la température d'incubation sur l'activité pNPPC hydrolase de la souche MFN1032	82
Figure 33: Thermostabilité de l'activité pNPPC hydrolase de la souche MFN1032	83
Figure 34: Détermination de la masse moléculaire de la phospholipase C produite par MFN1032 par zymogramme d'un gel SDS-PAGE sur gélose à l'œuf	85
Figure 35: Amplification par PCR du gène codant la phospholipase C de la souche MFN1032	85
Figure 36: Séquences du gène codant la phospholipase C PlcC et de la protéine déduite	86
Figure 37: Alignement des séquences des PLC produites par les <i>P. fluorescens</i>	86
Figure 38: Dendrogramme des PLCs	87
Figure 39: Localisation de l'activité lécithinase de la souche MF37 par zymogramme sur gélose à l'œuf	88
Figure 40: Amplification par PCR d'ADN de MF37 à partir des amorces Plc1/Plc2 et Plc0/Plc2	88
Figure 41: Analyse de la région génique aval des PLCs de Pf-5, PfO-1, Preuss et MFN1032	89
Figure 42: Région amont de <i>plcC</i>	89
Figure 43: Constructions des mutants <i>plcC</i> de MFN1032	90
Figure 44: Appréciation de l'activité lécithinase sur gélose à l'œuf de MFN1032 et MFN1036	90

Résultats-Discussion

Figure 45: Activité lécithinase sur gélose à l'œuf à 28°C de MFN1032 et de ses mutants MFN1037 (<i>pIcC</i> -déficient) et MFN1038 (<i>pIcC</i> -déficient complémenté)	90
Figure 46: Schéma de modélisation des interactions possibles entre <i>PlcC</i> et <i>GntR</i>	91
Figure 47: Profil électrophorétique SDS-PAGE des surnageants de culture de MFN1032 et de ses mutants <i>pIcC</i>	92
Figure 48: Mobilité de type swimming de MFN1032 et de ses mutants	93
Figure 49: Mobilité de type swarming de MFN1032 et de MFN1037	94
Figure 50: Visualisation des flagelles de MFN1032 et MFN1037 au MET	94
Figure 51: Visualisation de MFN1032 et MFN1037 au MEB	95
Figure 52: Activité hémolytique et profils électrophorétiques SDS-PAGE de surnageants de culture de la souche MFN1032	101
<hr/>	
Figure 53: Variation phénotypique de la souche MFN1032 cultivée sur milieu KB et sur gélose à l'œuf	101
Figure 54: Activité protéase sur gélose au lait après 48h de croissance à 28°C	104
Figure 55: Activité protéase sur gélose au lait après 48h de croissance à 28°C	104
Figure 56: Production de pyoverdine par la souche MFN1032 et les variants V1, V2 ou V5 sur gélose King B	104
Figure 57: Activité lécithinase sur gélose à l'œuf	105
Figure 58: Activité hémolytique globale de la souche MFN1032 et de ses variants	105
Figure 59: Analyse électrophorétique SDS-PAGE des surnageants de cultures de la souche MFN1032 et de ses variants cultivés à 17°C	108
Figure 60: Mobilité de type swimming de la souche Pyo- et de la souche MFN1032	108
Figure 61: Mobilité de type de swimming de la souche MFN1032 et de ses variants	108
Figure 62: Colonies du variant V8 en condition de type swimming	109
Figure 63: Mobilité de type swarming des différents variants	109
Figure 64: Comparaison de la capacité à former des biofilms de la souche MFN1032 et de ses variants	110
Figure 65: Visualisation des flagelles de MFN1032 et des variants au MET	111
Figure 66: Complémentation en <i>trans</i> des variants du groupe 1 par les gènes <i>gacA</i> ou <i>gacS</i> , portés respectivement par les plasmides pMP5565 et pMP6562	112
Figure 67: Effet de la complémentation en <i>trans</i> par les gènes <i>gacA</i> ou <i>gacS</i> sur l'activité hémolytique des variants de MFN1032	112

Conclusions générales et perspectives

Figure 68: Modèle du réseau de régulation impliqué dans la variation de phénotype chez MFN1032	122
---	-----

Abréviations

aa :	Acides aminés
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADP :	Adénosine diphosphate
AH-S :	Activité hémolytique sécrétée
Amp^R :	Résistance à l'ampicilline
ARN :	Acide ribonucléique
ARNr :	Acide ribonucléique ribosomal
Bv :	Biovar
CFTR :	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CHU :	Centre hospitalier universitaire
CLP :	Cyclolipopeptide
DAG :	Diacylglycérol
DMSO :	Diméthylsulfoxide
dNTP :	Mélange de nucléotides triphosphates (ATP, GTP, CTP, TTP)
DO :	Densité optique
EDTA :	Ethylène diamine tétra-acétate
EF :	Facteur d'elongation
EHEC :	<i>Escherichia coli</i> entérohémorragique
EPEC :	<i>Escherichia coli</i> entéopathogène
EPS :	Exopolysaccharides
GNO :	Gélose nutritive ordinaire
HPLC :	Chromatographie liquide à haute pression
IL :	Interleukine
IR :	Séquence répétée inversée
KB :	King B
KBG :	King B gélosé
kDa :	Kilodalton
KDO :	acide 2-kéto-3-déoxyoctulonique
LB :	Luria Bertani
LBG :	Luria Bertani gélosé
LPS :	lipopolysaccharides
MATS :	« Microbial adhesion to solvant »
MEB :	Microscope électronique à balayage
MET :	Microscope électronique à transmission
MM :	Masse moléculaire
MS :	Spectre de masse
ORF :	Cadre ouvert de lecture
PAF :	Facteur d'agrégation des plaquettes
PAGE :	Electrophorèse en gel de polyacrylamide
PAO :	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Pap :	Pyelonephritis-associated pili
papR :	Peptide activant PIlC

Pb :	Paire de bases
PBS :	Tampon phosphate isotonique « phosphate buffer saline »
PC :	Phosphatidylcholine
PC-PLC :	Phospholipase hydrolysant préférentiellement la phosphatidylcholine
PCR :	« polymerase chain reaction »
PE :	Phosphatidyléthanolamine
PFT :	Toxine formant des pores
PGPR :	« Plant growth promoting rhizobacteria »
PI :	Phosphatidylinositol
PLA :	Phospholipase A
PLB :	Phospholipase B
PLC :	Phospholipase C
PLD :	Phospholipase D
pNP :	para-nitrophénol
pNPPC :	para-nitrophénylphosphorylcholine
PS :	Phosphatidylsérine
PVDF :	Polyvinyldifluoré
RBS :	« Ribosome binding site »
RSS :	Recombinase spécifique de site
RTX :	« Repeat in toxins »
SCR :	Séquence courte répétée
SDS :	Sodium dodéyl sulfate
SM :	Sphingomyéline
SSM :	« Slipped strand mispairing »
SSTT :	Système de sécrétion de type III
Tat :	« Twin arginine translocase »
Tet^R :	Résistance à la tétracycline
TLR :	« Toll-like receptor »
TNF :	« Tumor necrosing factor »
Tr :	Temps de rétention
Tris :	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UPEC :	<i>Escherichia coli</i> uropathogène

Rapport!Gratuit.com

Sommaire

Partie I : Le genre *Pseudomonas* : présentation et pouvoir pathogène

1	Le genre <i>Pseudomonas</i>	2
1.1	Caractères biochimiques	2
1.2	Une diversité taxonomique importante	2
1.3	Importance du genre <i>Pseudomonas</i>	3
2	Les <i>Pseudomonas</i> dans les infections nosocomiales	4
2.1	Définition d'une infection nosocomiale	4
2.2	Facteurs favorisant l'émergence des infections nosocomiales	5
2.3	Fréquence des infections nosocomiales	6
2.4	Bilan des infections et des micro-organismes les plus concernés (selon le rapport RAISIN)	6
2.5	Les cas de <i>P. aeruginosa</i> et <i>P. fluorescens</i>	7
2.5.1	Le modèle du genre : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
2.5.2	Cas de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	8
3	Propriétés de virulence de <i>P. fluorescens</i>	9
3.1	Colonisation et multiplication	9
3.1.1	<i>L'adhésion</i>	9
3.1.2	<i>La formation de biofilms</i>	11
3.1.3	<i>La production de biosurfactants</i>	12
3.2	Effets toxiques	13
3.2.1	<i>Les endotoxines</i>	13
3.2.2	<i>Toxines et exoenzymes cytotoxiques</i>	14
3.2.3	<i>Production de superantigène</i>	15
3.2.4	<i>La virulence par le système de sécrétion de type III (SSTT)</i>	16

Partie II : Les toxines bactériennes membranolytiques sécrétées

1	Définition	19
2	Les hémolysines formant des pores membranaires ou pore-forming toxin (PFT)	19
3	Les hémolysines à activité détersive	20
4	Les hémolysines à activité enzymatique	21
4.1	Classification	21
4.2	Spécificité de substrat et efficacité d'hydrolyse	22
4.3	Cytotoxicité des phospholipases	23
4.4	Implication des phospholipases dans la virulence bactérienne	23
5	Les phospholipases C bactériennes (PLC)	24
5.1	Les différentes classes de PLC	24
5.1.1	<i>Les Zinc-métallophospholipases C produites par les bactéries à Gram-positif</i>	24

5.1.2	<i>La classe des PLC hydrolysant préférentiellement la phosphatidylcholine (PC-PLC)</i>	27
5.1.3	<i>Les phospholipases C de Legionella pneumophila</i>	29
5.1.4	<i>Les PLCs produites par Pseudomonas fluorescens</i>	29
5.2	<i>Régulation des phospholipases C</i>	31
5.2.1	<i>Régulation de la PlcH de P. aeruginosa</i>	31
5.2.2	<i>Régulation de l'a-toxine de C. perfringens</i>	31
5.2.3	<i>Le régulon PlcR chez les B. cereus</i>	32
5.2.4	<i>Le régulon flagellaire</i>	33

Partie III : Adaptation des bactéries par des mécanismes de variation de phénotype chez les *Pseudomonas*

1	Mécanismes moléculaires impliqués dans les variations de phase	35
1.1	<i>Les réarrangements chromosomiques</i>	35
1.1.1	<i>La recombinaison spécifique de site</i>	35
1.1.2	<i>La recombinaison homologue</i>	37
1.1.3	<i>Mésappariement de brin d'ADN – Slipped-strand mispairing (SSM)</i>	38
1.2	<i>Régulation épigénétique</i>	39
1.2.1	<i>Définition</i>	39
1.2.2	<i>Régulation épigénétique du SSTT chez P. aeruginosa</i>	39
1.2.3	<i>Régulation épigénétique du système pap chez E.coli</i>	40
2	Les phénotypes affectés par les variations de phase	41
2.1	<i>Variation phénotypique des structures membranaires</i>	41
2.2	<i>Variation de phase des régulateurs globaux</i>	42
3	La variation phénotypique chez les <i>Pseudomonas</i>	42
4	La variation phénotypique par la mutation spontanée du régulateur global Gac	44

Matériel et méthodes 47

I- Physiologie bactérienne

1	Souches bactériennes et plasmides	48
1.1	<i>La souche MFN1032</i>	48
1.1.1	<i>Origine</i>	48
1.1.2	<i>Identification</i>	48
1.2	<i>Cultures Bactériennes</i>	48
1.2.1	<i>Conservation des souches</i>	48
1.2.2	<i>Composition des milieux de culture</i>	48
1.2.3	<i>Conditions de culture</i>	49
2	Détermination des fréquences de variation phénotypique	50
3	Dosage des activités extracellulaires	50
3.1	<i>Préparation des échantillons</i>	50
3.2	<i>Dosage de l'activité hémolytique sécrétée</i>	51
3.2.1	<i>Préparation des hématies</i>	51

3.2.2	<i>Dosage de l'activité hémolytique sécrétée</i>	51
3.2.3	<i>Effet du D609 sur l'activité hémolytique sécrétée</i>	51
3.3	Dosage de l'hydrolyse du p-nitrophénylphosphorylcholine (pNPPC)	52
3.3.1	<i>Préparation des échantillons et dosage</i>	52
3.3.2	<i>Influence du pH sur l'activité pNPPC et de la température d'incubation</i>	52
3.3.3	<i>Influence du D609 sur l'activité pNPPC</i>	52
3.4	Dosage du KDO dans le surnageant de culture	53
3.5	Mesure de l'activité protéolytique du surnageant de culture.....	53
4	Etude des flagelles bactériens	54
4.1	La mobilité bactérienne	54
4.1.1	<i>Mobilité de type swimming</i>	54
4.1.2	<i>Mobilité de type swarming</i>	54
4.2	Capacité à former des biofilms	54
4.3	Visualisation des flagelles en microscopie électronique.....	55
5	Production et caractérisation des biosurfactants.....	55
5.1	Test qualitatif de l'étalement de la goutte d'eau	55
5.2	Analyse des surnageants par HPLC/MS	56
5.2.1	<i>Les échantillons</i>	56
5.2.2	<i>La séparation HPLC</i>	56
5.2.3	<i>La détection par spectrométrie de masse.....</i>	56
6	Méthodes analytiques des protéines du surnageant.....	57
6.1	Dosage des protéines du surnageant de culture	57
6.2	Electrophorèse en conditions dénaturantes SDS-PAGE.....	57
6.3	Electrophorèse en conditions non dénaturantes (ND-PAGE).....	58
6.4	Révélation des protéines sur le gel	58
6.4.1	<i>Coloration au bleu de Coomassie.....</i>	58
6.4.2	<i>Coloration au nitrate d'argent</i>	58
6.5	Zymogramme de l'activité lécithinase sur gélose à l'œuf	59
6.6	Détermination de la séquence N-terminale	59
6.6.1	<i>Electrotransfert des protéines sur membrane PVDF</i>	59
6.6.2	<i>Révélation des protéines</i>	59
6.6.3	<i>Microséquençage chimique des protéines</i>	59

II- Techniques de biologie moléculaire

1	Extraction des acides nucléiques	60
1.1	Extraction du chromosome bactérien	60
1.2	Extraction plasmidique	60
2	Manipulation des fragments d'ADN	61
2.1	Amplification par PCR	61
2.2	Digestion enzymatique	62
2.3	Electrophorèse d'ADN	62
2.4	Extraction et purification de fragments d'ADN	62
3	Clonage	63
3.1	Sous clonage	63
3.2	Séquençage	63
3.3	Clonage	63
3.3.1	<i>Transformations</i>	63
3.3.2	<i>Construction d'un mutant de surexpression plcC</i>	65

3.3.3	<i>Mutagenèse par insertion chromosomique dans le gène plcC</i>	65
3.3.4	<i>Complémentation du gène plcC en trans</i>	66
3.3.5	<i>Complémentation de MFN1032 et des variants phénotypiques par les gènes gacA et gacS</i>	67

Résultats et Discussion 68

Partie I- Identification de la souche MFN1032

1	Origine et identification de la souche	69
2	Caractérisation phénotypique et physiologique de la souche	70
2.1	Détermination des cinétiques de croissance en fonction de la température	70
2.2	Résistance aux antibiotiques.....	71
2.3	Activités extracellulaires	71
CONCLUSION PARTIE I	72

Partie II- Activité hémolytique sécrétée de la souche MFN1032

1	Etude de l'activité hémolytique globale sécrétée	74
1.1	Cinétique de production de l'activité hémolytique sécrétée	74
1.2	Influence de la température de croissance sur l'activité hémolytique sécrétée de MFN1032.....	75
1.3	Comparaison des activités hémolytiques sécrétées de MFN1032 et de différentes souches de <i>Pseudomonas</i>	75
1.4	Stabilité de l'activité	76
1.5	Effet-dilution	77
2	Les différents facteurs pouvant intervenir dans l'activité hémolytique sécrétée.....	78
2.1	La production de biosurfactants	78
2.2	La production de phospholipases.....	80
3	Implication d'une phospholipase C dans l'activité hémolytique sécrétée.....	80
3.1	Dosage de l'activité pNPPC hydrolase de la souche MFN1032.....	80
3.1.1	<i>Cinétique de production en fonction de la croissance</i>	81
3.1.2	<i>Influence de la température de croissance sur l'activité pNPPC hydrolase</i>	81
3.1.3	<i>Conditions optimales d'activité</i>	82
3.1.4	<i>Stabilité de l'activité pNPPC hydrolase</i>	83
3.1.5	<i>Effet du D609</i>	83
3.2	Caractérisation de la phospholipase C de MFN1032	84
3.2.1	<i>Localisation de la phospholipase C sur SDS-PAGE par zymogramme sur gélose à l'œuf</i>	85
3.2.2	<i>Séquençage du gène codant la phospholipase C de MFN1032</i>	85
3.3	Construction de mutants plcC	90
3.3.1	<i>Construction des mutants – présentation des souches</i>	90
3.3.2	<i>Phénotypes des différents mutants sur gélose à l'œuf</i>	90

3.3.3	<i>Activité hémolytique de MFN1032 et de ses mutants plcC en fonction de la température de croissance</i>	91
3.3.4	<i>Analyse SDS-PAGE des différents mutants</i>	92
3.3.5	<i>Comparaison de la mobilité</i>	92
3.3.6	<i>Visualisation des flagelles bactériens de MFN1032 et de son mutant plcC déficient</i>	94
3.3.7	<i>Comparaison de la production de biosurfactants par MFN1032 et son mutant plcC déficient</i>	95
CONCLUSION PARTIE II.....		96

Partie III- Variation phénotypique de la souche MFN1032

1	Mise en évidence de variation de phénotype chez la souche MFN1032.....	101
2	Détermination des fréquences d'apparition et de réversion des variants.....	101
2.1	Fréquence d'apparition.....	102
2.2	Réversion des variants.....	103
3	Analyse phénotypique des différents variants de la souche MFN1032.....	103
3.1	Comparaison des activités extracellulaires	104
3.1.1	<i>Activités lécithinase et protéase</i>	104
3.1.2	<i>Activité hémolytique</i>	105
3.1.3	<i>Production de biosurfactants</i>	107
3.2	Profil SDS-PAGE des différents variants.....	108
3.3	Comparaison de la mobilité	108
3.3.1	<i>Swimming</i>	108
3.3.2	<i>Swarming</i>	109
3.4	Capacité à former des biofilms par les variants	110
3.5	Visualisation des flagelles bactériens.....	111
4	Effets des produits des gènes <i>gacA</i> et <i>gacS</i> sur les variants	111
4.1	Complémentation des variants en trans par les gènes <i>gacA</i> ou <i>gacS</i>	112
4.2	Influence d'une surexpression de <i>GacA</i> ou de <i>GacS</i> sur la fréquence d'apparition des variants	112
CONCLUSION PARTIE III.....		113

Conclusions générales et perspectives	119
---------------------------------------	-----

« Le plus vieux document, reprenant les notions de « microbes, infection et contagion » telles que nous les connaissons aujourd’hui, est le livre *Rerum rustaricum de agricocultura* du romain Marcus Terentius Varro (116-27 AC) dans lequel une description théorique de « petits animalcules invisibles à l’oeil nu » est donnée : «qui peuvent se transmettre via l’air, pénétrer dans le corps par la bouche et le nez, et développer des maladies graves ». (...) Bien que ces animalcules procaryotes et eucaryotes aient été observés à la fin du 17e siècle par Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723), leur rôle exact dans le développement de maladies infectieuses ne fut pas pleinement reconnu avant la fin du 19e siècle. Au 18e siècle par exemple, Jean Astruc (1684-1766), alors médecin de Louis XV, écrivait à propos de la syphilis : « Certaines personnes (...) croient que le poison vénérien ne serait que des cohortes de petites choses vivantes, rapides, invisibles et de nature prolifique, lesquelles, une fois introduites, croissent et se multiplient en abondance. (...) Si cette théorie devait un jour s’avérer correcte, on pourrait (...) dire la même chose non seulement en ce qui concerne la peste (...), mais aussi de la petite vérole, de la rage, de la gale, de l’impétigo, du psoriasis et d’autres maladies contagieuses, en fait, de toutes. Ainsi toute la théorie de la médecine s’écroulerait (...) ; rien ne peut être plus absurde ». Il était difficile d’être plus près de la vérité et de la refuser, parce qu’elle remettait en question toutes les certitudes d’une époque (...).

Finalement pendant la seconde moitié du 19e siècle, le chimiste français Louis Pasteur (1822- 1895) et le médecin allemand Robert Koch (1843-1910) prouvent définitivement que les micro-organismes ou animalcules de van Leeuwenhoek sont bien la cause de maladies infectieuses et contagieuses (...).

Les différentes avancées en microbiologie médicale ne permettent cependant pas de définir une bactérie pathogène (« qui provoque une maladie »), ni de comprendre les mécanismes qui président au développement d’une pathologie. Une réponse possible à la première question est qu'**une bactérie pathogène a développé un dialogue particulier avec son hôte multicellulaire et que le résultat de ce dialogue est le développement de lésions cellulaires et tissulaires dans différents organes qui vont de paire avec l’apparition de signes cliniques et, donc, d’une pathologie.** »

Maladies infectieuses et micro-organismes :

de la préhistoire aux postulats de Koch - grande et petite histoire

Professeur Jacques Mainil, Département des Maladies infectieuses et parasitaires,

Université de Liège

Pseudomonas fluorescens est une espèce ubiquitaire retrouvée dans la plupart des niches écologiques. Cette bactérie dispose d'un arsenal de facteurs de virulence (lipopolysaccharide, cyanure, protéases, lipases...) et s'avère capable de se comporter comme un pathogène opportuniste, responsable d'infections périphériques et en particulier de chocs septiques post-transfusionnels.

En dépit de l'émergence de souches hospitalières de *P. fluorescens* adaptées à 37°C, peu d'études ont été publiées sur le risque infectieux de cette espèce, du fait de sa psychrotrophie et de la considération de cette espèce comme « non-pathogène ».

Le LMDF a procédé à la caractérisation de souches isolées de patients hospitalisés dans les hôpitaux de Haute-Normandie. L'implication de ces souches dans des infections nosocomiales ayant été clairement établie, un des objectifs du laboratoire a été de comprendre et d'étudier l'adaptation de cette espèce à cette nouvelle niche écologique, et de déterminer les facteurs qui pourraient être impliqués dans la virulence de ces bactéries.

L'objectif de mon travail de thèse a constitué à étudier la souche MFN1032, une souche clinique de *P. fluorescens*, isolée à partir de lavages des alvéoles pulmonaires d'un patient souffrant d'une pneumopathie.

Cette souche produit un nombre important de facteurs de virulence potentiels, et présente notamment une activité hémolytique sur gélose au sang. L'activité hémolytique est un facteur de virulence retrouvé chez de nombreuses bactéries pathogènes. Elle peut résulter de l'action de différents acteurs, et nous nous sommes attachés à caractériser les facteurs responsables de cette activité chez MFN1032.

D'autre part, l'activité hémolytique de MFN1032 présente un caractère variable. Cette variabilité s'explique par l'émergence de variants phénotypiques de la souche, qui présentent des propriétés de virulence différentes.

La synthèse bibliographique, ci-après, traite des différents thèmes abordés au cours de ce projet. Elle permet, dans un premier temps, de situer le genre *Pseudomonas* en terme de virulence, et particulièrement l'espèce *P. fluorescens*. Une seconde partie est consacrée aux différents facteurs pouvant présenter une activité membranolytique. Enfin l'adaptation par des mécanismes de variation de phénotype est abordée dans une troisième et dernière partie.

Synthèse Bibliographique

Tableau 1: Types trophiques vis-à-vis de la température de croissance bactérienne.

	Psychrophile	Psychrotrophe	Mésophile	Thermophile	Hyperthermophile
T_m	- 4°C	0°C	5-10°C	25°C	45°C
T_o	$\leq 15^\circ\text{C}$	$\geq 25^\circ\text{C}$	$\geq 30^\circ\text{C}$	$\geq 45^\circ\text{C}$	$\geq 65^\circ\text{C}$
T_M	$\leq 20^\circ\text{C}$	$> 25^\circ\text{C}$	$< 50^\circ\text{C}$	$> 50^\circ\text{C}$	$> 70^\circ\text{C}$

Les classes thermiques de croissance des espèces bactériennes sont distinguées sur la base de trois températures cardinales : T_o est la température optimale de croissance (à laquelle le taux de croissance est maximal), T_m et T_M sont respectivement les températures minimale et maximale de croissance, en dessous et au dessus desquelles aucune croissance n'est observée (Morita *et al.*, 1975).

Partie I : Le genre *Pseudomonas* : présentation et pouvoir pathogène

1 Le genre *Pseudomonas*

1.1 Caractères biochimiques

Les *Pseudomonas* et genres apparentés appartiennent au phylum des Proteobacteria, classe des Gammaproteobacteria, ordre des *Pseudomonales*. Ce sont des bacilles à Gram négatif, droits et fins, aux extrémités arrondies, d'une taille moyenne de 2 sur 0,5 µm (Palleroni, 1984). Ces bactéries sont mobiles grâce à une ciliature polaire monotrichie, lophotrichie ou multitrichie. Elles se cultivent sur des milieux usuels non enrichis et sont capables d'utiliser de nombreux substrats hydrocarbonés comme sources de carbone et d'énergie. Elles présentent un type respiratoire aérobie strict et un type métabolique chimio-organotrophe oxydatif. L'espèce-type du genre, *P. aeruginosa*, est mésophile tandis que la majorité des espèces sont psychrotropes (**Tableau 1**).

1.2 Une diversité taxonomique importante

L'étude de la composition en bases du génome et la recherche d'homologies de séquences génomiques par hybridations ADN-ADN et ADN-ARN, ainsi que le séquençage de marqueurs taxonomiques tel l'ADN codant l'ARNr16S (Anzai *et al.*, 2000), ont conduit à une évolution de la taxonomie au sein du groupe des *Pseudomonas* et genres apparentés. Ainsi, en 1984, Palleroni *et al.* ont montré que le genre était génétiquement hétérogène avec l'existence de cinq groupes d'ARN distincts. Le genre ***Pseudomonas sensu stricto*** correspond au groupe d'**ARN I** et comprend actuellement plus d'une centaine d'espèces différentes. Les autres espèces ***Pseudomonas sensu lato* (groupes ARN II à V)** ont été reclassées dans d'autres genres. Cette réorganisation a permis une distinction marquée entre le genre *Pseudomonas* et les genres apparentés regroupant *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Comamonas*, *Flavimonas*, *Flavobacterium*, *Ralstonia*, *Shewanella*, *Sphingobacterium* et *Stenotrophomonas* (Kersters *et al.*, 1996).

Le genre *Pseudomonas sensu stricto* est communément divisé en deux groupes : les *Pseudomonas spp.* fluorescents (par exemple *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* ou *P. syringae*) et les *Pseudomonas spp.* non-fluorescents (par exemple *P. alcaligenes*, *P. fragi* ou *P. stutzeri*). Cette distinction, qui n'a pas de valeur taxonomique officielle, correspond à la capacité ou non de produire un sidérophore spécifique, la pyoverdine. Les pyoverdines sont des pigments fluorescents sous UV, de couleur jaune-vert, solubles dans l'eau et insolubles dans le chloroforme. Elles jouent un rôle physiologique important car ce sont de puissants sidérophores. Elles sont constituées d'un chromophore quinolique associé à des peptides dont la taille et la composition en acides aminés sont variables. La synthèse des pyoverdines dépend de la quantité de fer (Fe^{3+}) disponible dans le milieu de croissance et des besoins de la bactérie. Les pyoverdines sont ainsi synthétisées lorsque la concentration en fer libre dans le milieu est trop faible pour permettre la croissance bactérienne.

L'espèce *P. fluorescens* compte parmi les espèces qui présentent une forte hétérogénéité phénotypique et génotypique. En 2000, Bossis *et al.* ont rassemblé des informations concernant les différentes études taxonomiques entreprises au sein de l'espèce *P. fluorescens*. L'espèce comprend maintenant 5 biovars, dont l'appartenance repose sur l'assimilation de différents éléments carbonés. L'utilisation de clés dichotomiques (Bossis *et al.*, 2000), ainsi que le sidérotypage permettent de déterminer avec précision l'appartenance d'une souche bactérienne à un biovar donné. Toutefois, la désignation de cette espèce est encore controversée car elle ne correspond pas à la définition génotypique actuelle de l'espèce bactérienne. Les pourcentages d'hybridation ADN/ADN entre souches de la même espèce, et dans certains cas du même biovar, sont fréquemment inférieurs à 50%.

La diversité de la structure du génome apparaît plus grande que la diversité physiologique (Ginard *et al.*, 1997).

1.3 Importance du genre *Pseudomonas*

Les bactéries du genre *Pseudomonas* occupent la plupart des environnements naturels. Elles sont isolées de l'eau, du sol, des poussières en suspension dans l'air et des végétaux. Elles présentent un fort potentiel d'adaptation physiologique et

génétique et sont capables d'utiliser une grande variété de nutriments. D'un point de vue écologique, les *Pseudomonas* regroupent des espèces bénéfiques pour l'environnement et des espèces pathogènes.

Dans le milieu extérieur, les *Pseudomonas spp.* sont capables de dégrader de nombreux composés organiques, parmi lesquels des composés halogénés, des hydrocarbures aromatiques et des herbicides (Ramos, 2004). Les bactéries du genre *Pseudomonas* peuvent ainsi être utilisées dans les processus de décontamination des sols (bioremédiation) (Stallwood *et al.*, 2005).

Au niveau de la rhizosphère (surface des racines et sol environnant), les *Pseudomonas spp.* peuvent avoir un effet bénéfique en mobilisant certains nutriments nécessaires à la croissance de la plante. Elles peuvent aussi la protéger contre des micro-organismes pathogènes en stimulant les mécanismes de résistance intrinsèques de la plante, en sécrétant des composés antibactériens et antifongiques et/ou par la compétition vis-à-vis de certains nutriments. C'est notamment le cas de souches de *P. fluorescens*, décrites comme des bactéries phytoprotectrices jouant un rôle prépondérant dans le biocontrôle de la rhizosphère (Walsh *et al.*, 2001). D'autres espèces sont des pathogènes pour les plantes, comme l'espèce *P. syringae* qui compte au moins 37 pathovars capables d'infecter de nombreuses espèces de végétaux (Sawada *et al.*, 2002).

Chez l'homme, les *Pseudomonas spp.* peuvent également se comporter comme des agents opportunistes et être à l'origine d'infections iatrogènes et/ou nosocomiales. En raison de la richesse de leurs voies métaboliques, elles sont souvent capables de résister à de nombreux antiseptiques ou antibiotiques. Ceci explique leur présence de plus en plus fréquente en milieu hospitalier, où elles peuvent être isolées de l'environnement humide, des denrées alimentaires, des réactifs biologiques, des solutés injectables, du sang ou des dérivés sanguins conservés au froid (Feuilloley *et al.*, 2007).

2 Les *Pseudomonas* dans les infections nosocomiales

2.1 Définition d'une infection nosocomiale

Une infection est dite nosocomiale si elle apparaît au cours ou à la suite d'une hospitalisation et si elle était absente à l'admission à l'hôpital. Lorsque la situation

précise à l'admission n'est pas connue, un délai d'au moins 48 heures après l'admission (ou un délai supérieur à la période d'incubation lorsque celle-ci est connue) est communément accepté pour distinguer une infection d'acquisition nosocomiale d'une infection communautaire. Pour les infections du site opératoire, on considère comme nosocomiales les infections survenues dans les 30 jours suivant l'intervention, ou, s'il y a mise en place d'une prothèse ou d'un implant, dans l'année qui suit l'intervention.

On distingue deux types d'infections nosocomiales qui relèvent des modes de transmission différents :

1) *Les infections d'origine endogène.* Dans ce type d'infections, c'est le malade qui s'infecte avec ses propres germes, à la faveur d'un acte invasif et/ou en raison d'une fragilité particulière.

2) *Les infections d'origine exogène.* Ces infections peuvent être :

- croisées, c'est-à-dire transmises d'un malade à un autre par les mains ou les instruments de travail du personnel médical ou paramédical,
- provoquées par les germes du personnel soignant,
- liées à la contamination de l'environnement hospitalier (eau, air, matériel, alimentation...).

2.2 Facteurs favorisant l'émergence des infections nosocomiales

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plusieurs facteurs participent aujourd'hui à l'augmentation de l'incidence des infections nosocomiales : l'urbanisation croissante, la pollution, les modifications de l'environnement, l'évolution démographique amenant une proportion croissante de personnes âgées qui nécessitent des soins hospitaliers, l'épidémie du SIDA qui a fortement accru la population de sujets immunodéprimés.

L'utilisation renforcée des antimicrobiens en agriculture pour répondre aux besoins démographiques renforce l'émergence des résistances chez les agents pathogènes des zoonoses.

Le commerce mondial a accru la vitesse de propagation à la fois des maladies infectieuses et des micro-organismes multi-résistants d'un continent à l'autre.

L'utilisation massive d'antibiotiques pour lutter contre ces infections a renforcé la pression de sélection des micro-organismes multi-résistants.

Enfin, les avancées technologiques dans le domaine médical telles que la ventilation artificielle et l'intervention chirurgicale, ont favorisé les infections nosocomiales par leur côté invasif et sont mises en cause dans près de 50% des cas (Bosseray et Micoud, 2000).

2.3 Fréquence des infections nosocomiales

(Selon le rapport du Réseau d'Alerte et d'Investigation de la Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN) http://www.invs.sante.fr/publications/2003/raisin_enp_2001/couv_raisin_enp_2001.pdf)

L'enquête de prévalence réalisée en France en 2001 sur plus de 1500 établissements de soins (publics et privés), montre que 7,5 % des patients hospitalisés présentent une infection nosocomiale.

La comparaison des deux enquêtes de 1996 et 2001 suggère une diminution de la fréquence d'infection (baisse de 4% du taux des infections dans les Centres Hospitaliers Universitaires et de 11% dans les Centres Hospitaliers).

Toutefois, ces résultats doivent être pris avec précaution car tous les facteurs pouvant influer sur les taux d'infections observés lors de deux enquêtes successives ne peuvent pas être pris en compte.

Cette étude suggère également que les taux de résistances aux antibiotiques des micro-organismes les plus couramment impliqués dans les infections nosocomiales augmentent. Par exemple, la part des *S. aureus* résistants à la méticilline était de 64% en 2001 contre 57% en 1996.

2.4 Bilan des infections et des micro-organismes les plus concernés (selon le rapport RAISIN)

Comme cela avait déjà été constaté lors de l'enquête de prévalence réalisée en 1996, les infections les plus fréquentes sont les infections du tractus urinaire (39,9 %). Celles-ci sont suivies par les infections de plaies opératoires (10,3 %), les infections respiratoires (8,7 %) et les septicémies (4,1 %) (**Tableau 2**).

Tableau 2: Sièges des infections selon le résultat de l'enquête de prévalence de 2001 (source : rapport RAISIN 2003)

Siège	Nombre	%
URI asymptomatique	5401	23,6%
URI symptomatique	3734	16,3%
ISO superficielle	888	3,9%
ISO profonde	779	3,4%
ISO organe	681	3,0%
Pneumopathie	2294	10,0%
Inf. respiratoire haute	1978	8,7%
Peau/tissus mous	2465	10,8%
Infection sur cathéter, locale	376	1,6%
Infection sur cathéter, septicémie	340	1,5%
Bactériémie/septicémie	931	4,1%
Inf V. URI autre	201	0,9%
Inf. systémiques	192	0,8%
Gastro-intestinales	586	2,6%
ORL, stomato.	781	3,4%
Ophtalmo	518	2,3%
Génitale	251	1,1%
Os/articulations	363	1,6%
SNC	45	0,2%
Cardio-vasculaire	38	0,2%
Ensemble	22842	100,0%

URI : infection urinaire

ISO : infection du site opératoire

SNC : système nerveux central

Parmi les bactéries les plus fréquemment impliquées, les *Pseudomonas* et genres apparentés occupent une grande place. *P. aeruginosa* est le troisième micro-organisme responsable d'infection nosocomiale. *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia* sont également retrouvées au sein des hôpitaux (Berthelot *et al.*, 2005). Le réservoir des *Pseudomonas* et apparentés se trouve principalement au niveau d'habitats hydriques tels que les siphons, les trop pleins de postes de lavage de mains, les douches ou encore au niveau de nébuliseurs et d'humidificateurs. Elles contaminent également les végétaux et l'alimentation (Husson *et al.*, 2000). Ce sont des agents pathogènes opportunistes capables de provoquer à la fois des infections aiguës (pneumopathies, septicémie) et chroniques (mucoviscidose).

2.5 Les cas de *P. aeruginosa* et *P. fluorescens*

2.5.1 Le modèle du genre : *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste capable d'infecter un large spectre d'hôte : humains, souris, plantes, insectes, nématodes ou amibes (D'Argenio *et al.*, 2001; Mahajan-Miklos *et al.*, 1999; Pukatzki *et al.*, 2002; Rahme *et al.*, 1995). Chez l'homme, cette bactérie affecte particulièrement les personnes immunodéprimées, les grands brûlés et les patients en soins intensifs.

A l'hôpital, *P. aeruginosa* est responsable de 16 % des infections pulmonaires, de 12% des infections du tractus urinaires, de 8% des infections touchant les grands brûlés et de 10% des infections du sang (bactériémie et/ou septicémie). Cette bactérie est également une des causes majeures de mortalité et de morbidité chez les personnes atteintes de mucoviscidose (Emerson *et al.*, 2002; Govan et Harris, 1986). Ces patients développent une infection pulmonaire chronique qui conduit à une destruction des tissus pulmonaires par les toxines bactériennes. *P. aeruginosa* colonise les poumons et s'installe rapidement sous forme de biofilm, ce qui lui permet de résister aux défenses immunitaires de l'hôte et aux antibiotiques (Hoiby *et al.*, 2001).

2.5.2 Cas de *Pseudomonas fluorescens*

Les études portant sur l'incidence des infections à *P. fluorescens* sont rares. Cette espèce est encore peu recherchée du fait de sa psychrotrophie. De plus, la proximité taxonomique de certains biovars de cette espèce avec des biovars de l'espèce *P. putida* constitue un problème pour son identification (Bossis *et al.*, 2000; Feuilloley *et al.*, 2003). Toutefois, les capacités d'adaptation de *P. fluorescens* et son implication dans des infections chez l'homme ont été clairement démontrées.

P. fluorescens se comporte comme un agent opportuniste infectant des patients qui présentent un statut immunitaire affaibli (Burgos *et al.*, 1996; Pasargiklian *et al.*, 1996; Thangkhiew, 1986; Yamamoto *et al.*, 1991). Au niveau pulmonaire, elle a été décrite comme étant responsable d'infections des voies respiratoires chez des patients présentant un cancer du poumon (Yamamoto *et al.*, 1991). Des données cliniques indiquent également que l'exposition chronique à certaines souches de *P. fluorescens* induit une bronchopneumopathie chez des sujets non immunodéprimés (Bernstein *et al.*, 1995). Par ailleurs, *P. fluorescens* MF0 adhère *in vitro* de façon spécifique sur des cultures de lignées de pneumocytes humaines (Di Martino *et al.*, 2000)

La contamination de solutions de désinfection des lentilles de contact par *P. fluorescens* est à l'origine d'infections oculaires (Durban *et al.*, 1996). Grâce à son caractère psychrotrophe, cette espèce a la capacité de se multiplier au cours du stockage au froid des échantillons biologiques ou pharmaceutiques (Whyte *et al.*, 1999). *P. fluorescens* est responsable de nombreux cas de septicémies (Hejnár *et al.*, 1998; Hsueh *et al.*, 1998; Martino *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 1988). Elle est d'ailleurs placée parmi les espèces prédominantes dans les cas de septicémie post-transfusionnelle. Une contamination de la peau des donneurs par cette espèce pourrait être à l'origine de ces infections (Puckett *et al.*, 1992; Scott *et al.*, 1988). *P. fluorescens* a été identifiée comme responsable de 60% des cas enregistrés entre 1980 et 1989 en Grande Bretagne (Puckett *et al.*, 1992). Plusieurs septicémies décelées au sein d'un service pédiatrique ont pour origine la contamination de flacons d'héparine (Namnyak *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2002). Une septicémie à *P. fluorescens* peut s'accompagner, en plus du risque de choc septique, de lésions hépatiques létales chez le patient immunodéprimé (Rodriguez Ramirez *et al.*, 1989).

P. fluorescens provoque également des infections urinaires sporadiques chez les patients immunodéprimés (Osawa *et al.*, 2002), et colonise les voies urinaires en formant des microcolonies au niveau de la vessie (McLean et Nickel, 1991). Elle a également été identifiée dans un cas d'infection du pelvis liée à la pose d'un stérilet (Foulon *et al.*, 1981).

Enfin, elle pourrait être impliquée dans des ulcères du côlon ou des inflammations liées à la maladie de Crohn (Nakamura *et al.*, 2003).

3 Propriétés de virulence de *P. fluorescens*

Bien que de nombreux cas d'infections imputées aux *P. fluorescens* soient décrits, il n'existe pas ou peu de travaux décrivant les facteurs de virulence impliqués dans la pathogénie de cette espèce (Feuilloley *et al.*, 2003).

Comme *P. aeruginosa* (Figure 1), *P. fluorescens* produit pourtant un nombre important de facteurs pouvant intervenir dans les processus de colonisation et de multiplication et secrète des protéines qui peuvent être potentiellement toxiques pour les cellules hôtes.

3.1 Colonisation et multiplication

3.1.1 L'adhésion

L'adhésion de la bactérie à la cellule hôte peut se faire soit de manière spécifique (par le biais de récepteur membranaire) soit de manière non-spécifique (par exemple par des forces physico-chimiques). C'est la première étape dans le processus infectieux.

3.1.1.1 Fixation spécifique à la fibronectine

Au Laboratoire de Microbiologie du Froid, il a été montré que la souche MF0, une souche de *P. fluorescens* isolée du lait cru, possède une porine capable de se lier à la fibronectine humaine, un des composants majoritaire de la matrice extracellulaire des cellules épithéliales (Rebiere-Huet *et al.*, 2002).

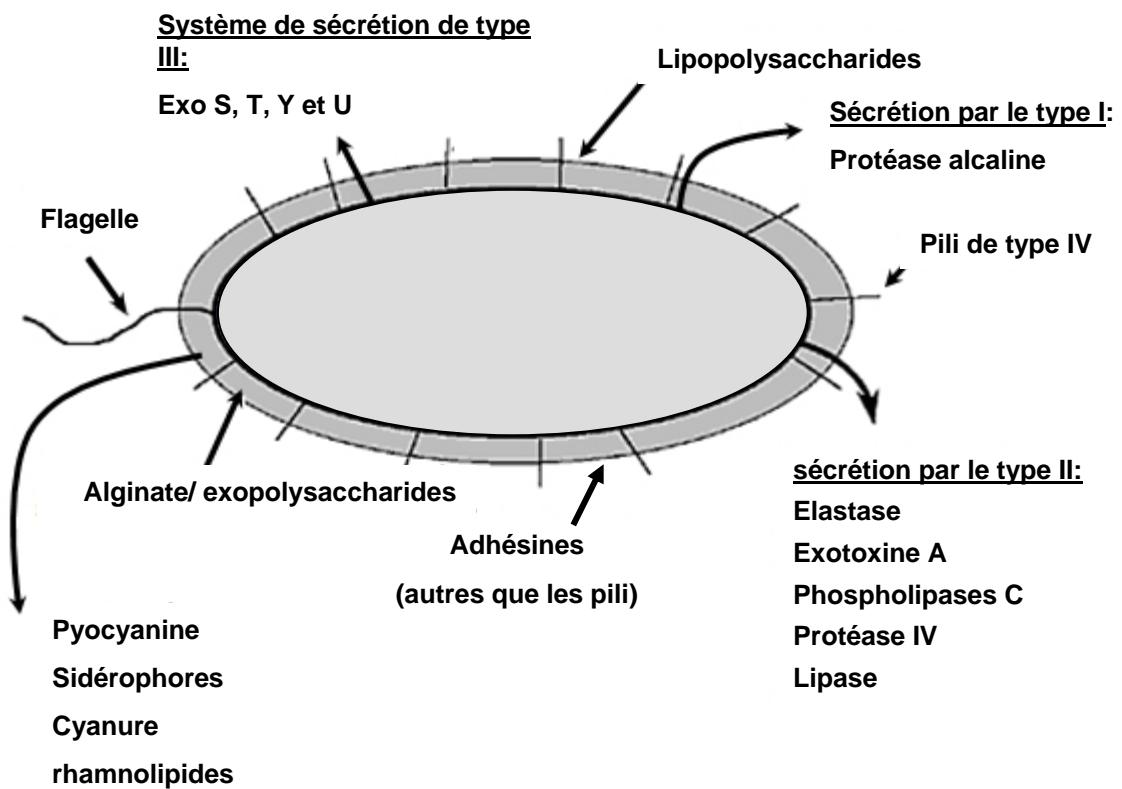


Figure 1: Facteurs de virulence de *P. aeruginosa* (adapté de Van Delden & Iglesias, 1998).

Des travaux réalisés sur des mutants non adhérents de la souche MF37, un mutant rifampicine spontané de MF0, suggèrent que le récepteur membranaire à la fibronectine est homologue à la protéine putative FadL de *P. aeruginosa* (de Lima Pimenta *et al.*, 2003).

Cette capacité d'adhésion semble jouer un rôle important dans le pouvoir pathogène de la bactérie puisque des mutants ne fixant plus la fibronectine humaine sont moins virulents chez le modèle *Drosophila melanogaster* (Pimenta *et al.*, 2006).

3.1.1.2 Les flagelles

Les flagelles interviennent dans la pathogénie des bactéries non seulement en tant qu'organelles assurant la mobilité et la dissémination de la bactérie, mais également en tant qu'adhésines favorisant l'invasion et la colonisation de l'hôte par la bactérie (Feldman *et al.*, 1998). Les flagelles sont impliqués dans la formation de biofilm. La participation des flagelles dans l'adhérence de *P. fluorescens* et la colonisation de la surface des cellules eucaryotes a été démontrée au niveau des cellules végétales (De Weger *et al.*, 1987).

3.1.1.3 Les pili de type IV

Plusieurs études réalisées *in vitro* et sur des modèles d'animaux, ont révélé que les pili sont des structures indispensables dans l'adhérence et l'invasion de *P. aeruginosa* et donc de sa virulence vis-à-vis de la cellule hôte (Comolli *et al.*, 1999). De la même façon, le pili de type IV favorise l'adhérence de *P. fluorescens* au niveau de cellules épithéliales de la cornée humaine (Reichert *et al.*, 1982). Des travaux réalisés au laboratoire ont montré l'existence de pili de type IV chez la souche MFY162, une *P. fluorescens* hospitalière (Guérillon, communication personnelle).

3.1.1.4 La synthèse d'exopolysaccharides

P. fluorescens synthétise et sécrète des exopolysaccharides dans son environnement (Schnider-Keel *et al.*, 2001). Ces exopolysaccharides acétylés assurent un enrobage de la bactérie dans une matrice constituant un glycocalyx fibreux, permettant la formation de microcolonies et favorisant le développement de biofilms sur les surfaces solides abiotiques (Allison *et al.*, 1998).

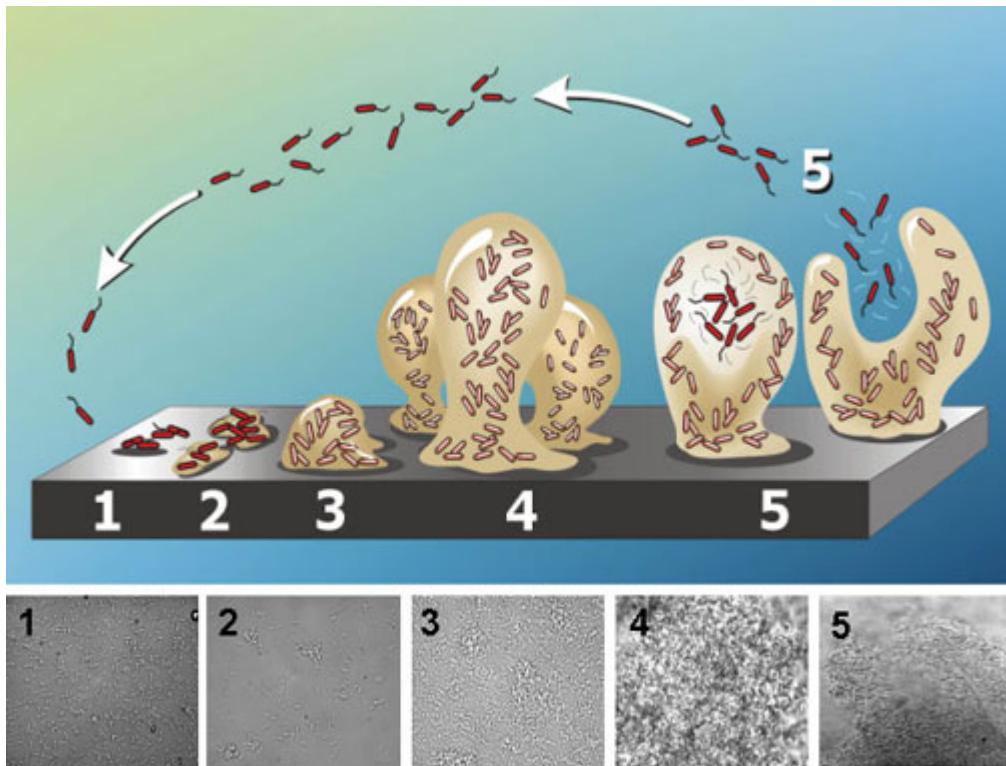


Figure 2: Modèle de formation du biofilm. Dans un premier temps, les bactéries se déplacent sous forme planctonique et adhèrent à la surface (1). Les bactéries se rassemblent et forment une microcolonie (2). Les cellules se différencient en biofilm (3), qui grandit et s'organise (4). Des cellules se détachent du biofilm (5) et reprennent une forme planctonique. (Source: <http://biology.binghamton.edu/davies/research.htm>)

Il est important de noter que certaines souches de *P. fluorescens* résistantes à la carbénicilline présentent une évolution spontanée vers un phénotype mucoïde, avec production d'un alginat acétylé de structure et de composition identiques à celui des variants mucoïdes de *P. aeruginosa* responsables d'infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose (Govan *et al.*, 1981). *P. fluorescens* est d'ailleurs occasionnellement retrouvée dans les poumons de patients souffrant de mucoviscidose, bien que son rôle en tant qu'agent pathogène ne soit pas encore élucidé (OECD, 1997).

3.1.2 La formation de biofilms

La plupart des micro-organismes favorisent un mode de vie où la population bactérienne se trouve fixée sur un support (état sessile) plutôt que libre et isolé dans le milieu environnemental (état planctonique). L'attachement sur une surface est une « stratégie de survie » qui permet à la bactérie de s'installer et de coloniser un environnement.

Après l'attachement sur un support, les bactéries vont mettre en place et développer une communauté organisée appelée biofilm. Ce dernier se définit comme une population bactérienne adhérée à une surface et enrobée d'une matrice d'exopolysaccharide. L'étape initiale d'attachement fait intervenir, en autre, la mobilité des flagelles qui permettent d'approcher la surface à coloniser (O'Toole et Kolter, 1998b). Toutefois, de récents travaux montrent que les flagelles ne seraient pas indispensables à la première étape d'adhésion (Klausen *et al.*, 2003). Dans un deuxième temps, une association stable s'établit avec la surface ou avec d'autres micro-organismes déjà présents (attachement irréversible). Ces rassemblements de bactéries conduisent à la formation de microcolonies dont la différenciation mène à l'élaboration du biofilm (Costerton *et al.*, 1999; Filloux et Vallet, 2003) (**Figure 2**).

Les microcolonies sont séparées par des canaux aqueux permettant, d'une part, d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions enfouies du biofilm, et, d'autre part, d'évacuer les déchets.

Les biofilms posent de nombreux problèmes, particulièrement en milieu hospitalier. Ils peuvent se former au niveau de cathéters ou d'implants (valves cardiaques, hanches artificielles), et attaquer des tissus corporels comme les dents, les yeux, les poumons, les oreilles ou le tractus urogénital (Costerton *et al.*, 1999). Ils

sont impliqués dans 65% des infections bactériennes (Chicurel, 2000) et permettent aux bactéries de mieux résister aux défenses immunitaires de l'hôte et aux antibiotiques (Reisner *et al.*, 2005).

La formation des biofilms est un mécanisme complexe et hautement régulé (Monds *et al.*, 2007). *P. fluorescens* est utilisée comme modèle dans certaines études dans le but d'identifier les acteurs intervenant dans les différentes étapes de la formation de cette structure (Hinsa *et al.*, 2003; O'Toole et Kolter, 1998a).

3.1.3 La production de biosurfactants

Les biosurfactants sont des molécules tensioactives produites par certains micro-organismes. Leur nature, tout comme leur pouvoir tensioactif, sont fortement dépendants du type de micro-organisme concerné. Ils peuvent intervenir dans l'adhésion des bactéries sur des surfaces abiotiques et être impliqués dans la formation des biofilms (Ron et Rosenberg, 2001).

P. aeruginosa sécrète des biosurfactants rhamnolipidiques thermostables. Les rhamnolipides sont des molécules amphiphiles constitués d'un sucre hydrophile (le rhamnose) rattaché à un corps lipidique hydrophobe. Ils interviennent dans la virulence de *P. aeruginosa* à différents niveaux : directement par une activité cytolytique sur les cellules ou indirectement en favorisant la colonisation bactérienne (Soberon-Chavez *et al.*, 2005).

Un complexe glucide-protéine-lipide, nommé AP-6, a été identifié chez la souche *P. fluorescens* 378 (Persson *et al.*, 1990). Toutefois, il apparaît que la majorité des biosurfactants produits par les *P. fluorescens* sont des cyclolipopeptides (CLP).

Ces composés sont constitués d'une chaîne carbonée (la partie hydrophobe) reliée à un peptide cyclique (la partie hydrophile), dont le nombre et la nature des acides aminés varient en fonction des CLP. La plupart des CLP actuellement identifiés sont produits par des souches de *P. fluorescens* provenant du sol ou de la rhizosphère (Nielsen *et al.*, 2000). Le premier CLP identifié chez cette espèce fut la viscosine. Ce CLP présente des caractéristiques communes à celles de puissants biosurfactants, comme la surfactine de *Bacillus subtilis* ou la tolaasine de *P. tolaasi* (voir partie II) (Meylheuc *et al.*, 2001).

La plupart de ces molécules, si ce n'est la totalité, possèdent des propriétés antibiotique et/ou antifongique et interviennent dans le biocontrôle des souches productrices (Haas et Defago, 2005). La viscosinamide, initialement identifiée chez la souche *P. fluorescens* DR54, inhibe la croissance des deux champignons phytopathogènes *Pythium ultimum* et *Rhizoctonia solani* (Nielsen et al., 1999). Une activité antifongique est également retrouvée pour la Massetolide A produit par la souche *P. fluorescens* R1SS101 (De Souza et al., 2003a), la tensine produit par la souche *P. fluorescens* 96.578 (Nielsen et al., 2000) et l'amphisine produit par la souche *P. fluorescens* DSS73 (Sorensen et al., 2001).

Enfin, la production d'amphisine par la souche *P. fluorescens* DSS73 intervient dans la mobilité de type swarming (Andersen et al., 2003). Il est possible que la production de CLP diminue la viscosité du milieu et favorise la mobilité bactérienne.

3.2 Effets toxiques

3.2.1 Les endotoxines

Le lipopolysaccharide (LPS) est un lipoglycane ancré dans le feuillet externe de presque tous les bacilles à Gram négatif. Il est constitué d'un domaine glycolipidique, le lipide A, lié par covalence à une unité polysaccharidique exposée en surface cellulaire et divisée en deux domaines distincts : un cœur oligosaccharidique et une chaîne externe antigénique, l'antigène O (Ag O) (Figure 3). L'importante variabilité dans la composition, la taille et la structure de l'Ag O, ainsi que la composition et le degré d'acylation du lipide A, modulent fortement la virulence des espèces et des souches (Lerouge et Vanderleyden, 2002).

Le LPS présente une forte activité proinflammatoire et joue un rôle majeur dans la virulence des bacilles à Gram négatif (Caroff et al., 2002; Trent et al., 2006). Au cours de la multiplication de la bactérie ou suite à sa mort, le LPS est libéré dans le milieu sous une forme libre ou complexée avec des protéines de membrane bactériennes. La liaison du LPS aux molécules de CD14 active les récepteurs TLR4 (Toll-Like-Receptor), agissant sur l'expression de certains gènes de l'immunité (Aderem et Ulevitch, 2000). La cellule cible, ainsi activée, stimule la libération de

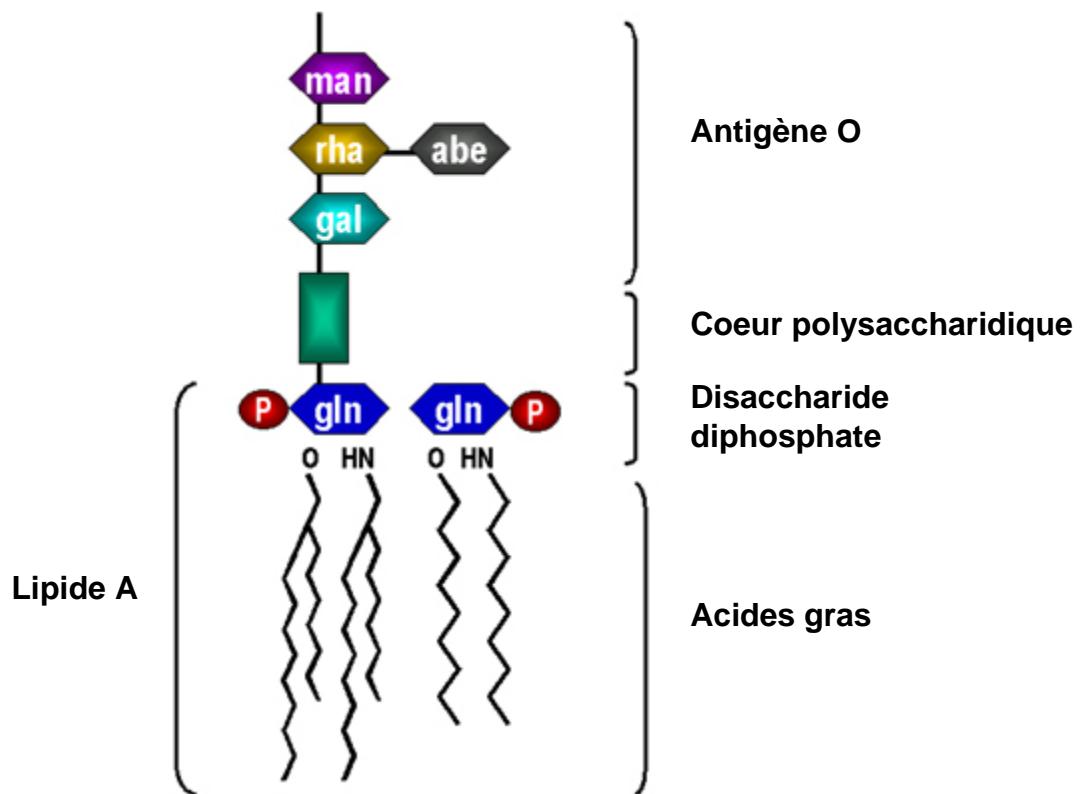


Figure 3: Structure du Lipopolysaccharide (LPS)

Quatre exotoxines (ExoS, ExoT, ExoU et ExoY) sont également sécrétées par le système de sécrétion de type III (SSTT) (voir chapitre 3.4.2). ExoT et ExoS sont des protéines bifonctionnelles qui possèdent une activité GAP spécifique des petites protéines G et une activité ADP ribosyltransférase (Barbieri et Sun, 2004; Krall *et al.*, 2000). ExoT et ExoS perturbent la transduction des signaux intracellulaires médiés par Ras ce qui aboutit, entre autre, à une modification du cytosquelette (Sundin *et al.*, 2004). ExoY est une adénylate cyclase et ExoU, l'effecteur le plus cytotoxique du SSTT de *P. aeruginosa*, possède une activité phospholipase de type A₂ (Sato *et al.*, 2005).

Parmi les exoenzymes synthétisées par *P. aeruginosa*, on distingue des phospholipases (voir chapitre 2), des lipases et plusieurs protéases : une élastase et une protéase alcaline (Yagci *et al.*, 2002), une collagénase (Wellisch *et al.*, 1984) et une protéase à sérine appelée protéase IV (Caballero *et al.*, 2001). Ces protéases favorisent l'invasion et la dissémination de la bactérie en provoquant la destruction des liaisons intercellulaires par hydrolyse des protéines de la matrice extracellulaire.

Certaines souches de *P. fluorescens* synthétisent des facteurs de virulence particulièrement toxiques, dont une exotoxine apparentée à l'exotoxine β de *Bacillus thuringiensis* (inhibitrice de l'ARN polymérase ADN-dépendante eucaryote) (Murty *et al.*, 1994). Les *P. fluorescens* produisent un nombre important d'enzymes dégradatives, qui ne sont pas elles-même considérées comme des « toxines », mais qui peuvent participer à la dissémination de la bactérie. Des souches de *P. fluorescens* sécrètent des protéases qui présentent une forte identité de séquence avec certaines protéases de *P. aeruginosa* (Koka et Weimer, 2000; Liao et McCallus, 1998), plusieurs lipases (Burini *et al.*, 1994) et des phospholipases C (Preuss *et al.*, 2001). Ces facteurs sont retrouvés chez *P. aeruginosa* où ils participent à la virulence de la souche.

3.2.3 Production de superantigène

P. fluorescens a été récemment associée aux lésions du colon dans la maladie de Crohn (Wei *et al.*, 2002). 54% des patients atteints de cette maladie présentent une réponse sérologique à l'antigène I2, protéine spécifique de l'espèce *P. fluorescens* (Nakamura *et al.*, 2003). Des études immunologiques réalisées chez la souris montrent que la protéine recombinante I2 possède une activité

superantigénique vis-à-vis des cellules T (Wei *et al.*, 2002). Dans la maladie de Crohn, la sur-stimulation persistante du système immunitaire devient chronique et provoque de graves anomalies anatomiques et fonctionnelles (Mow *et al.*, 2004).

3.2.4 La virulence par le système de sécrétion de type III (SSTT)

3.2.4.1 Caractères communs

Le système de sécrétion de Type III est présent chez de nombreux genres de bactéries à Gram négatif dont *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* et certains pathovars d'*Escherichia* (EPEC, EHEC) (Hueck, 1998). Activé par le contact avec la cellule eucaryote, ce système permet d'injecter des facteurs de virulence (appelés protéines effectrices) directement du cytoplasme de la bactérie dans le cytosol de la cellule cible, sans passage par le milieu extérieur. Ces effecteurs permettent aux bactéries pathogènes d'envahir les tissus de l'organisme ou de circonscrire les défenses immunitaires de l'hôte.

Souvent comparé à une seringue, le SSTT est très conservé au niveau structural entre les bactéries à Gram négatif (**Figure 4**) et présente de fortes homologies avec le flagelle bactérien.

Le SSTT est composé de deux structures :

- L'appareil de sécrétion, qui est un complexe protéique encastré dans les membranes bactériennes. Il permet la sécrétion des effecteurs spécialisés du SSTT du cytoplasme de la bactérie à l'extérieur sans transiter par le périplasme.
- L'appareil de translocation, encore appelé « aiguille », qui est un second complexe au niveau extra bactérien en contact avec l'appareil de sécrétion, s'insère dans la membrane de la cellule cible et permet l'injection des effecteurs toxiques spécifiques du SSTT.

C'est pourquoi on trouve souvent l'appellation de facteur de virulence pour désigner l'ensemble du SSTT.

radicaux libres oxygénés (O_2^- , H_2O_2 , NO), de chémokines, de cytokines proinflammatoires (TNF α , IL-1, IL-6, IL-8) et de lipides (Heumann et Roger, 2002). Les effets potentialisateurs de ces médiateurs, visant initialement à endiguer l'infection, peuvent conduire à des conséquences délétères sur le système cardiovasculaire et entraîner un choc septique (Van Amersfoort *et al.*, 2003).

Chez *P. aeruginosa*, en fonction de la présence et/ou de la nature de l'antigène O, les souches sont plus ou moins résistantes à la phagocytose dirigée par le complément. Chez les personnes atteintes de mucoviscidose, la capacité d'interaction du LPS avec la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) joue un rôle important dans la pathologie de *P. aeruginosa*. En effet, le CFTR semble jouer le rôle de récepteur bactérien, activant la réponse inflammatoire. En absence d'expression du CFTR (patient atteint de la mucoviscidose), ou lors d'une modification de l'Ag O, la réponse immunitaire est retardée, les bactéries ne sont pas éliminées ce qui facilite l'installation et la persistance du micro-organisme (Lyczak *et al.*, 2000).

L'effet toxique du LPS a également été démontré chez *P. fluorescens*. Lorsque *P. fluorescens* MF37 se fixe à la surface des cellules nerveuses et gliales, elle induit des changements morphologiques typiques de l'apoptose et de la nécrose cellulaire (Picot *et al.*, 2001). L'exposition des cellules corticales et gliales des neurones au LPS extrait de la souche MF37 reproduit en partie la cytotoxicité. Cependant, bien que le lipopolysaccharide libéré par la bactérie soit en partie responsable de cette cytotoxicité, les études suggèrent que d'autres facteurs sont impliqués dans le processus (Picot *et al.*, 2003; Picot *et al.*, 2004).

3.2.2 Toxines et exoenzymes cytotoxiques

Chez *P. aeruginosa*, les toxines interviennent principalement dans la dissémination de la bactérie et dans la perturbation ou la destruction du système immunitaire de l'hôte. L'exotoxine A est la plus cytotoxique des toxines produites par la bactérie. Sécrétée sous forme d'une pro-toxine inactive, elle est reconnue de façon spécifique par le LRP (LDL related protein) (Herz *et al.*, 1990). L'interaction avec le récepteur provoque le clivage de la pro-toxine et une internalisation de la partie active qui cible le facteur d'elongation EF2, perturbant ainsi la synthèse protéique.

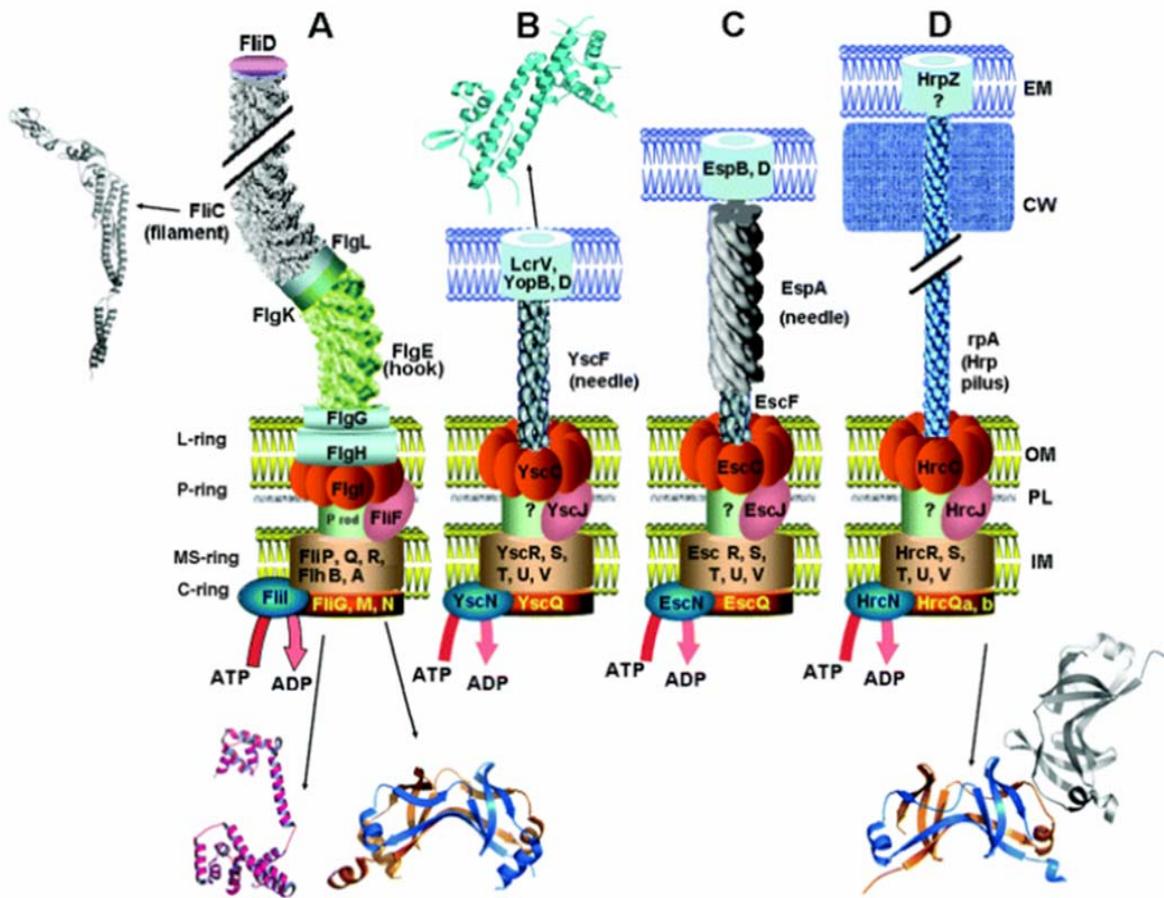


Figure 4: Modélisation de la structure du flagelle et des systèmes de sécrétion de type III de différentes bactéries à Gram négatif. A, structure du flagelle ; B, C, D, SSTT de *Yersinia*, de *E. coli* et de *P. syringae* respectivement. Seules les protéines conservées entre les différents SSTT (et leurs homologues chez le flagelle) sont représentées et identifiées par des couleurs et des positions similaires. Le « P rod » du flagelle n'a pas de protéine homologue connue chez les SSTT. Le point d'interrogation signifie qu'une structure de type canal au niveau de la membrane interne n'a pas encore été identifiée. Le constituant majeur de l'aiguille (needle ou Hrp pilus) est *YscF* chez *Yersinia*, *EspA* chez *E. coli*, *HrpA* chez *P. syringae*. Les protéines formant le pore dans la membrane eucaryote (EM) sont *LcrV*, *YopB*, *YopD* chez *Yersinia* et *EspB*, *D* chez *E. coli*. Chez le pathogène des plantes, *P. syringae*, *HrpZ* est supposée être la protéine translocatrice. Les protéines dont la structure a été caractérisée sont représentées de façon schématique. OM, membrane externe de la bactérie ; PL, peptidoglycane ; IM, membrane interne de la bactérie ; EM, membrane eucaryote ; CW, paroi cellulaire de la cellule végétale. (D'après Tampakaki, 2004)

Bien que la structure des différents SSTT soit similaire, ce facteur de virulence a évolué de façon particulière pour chaque espèce, affectant le mode d'interaction des bactéries avec la cellule cible et permettant différentes stratégies de pathogénie, allant de l'échappement au système immunitaire pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Yersinia spp*, à l'invasion des cellules pour *Salmonella spp*.

3.2.4.2 Le SSTT chez *Pseudomonas aeruginosa*

Chez *P. aeruginosa*, le SSTT induit une mort cellulaire de type nécrose des cellules de l'immunité innée (polynucléaires neutrophiles et macrophages) et permet ainsi à la bactérie d'échapper au système immunitaire. Sur les cellules épithéliales, le SSTT provoque une oncosé par une déstructuration du cytosquelette. Lors d'une infection pulmonaire, notamment chez les personnes atteintes de mucoviscidose, le SSTT joue un rôle prépondérant dans la phase initiale de colonisation et probablement dans la progression de l'infection (Vance *et al.*, 2005). Les protéines effectrices sécrétées par le système sont les toxines ExoU, ExoS, Exo T et ExoY présentées précédemment.

Certaines souches de *P. aeruginosa* sont incapables d'activer le SSTT, bien qu'elles possèdent l'ensemble des gènes nécessaires (et non mutés) et qu'elles se trouvent dans les conditions favorables d'activation. Ces souches ont été qualifiées de « non-inductibles ». Filopon *et al.* ont montré qu'une surexpression transitoire *en trans* de l'activateur transcriptionnel du SSTT, ExsA, permettait le passage d'un système « non-inductible » à un système inducible. Cette variation phénotypique impliquant le SSTT résulterait d'un mécanisme de régulation épigénétique d'ExsA (voir Partie III de la synthèse bibliographique) (Filopon *et al.*, 2006).

3.2.4.3 Le SSTT chez les *Pseudomonas fluorescens*

Un SSTT a été mis en évidence sur des souches rhizosphériques de *P. fluorescens*. Mazurier *et al.* ont montré que des gènes putatifs de SSTT étaient assez répandus chez les souches de *P. fluorescens* de la rhizosphère (Mazurier *et al.*, 2004). Ces gènes ne sont cependant pas retrouvés chez les deux souches de *P. fluorescens* dont le génome est entièrement séquencé (Pf0-1 et Pf5).

Le rôle exact et la fonctionnalité d'un SSTT chez *P. fluorescens* n'ont pas été étudiés en détails. L'injection par la souche *P. fluorescens* KD de protéines effectrices dans la plante hôte déclencherait la réponse d'hypersensibilité de la plante et augmenterait ainsi la résistance vis-à-vis de micro-organismes pathogènes (Rezzonico *et al.*, 2005).

Les souches de *P. fluorescens* issues du milieu hospitalier possèdent les gènes putatifs du SSTT et présentent également une forte activité hémolytique associée aux cellules. Des travaux sont actuellement en cours au sein du laboratoire afin de déterminer si cette activité résulte d'un système de sécrétion de type III.

L'activité hémolytique, qui est un facteur de virulence largement répandu chez les bactéries pathogènes, peut résulter de l'action d'hémolysines dites « structurales » (le SSTT) ou d'hémolysines sécrétées, qui peuvent éventuellement être associées à la membrane.

Le chapitre suivant présente les différentes classes d'hémolysines sécrétées actuellement répertoriées.

Partie II : Les toxines bactériennes membranolytiques sécrétées

1 Définition

Les toxines bactériennes membranolytiques sont généralement mises en évidence grâce à leur capacité à lyser les érythrocytes *in vitro*, d'où leur nom d'hémolysines, mais un grand nombre d'entre elles agissent également sur d'autres cibles cellulaires. Elles sont qualifiées de membranolytiques car elles ont pour propriété de dégrader ou de désorganiser les membranes cytoplasmiques, provoquant l'altération de l'activité physiologique cellulaire, voire la destruction de la cellule par rupture physique de la membrane, d'où leur autre nom de cytolysines.

D'un point de vue cellulaire, les hémolysines peuvent être à l'origine d'effets variables : déclenchement de l'apoptose par la cellule cible, perturbation des défenses immunitaires non-spécifiques et spécifiques, ou encore la dérégulation de système physiologique (comme la transduction membranaire) (Alouf, 2000a; Titball, 1993).

Leur rôle principal serait de permettre à la bactérie d'acquérir du fer dans un microenvironnement déficient, mais certaines sont devenues des facteurs de virulence redoutables (Alouf, 2000a; Alouf, 2000b; Rowe et Welch, 1994).

Trois classes d'hémolysines sont actuellement répertoriées : les toxines formant des pores au sein de la membrane de la cellule cible, les toxines à activité détersive et les toxines à activité enzymatique.

2 Les hémolysines formant des pores membranaires ou pore-forming toxin (PFT)

Les PFT ont été identifiées chez de nombreux organismes comprenant les bactéries, les plantes, les champignons et les animaux et peuvent montrer, dans certains cas, des homologies de structure et/ou de fonctionnement malgré la distance évolutive (Menestrina *et al.*, 2001).

Chez les bactéries, le groupe des PFT constitue le groupe majoritaire des toxines caractérisées (Alouf, 2000a). Le mécanisme global des PFT consiste en l'insertion des molécules de toxines dans la bicoche lipidique de la membrane

cytoplasmique, suivie d'une oligomérisation des molécules de toxines qui entraîne la formation de canaux ou pores (Alouf, 2003; Hughson, 1997). Le pore est constitué par l'assemblage des toxines dans une structure amphiphile avec une face hydrophobe exposée vers la membrane et une face hydrophile qui borde le canal (Alouf, 2000a).

Il existe trois « familles » de PFT (RTX, aerolysine-like et toxine liant le cholestérol) dont les principales caractéristiques sont présentées dans le **tableau 3**.

P. aeruginosa produit une cytotoxine (CTX) qui appartient à la famille des aerolysine-like. Le gène codant cette toxine est situé dans une région correspondant à l'intégration d'un phage tempéré. Il s'agit d'une protéine de 29 kDa synthétisée sous forme de pro-toxine de 31,7 kDa (pro-CTX) associée à la cellule (Ohnishi *et al.*, 1994). La structure primaire de la protéine présente de nombreux feuillets-β antiparallèles et rappelle celle de l'α-toxine de *St. aureus*. Cependant le pore formé par CTX n'est pas un heptamère mais un pentamère de 145 kDa (Sliwinski-Korell *et al.*, 1999).

CTX présente une activité létale chez la souris et une cytotoxicité importante vis-à-vis des leucocytes et différents types cellulaires (Hayashi *et al.*, 1989; Lutz *et al.*, 1993), mais ne présente pas d'activité hémolytique vis-à-vis des érythrocytes humains (Sliwinski-Korell *et al.*, 1999).

Actuellement, aucune PFT n'a été identifiée chez *P. fluorescens*.

3 Les hémolysines à activité détersive

Les toxines à activité détersive sont des molécules amphiphiles. Cette propriété leur permet de solubiliser les membranes cytoplasmiques par une action détergente. L'activité détersive de la toxine dépend directement de la structure de la protéine. Il arrive parfois qu'une même toxine présente deux activités cytotoxiques distinctes, mais finalement synergiques.

La bactérie pathogène de champignons *P. tolaasii* sécrète une toxine peptidique de 1985 Da impliquée dans la maladie de la tache brune, la tolaasine (Rainey, 1991). La tolaasine est une toxine doublement efficace car sa structure présente des

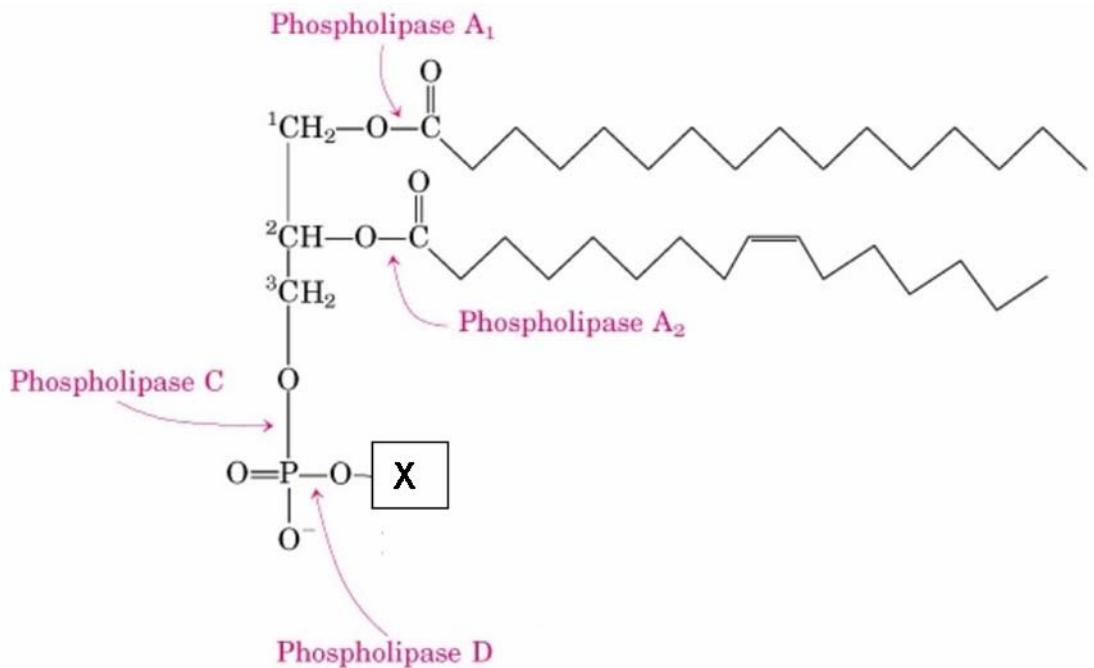


Figure 5: Schéma des différents sites de clivage des phospholipides par les phospholipases. X : groupement polaire. Les flèches indiquent les sites de clivage des différentes enzymes.

propriétés de surfactants, et lui permet également de former des pores membranaires (Cho *et al.*, 2007).

Ceci est également le cas de la surfactine de *B. subtilis*, un cyclolipopeptide anionique d'environ 1000 Da. Ce biosurfactant forme des canaux anioniques dans la bicoche membranaire. Les charges négatives portées par la molécule se lient avec des cations métalliques, ce qui provoque la micellisation de la molécule et optimise l'interaction avec la membrane des érythrocytes (Meylheuc *et al.*, 2001).

4 Les hémolysines à activité enzymatique

Ces hémolysines regroupent essentiellement des phospholipases. Celles-ci sont des enzymes largement répandues, à la fois chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Titball, 1993). La fonction des phospholipases est très variable, allant de la digestion de nutriments (acquisition du phosphate et source de carbone) à la formation de molécules bioactives (Istivan et Coloe, 2006). Chez les bactéries pathogènes, elles peuvent avoir un rôle central dans la mise en place de l'infection et sont généralement considérées comme facteur de virulence important (Schmiel et Miller, 1999; Songer, 1997). Elles agissent en dégradant les phospholipides membranaires, ce qui provoque une déstructuration de la membrane cytoplasmique.

4.1 Classification

Les phospholipases sont classées en fonction du site de clivage du phospholipide (**Figure 5**).

Les phospholipases A hydrolysent la fonction acide gras au niveau de la fonction alcool primaire (PLA_1) ou secondaire (PLA_2) du glycérol, libérant un acide gras (l'acide arachidonique) et un lysophospholipide. Les phospholipases qui possèdent les deux activités PLA_1 et PLA_2 sont nommées PLB. Les PLC et PLD hydrolysent le phospholipide au niveau du groupement phosphate (**Figure 5**). PLD lyse la fonction ester entre la fonction acide du phosphate et l'alcool, libérant un phosphatidate et un alcool tandis que les PLC hydrolysent en amont du groupement phosphate et libère un diglycéride (le DAG) et un phosphoalcool.

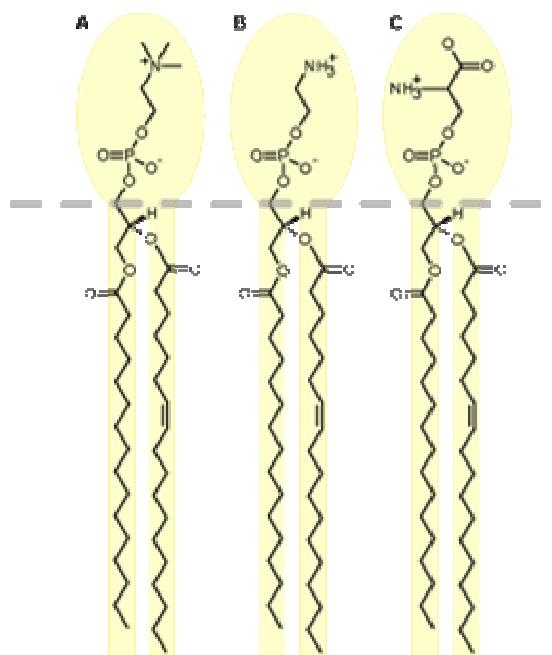


Figure 6: Représentation schématique de quelques phospholipides.

A-phosphatidylcholine (ou lécithine)

B-phosphatidyléthanolamine

C- phosphatidylsérine.

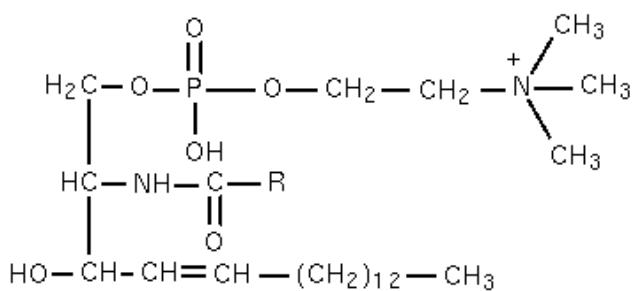


Figure 7: Structure de la sphingomyéline.

Les sphingomyélinases hydrolysent la sphingomyéline au niveau du site de clivage de la PLC et sont parfois assimilées à ce groupe de phospholipases (Titball, 1993).

4.2 Spécificité de substrat et efficacité d'hydrolyse

La nature du groupement polaire (**Figure 5, X**) influence la capacité d'hydrolyse des enzymes et joue directement sur leur pouvoir cytolytique (Schmiel et Miller, 1999). Le groupement polaire est soit la choline, l'éthanolamine, l'inositol ou la sérine et donne respectivement la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylinositol (PI) ou la phosphatidylsérine (PS) (**Figure 6**).

Les sphingomyélinases hydrolysent la sphingomyéline (SM), un triglycéride auquel sont rattachés la sphingosine sur le carbone primaire et un groupement phosphocholine sur le carbone ternaire (**Figure 7**).

La longueur et la nature de la chaîne carbonée sont également importantes pour la reconnaissance et/ou l'activité de l'enzyme (phosphatidylcholine *versus* sphingomyéline par exemple) (Schmiel et Miller, 1999). La composition des membranes cibles varie en fonction des espèces ou des organes concernés. Les membranes de la majorité des cellules eucaryotes sont préférentiellement composées de PC et de SM dans la partie externe de la membrane et de PI, PE et PS dans la partie interne (Istivan et Coloe, 2006). Les propriétés cytolytiques des phospholipases sont donc directement reliées à leur capacité à reconnaître et à hydrolyser, dans un premier temps, les substrats de la membrane externe de la cellule cible (Istivan et Coloe, 2006; Schmiel et Miller, 1999; Titball, 1993). Il arrive donc que des phospholipases qui présentent des spécificités de substrat différentes agissent en synergie (Schmiel et Miller, 1999).

Par conséquent, les études de capacité d'hydrolyse de substrats solubles *in vitro* ne permettent pas d'évaluer le potentiel cytotoxique de l'enzyme. La méthode la plus courante pour évaluer cette cytotoxicité est l'hémolyse.

Tableau 4: Participation des phospholipases à la virulence bactérienne

Espèce	classe de la PL	Cytokines/ Eicosanoïdes	propriétés	références
		Libérées		
<i>Bacillus cereus</i>	PLC		Hémolytique avec la sphingomyélinase	Michelet 2003
<i>Campylobacter coli</i>	PLA2		Hémolytique, mutant déléte non hémolytique	Istivan 2006
<i>Clostridium perfringens</i>	PLC (α -toxine)	IL-8, TNF- α , PAF	Facteur de virulence principal de la gangrène gazeuse. Cytolyse et destruction tissulaire, tue les leucocytes. La toxine purifiée induit le choc septique, la nécrose chez l'animal, et induit la cascade de l'acide arachidonique	Schmiel 1999
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	PLD		La protéine purifiée est dermonécrotique et létale. Facteur primordial à la formation d'abcès chez l'animal, interfère avec les neutrophiles et augmente la perméabilité vasculaire	Yozwiak 1993
<i>Helicobacter pylori</i>	PLA2		Participe à la destruction du mucus gastrique. Les lysophospholipides produits sont cytolytiques	Istivan 2006
<i>Listeria monocytogenes</i>	PlcA		Participent à l'invasion des macrophages et à la dissémination de la bactérie	Gründling 2003
	PlcB			
<i>Staphylococcus aureus</i>	PLC (β -toxine)		Hémolytique, cytotoxique pour les cellules épithéliales et les monocytes	Schmiel 1999
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	PLA		hémolytique	Alouf, 2000
<i>Yersinia enterocolitica</i>	PLA		Le mutant yplA montre une baisse de colonisation des tissus, de l'inflammation et de l'effet nécrotique chez la souris	Schmiel 1998
<i>Yersinia pestis</i>	PLD (Ymt)		Toxine murine	Hinnebusch 2002
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PLC	IL-8, thromboxanesl eucotriènes	Hémolytique (PlcH), destruction tissulaire	Konig 1997
	PLA ₂ (ExoU)		Effecteur le plus cytotoxique du SSTT	Sato 2003

4.3 Cytotoxicité des phospholipases

En plus de l'effet « mécanique » opéré sur la membrane, les produits libérés après l'hydrolyse des phospholipides participent à la toxicité de l'enzyme et provoquent parfois d'importantes perturbations physiologiques.

L'acide arachidonique, libéré après l'action des PLAs et PLCs, est un élément précurseur de la synthèse des eicosanoïdes, molécules à l'origine d'une modulation locale de la réponse immunitaire. Lorsque cette réaction inflammatoire devient trop importante, l'hôte peut subir un choc septique.

Le DAG libéré par l'action de PLCs contrôle l'activation de la protéine kinase C, qui est impliquée dans un nombre important de processus cellulaires (croissance, activation des neutrophiles et des macrophages) (Schmiel et Miller, 1999; Songer, 1997).

Enfin, certaines phospholipases peuvent induire les molécules de l'immunité telles que les cytokines (IL-8, TNF- α , PAF), ce qui provoque une « sur-stimulation » du système immunitaire (Schmiel et Miller, 1999).

4.4 Implication des phospholipases dans la virulence bactérienne

Les phospholipases participent à la virulence d'un nombre important de pathogènes (**Tableau 4**). Bien que leur implication dans la pathogénie de ces bactéries ait été établie et que les enzymes soient identifiées, le rôle exact et surtout le mécanisme d'action *in vivo* ne sont pas encore clairement élucidés.

Les PLD sont très rarement rencontrées chez les procaryotes mais lorsqu'elles sont présentes, elles jouent obligatoirement un rôle dans la virulence. Récemment, une PLD a été mise en évidence chez *P. aeruginosa*. Elle permettrait au pathogène de persister dans l'organisme lors d'infections pulmonaires chroniques (Wilderman et al., 2001).

Les phospholipases impliquées dans la pathogénie bactérienne les plus fréquemment retrouvées sont les phospholipases A₍₂₎ et les phospholipases C.

5 Les phospholipases C bactériennes (PLC)

Les phospholipases C (PLCs) sont certainement les phospholipases les plus étudiées. De nombreux travaux ont été entrepris principalement *in vitro* dans le but de comprendre leur mécanisme d'action *in vivo*. Les comparaisons de séquences, de spécificité de substrats, de cibles cellulaires permettent d'établir une relation structure-fonction de ces enzymes. Actuellement, au moins trois classes de PLCs sont répertoriées. Les phospholipases C hydrolysant le phosphatidylinositol (les PI-PLC) représentent un groupe à part de PLCs et ne seront pas traitées dans ce chapitre (pour revue (Griffith et Ryan, 1999)).

5.1 Les différentes classes de PLC

5.1.1 Les Zinc-métallophospholipases C produites par les bactéries à Gram-positif

Les PLCs des bactéries à Gram-positif sont des métallo-enzymes à zinc dont l'activité est réversiblement inhibée par l'EDTA ou l'*o*-phénanthroline (Titball, 1993). Elles sont particulièrement sensibles au D609, un inhibiteur spécifique des PLCs (Amtmann, 1996). L'α-toxine de *C. perfringens*, la PC-PLC de *B. cereus* et les PLCs de *Listeria monocytogenes* sont les enzymes les plus étudiées.

5.1.1.1 Les PLC chez *Clostridium*

La production de PLCs est largement répandue chez le genre *Clostridium* (Jepson et Titball, 2000). L'α-toxine produite par *C. perfringens* fait l'objet de nombreuses investigations depuis des années (Jepson et Titball, 2000). Son rôle dans la virulence, particulièrement au niveau de la gangrène gazeuse, a été largement démontré. Elle est hémolytique, létale, dermonécrotique et provoque une augmentation de la perméabilité vasculaire et l'aggrégation des plaquettes (Titball, 1993).

L'α-toxine est une protéine de 371 acides aminés et de 43 kDa. Elle peut hydrolyser différents substrats : la PC, la SM, la PS et la lysophosphatidylcholine. L'hydrolyse de la PC est réalisée de manière indépendante par la partie N-terminale de la protéine, tandis que la cytotoxicité de l'enzyme (hémolyse et létalité) ainsi que

l'hydrolyse de la SM nécessitent la protéine complète et native (Songer, 1997). La partie C-terminale jouerait un rôle majeur dans le processus d'interaction avec les phospholipides membranaires via un site de liaison au Ca^{2+} . Jepson et Titball proposent que les différences de cytotoxicité observées entre les PLCs produites par les *Clostridium* résultent en partie des variations de séquences retrouvées dans la partie C-terminale.

5.1.1.2 Les PLC chez le groupe de *Bacillus cereus*

Le groupe de *B. cereus* est composé d'une grande variété de bactéries réparties en plusieurs espèces, dont les trois plus connues sont : *B. cereus* s.s (*sensus stricto*), *B. anthracis* et *B. thuringiensis* (Michelet et Mahillon, 2003). Certaines souches de *B. cereus* s.s sont des pathogènes stricts fréquemment impliqués dans les toxi-infections alimentaires et parfois responsables d'infections nosocomiales. *B. thuringiensis* est un entomopathogène (pathogène des insectes) tandis que *B. anthracis* est un pathogène strict de l'homme et des mammifères responsable de l'anthrax. Malgré un spectre d'hôte large et différent, ce groupe possède des facteurs de virulence potentiels communs (Pomerantsev *et al.*, 2003).

B. cereus et *B. thuringiensis* produisent trois phospholipases de spécificité de substrats différentes, dont une PI-PLC. La sphingomyélinase (SM-PLC) clive spécifiquement les sphingolipides tandis que la phosphatidylcholine phospholipase (PC-PLC) est une phospholipase C à spectre large qui clive la phosphatidylcholine, la phosphatidylséristine et la phosphatidyléthanolamine (Martin *et al.*, 2000). La PC-PLC est la première phospholipase C à avoir été cristallographiée.

Les gènes codant ces enzymes sont également localisés sur le chromosome de *B. anthracis* mais ne sont pas exprimés (Pomerantsev *et al.*, 2003).

SM-PLC est une protéine de 34 kDa de 306 acides aminés qui présente une activité hémolytique de type « hot-cold hemolysis ». L'enzyme lyse les érythrocytes riches en sphingomyéline, et l'activité est révélée après un passage au froid. Cette activité est renforcée en présence d'ions Mg^{2+} et nécessite la présence d'ions Ca^{2+} (Michelet et Mahillon, 2003). La PC-PLC est une zinc-métalloprotéine de 28,5 kDa. Elle présente une forte homologie avec l'a-toxine de *C. perfringens* mais ne possède ni activité hémolytique ni propriété létale. Cette différence de cytotoxicité est

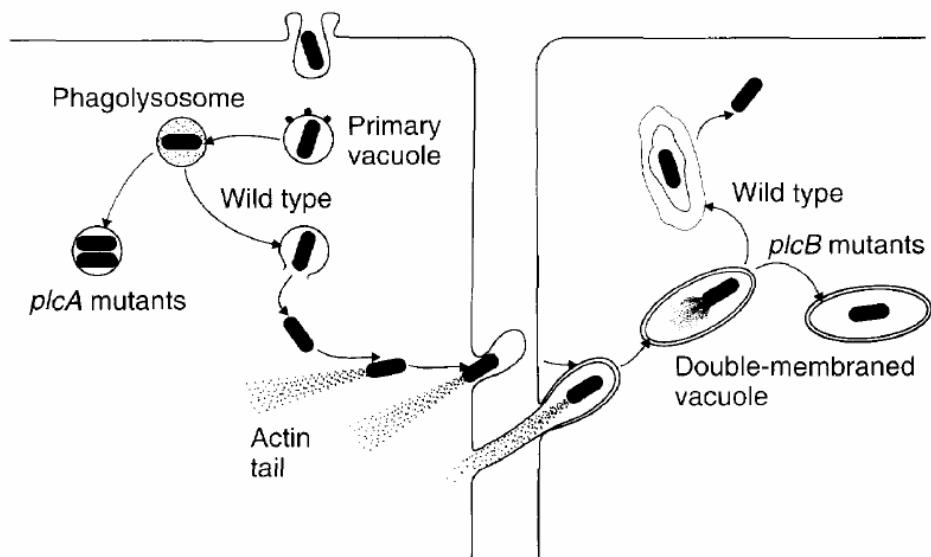


Figure 8: Mécanisme de colonisation intracellulaire de *L. monocytogenes*. PlcA intervient dans la lyse du phagosome ou de la vacuole phagocytique, dont les membranes sont riches en phosphatidylinositol, tandis que PlcB, à spectre large, permet la lyse de double membrane vacuolaire. D'après Songer, 1997.

probablement due à la partie C-terminale de l'α-toxine, absente chez *B. cereus* qui produit une PLC plus petite (Titball, 1993).

L'association des deux enzymes, SM-PLC (CerB) et PC-PLC (CerA), donne une cytolysine efficace contre les érythrocytes humains appelée la céréolysine AB.

Actuellement, aucune étude ne peut établir avec certitude l'implication réelle de ce complexe dans la virulence des souches. En effet, *B. cereus* présente des effets nécrotiques sur les tissus, impliquant très certainement des toxines membranolytiques. Cependant, le nombre de toxines répertoriées étant assez conséquent, la cytotoxicité observée reste multifactorielle.

5.1.1.3 Les PLC chez *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est un pathogène intracellulaire facultatif. Elle produit deux PLCs et une toxine formant des pores (PlcA/PlcB et la listériolysine O, respectivement) qui participent en synergie au processus d'invasion des cellules hôtes avoisinantes, sans passage par le milieu extracellulaire (Grundling *et al.*, 2003).

PlcA, qui hydrolyse préférentiellement le PI, permet à la bactérie d'échapper au phagosome dans les macrophages. La bactérie libérée va infecter la cellule voisine en formant une vacuole à double membrane (Figure 8). Dans la cellule voisine, PlcB lyse la double membrane de la vacuole, en synergie avec la listériolysine O, et libère ainsi la bactérie dans le cytoplasme où elle va se multiplier.

PlcB présente une spécificité de substrat large (hydrolyse de PE, PS, sphingomyéline et PC) ce qui permet à *L. monocytogenes* de coloniser un nombre important de types cellulaires (macrophages, fibroblastes, cellules épithéliales) (Schmiel et Miller, 1999). Les PLCs sont des facteurs essentiels à la virulence de *L. monocytogenes*. Un double mutant *plcA/plcB* est 500 fois moins efficace à la dissémination que la bactérie mutée dans le gène codant la listériolysine O (Songer, 1997).

5.1.1.4 Le cas particulier de la phospholipase C *PlcB* de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa produit deux phospholipases C (PlcH et PlcN) qui présentent des caractéristiques très différentes de celles des zinc-métallophospholipases C (voir paragraphe suivant).

Cependant, Vasil *et al.* ont récemment montré que la bactérie produisait une troisième PLC, PlcB, qui serait impliquée dans la mobilité de type twitching sur un gradient de PE ou de PC (chémotactisme) (Barker *et al.*, 2004). PlcB ne présente aucune homologie de séquence vis-à-vis de PlcH et PlcN. Une partie de la séquence de la protéine (~60 aa sur 328), correspondant au site catalytique, est similaire aux métallophospholipases C à zinc, laissant supposer que les protéines ont évolué différemment à partir d'un ancêtre commun. La présence de résidus Histidine dans cette région « conservée », responsables de la liaison au zinc, apparaît essentielle à l'activité enzymatique de PlcB.

L'implication de cette troisième phospholipase dans la pathogénie de la souche reste hypothétique. D'après Barker *et al.*, PlcB pourrait intervenir dans la colonisation des poumons de patients atteints de mucoviscidose, où le taux de PC et de PE est particulièrement élevé comparé aux poumons « sains ».

5.1.2 La classe des PLC hydrolysant préférentiellement la phosphatidylcholine (PC-PLC)

5.1.2.1 Propriétés générales

Les PC-PLC représentent une nouvelle classe de phospholipases C hydrolysant préférentiellement la phosphatidylcholine. Proposé par Stonehouse en 2002, elle regroupe les PLCs produites majoritairement par des bactéries à Gram-négatif, la phospholipase-type du groupe étant la phospholipase C, PlcH, produite par *P. aeruginosa* (Stonehouse *et al.*, 2002). Des comparaisons de séquences montrent une proximité avec la superfamille des phosphatases, mais aucune homologie de structure avec les zinc-métallophospholipases C des bactéries à Gram-positif n'est retrouvée.

Les différences de propriétés entre les deux classes sont nombreuses (**Tableau 5**). Certaines d'entre elles, comme l'effet des ions et du D609 sur leur activité biologique, suggèrent que le site actif des enzymes fonctionne différemment.

5.1.2.2 *Les phospholipases C de *P. aeruginosa**

Les phospholipases C produites par *P. aeruginosa* font l'objet de nombreuses investigations depuis presque 30 ans. *P. aeruginosa* sécrète une phospholipase C thermosensible qui possède une activité hémolytique, PlcH. Une seconde PLC a été identifiée et baptisée PlcN (pour PLC non-hémolytique). PlcH et PlcN sont des protéines homologues (40% d'identité) dont les gènes sont localisés à des endroits différents sur le chromosome. Elles présentent des spécificités de substrats différentes : PlcH hydrolyse la PC et la SM tandis que PlcN clive la PC et la PS (Titball, 1993).

Le rôle de PlcH dans la pathogénie de *P. aeruginosa* a été démontré à plusieurs reprises (Darby *et al.*, 1999; Rahme *et al.*, 2000). La protéine a été détectée *in vivo* par un dosage immunologique chez des patients atteints d'infection pulmonaire (Songer, 1997). Au niveau des poumons, la sécrétion de PlcH permettrait à la bactérie de dégrader les surfactants pulmonaires, riches en PC, ce qui favoriserait la colonisation bactérienne.

Voulhoux *et al.* ont bien établi que PlcH était sécrétée par le système général de sécrétion (ou système à deux composantes), et plus particulièrement par le système Tat (twin-arginine-translocase) (Voulhoux *et al.*, 2001). La protéine, qui présente un motif TAT dans la partie N-terminale, est prise en charge par ce système pour le passage à travers la membrane interne. Le passage de la membrane externe est ensuite relayé par le système Sec-dépendant.

Cependant, de nombreux points doivent encore être éclaircis. La sécrétion de la protéine dans le milieu extracellulaire nécessite la présence des protéines chaperonnes PlcR_{1,2}, dont les gènes sont localisés sur l'opéron *plcH*. PlcR₁ est une protéine de 207 acides aminés et possède une séquence signal. PlcR₂ est complètement identique à PlcR₁, mais possède une séquence plus courte (151 aa) sans peptide signal. L'association de PlcH avec l'une ou l'autre des chaperonnes influencerait la localisation finale de l'enzyme. PlcH est retrouvée à la fois au niveau de vésicules membranaires (Kadurugamuwa et Beveridge, 1997) et sous forme de

protéine soluble complexée à PlcR₂ dans le milieu extracellulaire (Stonehouse *et al.*, 2002). PlcR₂ n'interviendrait pas seulement en tant que chaperonne mais jouerait un rôle important pour l'activité enzymatique et biologique de PlcH.

5.1.3 Les phospholipases C de *Legionella pneumophila*

Différents travaux reportent la production de PLC par des souches de *L. pneumophila*. *L. pneumophila* est un agent pathogène intracellulaire responsable de la maladie du Légonnaire, dont les principaux symptômes sont de graves infections pulmonaires (Titball, 1993).

La PLC sécrétée par la souche *L. pneumophila* Dallas 1E a été purifiée et partiellement caractérisée (Baine, 1988). La protéine présente une masse moléculaire d'environ 50 kDa, hydrolyse préférentiellement la PC mais n'est pas hémolytique vis-à-vis des érythrocytes de chien, pourtant riches en PC. Son activité enzymatique est inhibée par la présence de zinc et stimulée par celle d'EDTA (Baine, 1988). Les comparaisons de séquence montrent que la protéine est proche d'une phospholipase C produite par *P. fluorescens* (Titball, 1993), mais aucun lien avec les zinc-métallophospholipases C ou les PC-PLCs n'est retrouvé.

Aragon *et al.* en 2002 ont identifié le gène *plcA* codant la PLC chez la souche *L. pneumophila* 130b et montré que l'enzyme n'était pas indispensable au processus d'infection de la bactérie (Aragon *et al.*, 2002).

La sécrétion de la PlcA impliquerait le système de sécrétion Tat. La souche 130b mutée dans le gène *tatB* présentait une diminution de l'activité PLC de l'ordre de 30% par rapport à la souche sauvage (Rossier et Cianciotto, 2005). Rossier *et al.* suggèrent que le système Sec prend le relais lorsque la sécrétion Tat est déficiente. La baisse d'activité PLC observée pourrait également découler de l'absence de sécrétion d'une seconde PLC encore non identifiée.

5.1.4 Les PLCs produites par *Pseudomonas fluorescens*

Plusieurs phospholipases C produites par des souches de *P. fluorescens* ont été décrites. Des gènes codant des phospholipases C putatives sont également retrouvés chez les *P. fluorescens* dont le génome est séquencé, Pf0-1 (2 PLC putatives), Pf-5 (4 PLC putatives) et SBW25.

P. fluorescens ayant toujours été considérée comme une espèce à faible potentiel de pathogénie, le pouvoir pathogène des PLCs n'a jusqu'à maintenant jamais été recherché. Les différentes études reportées à ce jour concernent majoritairement des caractérisations biochimiques et/ou moléculaires de l'enzyme.

Le **tableau 6** regroupe l'ensemble des caractéristiques biochimiques des différentes enzymes, lorsque celles-ci ont été recherchées.

Les PLCs des *P. fluorescens* présentent des masses moléculaires comprises entre 30 et 40 kDa environ (Crevel *et al.*, 1994; Ivanov *et al.*, 1996; Preuss *et al.*, 2001; Stepaniak *et al.*, 1987). La spécificité de substrat varie en fonction de la souche concernée, mais les PLCs semblent pouvoir hydrolyser différents substrats, avec une efficacité variable (Crevel *et al.*, 1994; Doi et Nojima, 1971; Ivanov *et al.*, 1996; Preuss *et al.*, 2001). Ce sont toutes des métallophospholipases C (cette propriété n'a pas été publiée pour CHA0). La présence de Zn^{2+} et de Ca^{2+} est nécessaire à l'activité de la plupart des souches. Le Mg^{2+} accroît également l'activité de la PLC produite par la souche D (Ivanov *et al.*, 1996).

A-3-I produit une phospholipase C instable à la congélation et à la chaleur (Doi et Nojima, 1971). La PLC décrite par Crevel est, quant à elle, relativement thermostable puisque qu'elle conserve 30% d'activité après un chauffage de 5 min à 100°C.

L'activité hémolytique des enzymes a été testée sur différents types d'érythrocytes. La PLC de la souche A-3-I est non hémolytique vis-à-vis des hématies de cheval et de mouton (Doi et Nojima, 1971). La PLC de la souche D montre une activité hémolytique vis-à-vis des hématies de souris ou de lapin, mais pas de mouton. L'activité hémolytique de la PLC de la souche D nécessite la présence des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} (Ivanov *et al.*, 1996). La souche CHA0 présente également une activité hémolytique sur gélose au sang, mais la corrélation avec la PLC n'est pas établie (Sacherer *et al.*, 1994).

La caractérisation moléculaire de la PLC décrite par Preuss montre que la protéine ne présente aucune homologie avec les PLCs produites par les bactéries à Gram-positif et celles de la classe des PC-PLCs décrite par Stonehouse (Preuss *et al.*, 2001). Ces PLCs semblent représenter une classe distincte de phospholipases C.

Tableau 6: Caractéristiques biochimiques des PLCs produites par différentes souches de *P. fluorescens*

Souche	Masse moléculaire (kDa)	Spécificité de substrat	Besoins en ions	Activité hémolytique	Références
A-3-I	nd	PE>PC	+	- (PLC)	Doi (1973)
CHA0	nd	nd	nd	+ (souche)	Sacherer (1994)
<i>P. fluo</i> (1)	39,5	PE>PC	+	nd	Crevel (1994)
D	36	PC>PE	+	+ (PLC)	Ivanov (1996)
<i>P. fluo</i> (2)	40	PC>PI	+	nd	Preuss (2001)
P1	31,2	nd	+	nd	Stepaniak (1987)

Pf-5 possède également une phospholipase C putative dont la séquence est homologue à PlcH (N° d'accession : YP_260232).

5.2 Régulation des phospholipases C

5.2.1 Régulation de la PlcH de *P. aeruginosa*

L'expression de PlcH est régulée au niveau transcriptionnel par le régulon phosphate (Ostroff *et al.*, 1990; Shortridge *et al.*, 1992). Sur un milieu carencé en phosphate inorganique (Pi), le système à deux composantes PhoB contrôle positivement l'expression dépendante du Pi de PlcH (Shortridge *et al.*, 1992). Indépendamment de la concentration en phosphate, l'expression de PlcH est régulée par des osmoprotectants, tels que la choline et la glycine bétaïne, via un second promoteur. La production de l'enzyme est donc entretenue par le produit issu de l'hydrolyse de son substrat, la phosphatidylcholine (Sage *et al.*, 1997a). Cet aspect est particulièrement intéressant lorsqu'on considère que *P. aeruginosa* se développe au niveau des poumons des patients atteints de mucoviscidose. En effet, les surfactants pulmonaires sont riches en PC, ce qui entretient certainement l'expression de PlcH au sein des poumons.

Enfin, Sage *et al.* ont également montré que l'expression de PlcH est soumise à une répression catabolique, indépendante du système Vfr (Sage et Vasil, 1997b).

5.2.2 Régulation de l'α-toxine de *C. perfringens*

Bien que la phospholipase C produite par *C. perfringens* ait fait l'objet de nombreuses études, il existe assez peu de données concernant la régulation de l'enzyme. L'équipe de Shimizu a montré que le système de régulation à deux composantes VirR/VirS, équivalent au système Gac chez les *Pseudomonas*, contrôlait l'expression d'un nombre important de gènes de virulence, dont le gène *plc* codant l'α-toxine (Ba-Thein *et al.*, 1996). Le système régule positivement l'expression de *plc* (Banu *et al.*, 2000), par l'intermédiaire d'un ARN régulateur, VR-RNA (Shimizu *et al.*, 2002). VR-RNA est activé par VirR, puis la partie 3' de VR-RNA se fixe sur le promoteur de *plc* et induit son expression.

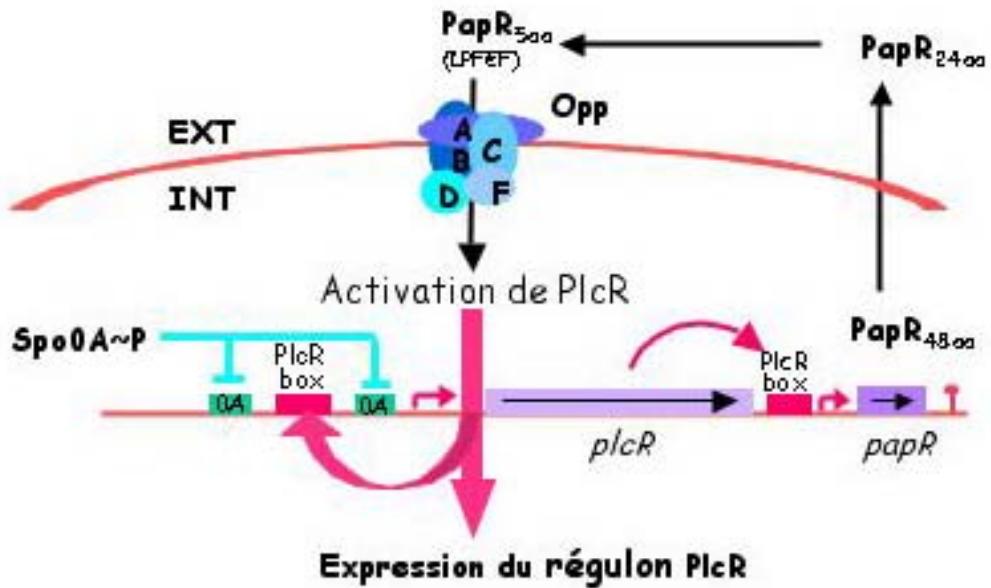


Figure 9: Modèle de régulation de l'expression du régulon PlcR. L'activation de *plcR* entraîne l'expression de PlcR et de PapR. Après libération dans le milieu extracellulaire et diffusion à travers la membrane d'un complexe pentapeptidique de PapR clivées, l'association du peptide avec PlcR active l'expression de *plcR*, de *papR* et de tous les gènes qui présentent en amont une boîte PlcR (régulon PlcR). En milieu carencé, la bactérie entame le processus de sporulation et la phosphorylation de la protéine Spo0A augmente. Sp0A~P se fixe sur ses séquences cibles 0A et bloque la transcription du gène *plcR*, réprimant ainsi le système. (D'après Slamti *et al.*, 2003).

L'α-toxine est également régulée par un autre facteur, actuellement non identifié, car une expression résiduelle de *p/c* est observée chez un mutant Vir (Shimizu *et al.*, 2002).

5.2.3 Le régulon PlcR chez les *B. cereus*

La régulation du pouvoir pathogène chez *B. cereus* et *B. thuringiensis* est réalisée principalement par le régulateur transcriptionnel PlcR (Phospholipase C Régulateur). Ce régulateur pléiotrope agit de façon positive sur l'expression de 50 gènes, correspondant à 80% en volume du protéome extracellulaire (Gohar *et al.*, 2002). La délétion du gène *plcR* chez ces bactéries conduit à une diminution du pouvoir pathogène chez l'insecte et la souris. Chez *B. anthracis*, le gène *plcR* est tronqué et son produit est non fonctionnel. Ceci explique pourquoi les gènes codant les enzymes PC-PLC et SM-PLC, présents sur le chromosome de la bactérie, ne sont pas exprimés. Ces gènes sont réactivés par l'introduction *en trans* du gène *plcR* de *B. thuringiensis*. En contrepartie, la bactérie est incapable de sporuler. Mignot *et al.* ont montré que la perte de la capacité de sporulation résultait d'une incompatibilité entre le régulon PlcR et le régulon AtxA, spécifiant la synthèse des toxines de *B. anthracis* (Mignot *et al.*, 2001). La conservation d'un régulon de pathogénie aux dépens d'un autre, par une simple mutation ponctuelle, est un remarquable exemple d'évolution et permet à la cellule de minimiser les coûts énergétiques.

L'expression du régulon PlcR est un mécanisme ingénieux et contrôlé à différents niveaux (**Figure 9**):

- Le facteur clé responsable de l'initiation de la sporulation, Spo0A, réprime l'expression du gène *plcR* quand la bactérie s'engage dans le processus de sporulation. Cette répression est due à la fixation de Spo0A~P sur deux séquences (0A, **Figure 9**) situées de part et d'autre de la cible reconnue par PlcR pour sa propre activation.
- Le gène *papR* (peptide activating PlcR), lui-même régulé par PlcR, conduit à la synthèse d'un peptide de 48 acides aminés portant une séquence signal d'exportation. Une partie du peptide est diffusible dans le milieu extracellulaire et peut être réimportée dans la cellule bactérienne, sous forme d'un pentapeptide, *via* le système de perméation Opp. Le pentapeptide interagit

avec la protéine PlcR permettant ainsi sa fixation du complexe sur les séquences d'ADN cible (boîtes PlcR). Au moins trois types de pentapeptides (LPFEF, MPFEF, VPFEF) ont été identifiés chez les bactéries composant le groupe *B. cereus*. Ce système de signalisation moléculaire permet donc aux bactéries d'un même sous-groupe de produire un ensemble de facteurs de virulence quand leur densité dans le milieu est suffisante (quorum sensing) (Slamti *et al.*, 2003).

5.2.4 Le régulon flagellaire

L'implication du régulon flagellaire dans la régulation et/ou la sécrétion d'une phospholipase a été démontré la première fois par Giskov *et al.* en 1995, pour la phospholipase A PhIA de *Serratia liquefaciens*. L'expression de PhIA est régulée au niveau transcriptionnel par le facteur sigma FliA, qui régule l'expression des gènes de classe III du régulon flagellaire, et la protéine est sécrétée par l'appareil flagellaire (Givskov *et al.*, 1995). C'est également le cas de la phospholipase A YplA produite par *Yersinia enterocolitica* qui présente de fortes homologies avec PhIA (Young *et al.*, 1999). Chez *B. thuringiensis*, un troisième niveau de régulation de la phospholipase C PC-PLC impliquerait le gène *fliA*, codant un gène flagellaire de classe II composant l'appareil de sécrétion flagellaire. Deux études indépendantes viennent conforter cette hypothèse. Zhang *et al.* décrivent, en 1993, qu'un mutant pléiotrope avirulent de *B. thuringiensis* présente une diminution conjointe de la production de flagelline et de PC-PLC. Le phénotype pourrait être la conséquence d'une mutation spontanée au niveau d'un régulateur « commun ». Par ailleurs, à l'époque les auteurs avaient constaté des fréquences de réversion importantes, ce qui pourrait aujourd'hui s'interpréter comme de la variation phénotypique (Zhang *et al.*, 1993). En 2002, Ghelardi *et al.* obtiennent le même phénotype en créant un mutant $\Delta fliA$ et montrent que *fliA* serait impliqué dans la sécrétion de PC-PLC (Ghelardi *et al.*, 2002). Toutefois, ce résultat est contredit en 2005 par Bouillaut *et al.* qui observent la PC-PLC dans le surnageant de culture de *B. thuringiensis* 407 Cry $\Delta fliA$ (Bouillaut *et al.*, 2005). Par conséquent de nombreux points restent encore à élucider.

Le régulon flagellaire est aussi souvent concerné par les variations de phénotypes, dont les principaux mécanismes vont maintenant être présentés.

Partie III : Adaptation des bactéries par des mécanismes de variation de phénotype chez les *Pseudomonas*

L'adaptation des micro-organismes à leur environnement repose à la fois sur la création de la diversité génétique et sur la sélection naturelle. Les bactéries ont également élaboré des réseaux de régulation complexes qui leur permettent de s'adapter à différents environnements (Bjedov *et al.*, 2003). Cette adaptation peut être accompagnée d'une variation de phénotype, provoquée ou non par des signaux externes de l'environnement.

Un des mécanismes impliqués dans la diversification du phénotype est la variation de phase. Au cours de ce processus, les bactéries basculent dans un système d'expression différentielle d'un ou plusieurs gènes. Dans une même population clonale, on retrouve donc des cellules individuelles qui expriment normalement le gène (cellules en phase ON) et celles dont l'expression du gène est éteinte (cellules en phase OFF) (Henderson *et al.*, 1999). Le passage d'une phase à l'autre est appelé le switch. Les variations de phase sont des événements aléatoires, le plus souvent **réversibles** (i.e ON↔OFF) (Henderson *et al.*, 1999), et dont la fréquence d'apparition est importante ($>10^{-5}$ par génération bactérienne). Les fréquences de variation doivent être supérieures au taux de mutation spontanée et le phénotype doit être réversible pour que le changement de phénotype soit qualifié de variation de phase (van der Woude et Baumler, 2004). Le switch est un événement stochastique qui peut être modulé par des facteurs extérieurs. Les fréquences de switch sont d'ailleurs assez difficiles à évaluer car elles dépendent du protocole et des conditions de culture choisies. La réversion peut nécessiter des conditions particulières, et donc ne jamais être observée au laboratoire (van der Woude et Baumler, 2004).

De nombreuses études ont permis de caractériser les différents mécanismes moléculaires impliqués dans les variations de phase. Bien que de plus en plus d'exemples aient été recensés, le nombre de mécanismes différents reste restreint. On peut les classer en deux grandes catégories : les mécanismes qui impliquent un réarrangement chromosomique du génome bactérien et les mécanismes épigénétiques.

1 Mécanismes moléculaires impliqués dans les variations de phase

1.1 Les réarrangements chromosomiques

Les changements d'expression des gènes de cellules en phase ON à OFF peuvent résulter d'une modification génétique sur un locus donné. Ces variations ont été nommés « shufflon », quel que soit le mécanisme moléculaire impliqué (Komano, 1999). Les modifications peuvent être mineures (changement d'un nucléotide) ou conséquentes lorsque le réarrangement concerne plusieurs kilobases.

1.1.1 La recombinaison spécifique de site

La recombinaison spécifique de site (RSS) est un mécanisme conservatif qui n'engendre ni synthèse ni dégradation des fragments d'ADN impliqués. La RSS se différencie de la recombinaison homologue par différents critères. La longueur des fragments d'ADN homologues est plus courte (< 30 pb) et la recombinaison est indépendante des protéines impliquées dans les processus de recombinaison générale comme RecA. La recombinaison a lieu au niveau de séquences d'ADN qui présentent une forte identité. Les recombinases reconnaissent un site spécifique de l'ADN, parfois à une base près, et procèdent à des inversions, des insertions ou des excisions d'ADN. Elles sont divisées en deux grandes familles, en fonction des résidus impliqués dans la catalyse : les recombinases à tyrosines et les recombinases à sérines.

1.1.1.1 *Recombinaison par inversion d'un fragment d'ADN*

La recombinaison par inversion de segment d'ADN nécessite la présence de séquences répétées inversées (IR). Ces IR sont séparées par une région non palindromique appelée spacer. La recombinaison permet une bascule rapide d'un système ON→OFF du fragment d'ADN situé au sein ou autour de la région inversable.

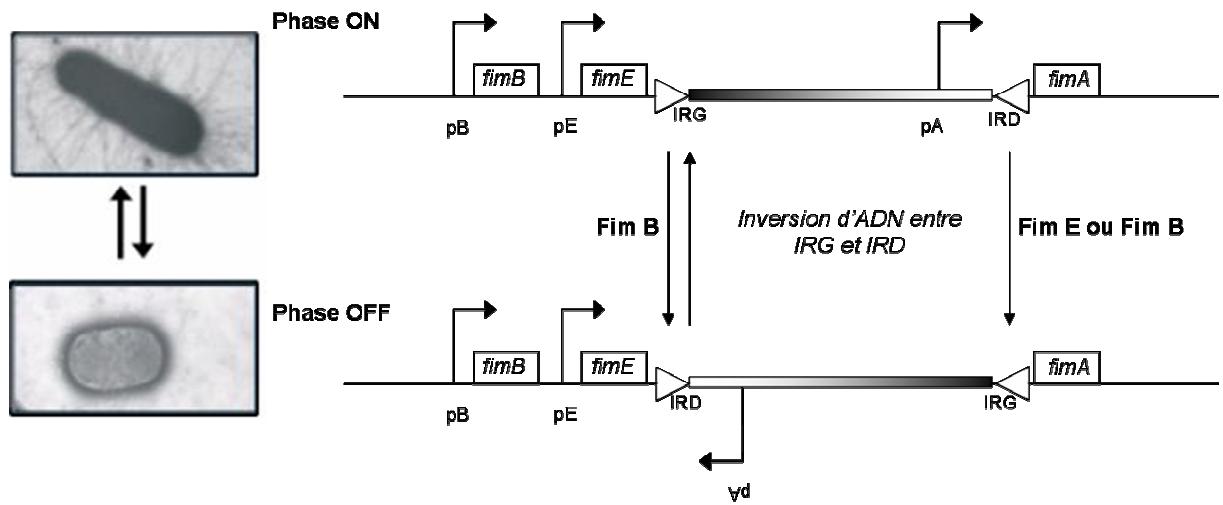


Figure 10: Représentation de la variation de phase de l'opéron *fim* par un mécanisme de recombinase spécifique de site. En phase ON, l'orientation du spacer autorise la transcription du gène *fimA* et la bactérie présente des pili à la surface. En phase OFF, la transcription est réprimée. Le passage de ON à OFF est réalisé par les recombinases FimE et FimB, dont les gènes sont localisés en amont de *fimA* sur l'opéron. (D'après Henderson *et al.*, 1999)

Chez *E. coli*, l'inversion d'un fragment d'ADN de l'opéron *fim* régule l'expression des *fimbriae* de type 1 (**Figure 10**).

Le spacer, encadré par deux IR de 9 pb, est constitué d'un fragment d'ADN d'environ 300 pb sur lequel est situé le promoteur pA. En phase ON, l'orientation de pA autorise l'expression du gène *fimA*, qui code la sous-unité principale des *fimbriae*. En phase OFF, pA est inversement orienté et *fimA* n'est pas exprimé. L'inversion du fragment d'ADN est réalisée par deux recombinases spécifiques de site (ou invertases), FimE et FimB, dont les gènes sont situés en amont de *fimA*. FimB réalise le switch aussi bien dans le sens ON→OFF que le sens OFF→ON tandis que FimE favorise le switch de la phase ON vers OFF (van den Broek *et al.*, 2005a). Les fréquences de variation dépendent de l'invertase mise en jeu (10^{-3} à 10^{-4} pour le switch FimB-dépendant contre 10^{-1} pour le FimE-dépendant) (van der Woude et Baumler, 2004). Les activités de FimB et de FimE sont régulées à la fois par la température de croissance et par le milieu. Les switch dépendants de FimB sont moins fréquents mais l'activité de FimE diminue lorsque la température de croissance avoisine les 37°C. Cette propriété permet d'assurer la présence des *fimbriae* de type 1 à la surface cellulaire de *E. coli* lorsque la bactérie se trouve à la température physiologique de l'homme. En contrepartie, lorsque la température du milieu diminue, FimE intervient en basculant rapidement la cellule en phase OFF.

Ce système d'expression, simple à première vue, présente une régulation complexe faisant intervenir un nombre de facteurs importants. La régulation s'effectue à différents niveaux, transcriptionnel et post-transcriptionnel, et met également en jeu les affinités pour l'ADN des différents acteurs (FimB, FimE et des protéines régulatrices de type H-NS et Lrp) (Henderson *et al.*, 1999).

1.1.1.2 Insertion et excision d'élément sur le chromosome

L'insertion ou l'excision de fragment d'ADN résulte d'un processus de transposition. Les transpositions peuvent générer des variations de phase réversibles, à condition que l'excision/insertion soit précise et permettre la restauration de la séquence originale de l'ADN, ce qui est rarement le cas.

La production d'exopolysaccharides (EPS) par la bactérie marine *Pseudoalteromonas atlantica* est essentielle à la formation du biofilm. Un mécanisme de variation de phase impliquant la transposase MooV régulerait l'expression du gène de la synthèse d'EPS (Perkins-Balding *et al.*, 1999). MooV, dont le gène est localisé sur le locus *eps*, réaliseraient l'excision de la séquence transposable IS492 intégrée dans le locus *eps*. Cette variation de phase permettrait à la bactérie de former des biofilms sur les surfaces solides. Cette capacité serait interrompue lorsque *P. atlantica* se retrouve sous forme planctonique dans l'océan (van der Woude et Baumler, 2004).

1.1.2 La recombinaison homologue

La recombinaison homologue nécessite des séquences homologues plus longues (> 50 pb) et dépend d'un certain nombre de protéines intervenant dans les systèmes de réparation de l'ADN et de la maintenance de la machinerie cellulaire, particulièrement RecA. Cependant, la fréquence de recombinaison est supérieure à la plupart des recombinaisons dépendantes de RecA et la recombinaison s'effectue entre des séquences qui présentent de plus faibles homologies. Les variations provoquées par cette recombinaison complexe sont le plus souvent délétères, ce qui aboutit à un phénotype irréversible (Henderson *et al.*, 1999).

La conversion génique associée à la variation antigénique repose sur la recombinaison entre un gène appartenant à un répertoire de gènes silencieux et un gène situé au niveau du site d'expression.

La synthèse des pili de type IV de *Neisseiria gonorrhoeae* présente une variation antigénique RecA-dépendante. Le gène soumis à cette régulation code la piline, la sous-unité principale du pili. La recombinaison s'effectue entre les gènes *pilE* (pour « exprimé ») et un des gènes *pilS* (pour « silencieux »). Le gène *pilE* code les deux tiers de la partie N-terminale de la piline, tandis que les gènes *pilS* ne contiennent que l'information codant la partie C-terminale et ne sont pas exprimés. Il existe différents loci *pilS*, localisés à différents endroits sur le chromosome et chaque locus peut contenir de 1 à 6 séquences *pilS* différentes (Kline 2007). Ce système permet donc de générer un nombre important de variations au sein de la structure de la piline (van der Woude et Baumler, 2004).

1.1.3 Mésappariement de brin d'ADN – Slipped-strand mispairing (SSM)

Parmi les exemples de shufflon élucidés à ce jour, le mésappariement de brin ou SSM est le mécanisme moléculaire le plus fréquemment rencontré. Le chromosome procaryote présente de nombreuses séquences courtes répétées (SCR). Ces séquences sont soit constituées d'un seul nucléotide (polyG par exemple) soit d'un motif donné de quelques paires de bases (GATC par exemple). Lors de la réplication ou de la réparation de l'ADN, un mésappariement entre le brin matrice et le brin néoformé est à l'origine d'une augmentation ou d'une diminution du nombre de SCR. Le système de réparation de l'ADN semble par conséquent jouer un rôle dans les SSM (Bayliss *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2004). La modification du nombre de répétitions provoque des variations de phase de l'expression de certaines protéines. Cette variation a lieu au niveau transcriptionnel si la perturbation se situe au sein de la région promotrice (entre les régions -10 et -35) ou au niveau traductionnel si elle a lieu dans la partie codante de la protéine.

1.1.3.1 SSM transcriptionnel du gène *opc* chez *Neisseria meningitidis*

Opc est une protéine de membrane externe impliquée dans l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales et endothéliales de *N. meningitidis* (Jolley *et al.*, 2001). La variation de phase du gène *opc* permet non seulement une expression « tout ou rien » du gène mais contrôle également le niveau d'expression du gène. Trois phénotypes sont alors possible : *Opc*⁺⁺, *Opc*⁺ et *Opc*⁻.

Le taux d'expression va dépendre de la longueur d'une séquence polycytidine (polyC) localisée entre la région -10 et -35 du promoteur de *opc* (**Figure 11**). En fonction du nombre de bases C répétées, le gène *opc* est soit transcrit (polyC= 14), surexprimé (polyC=12) ou réprimé (polyC=10) (Henderson *et al.*, 1999).

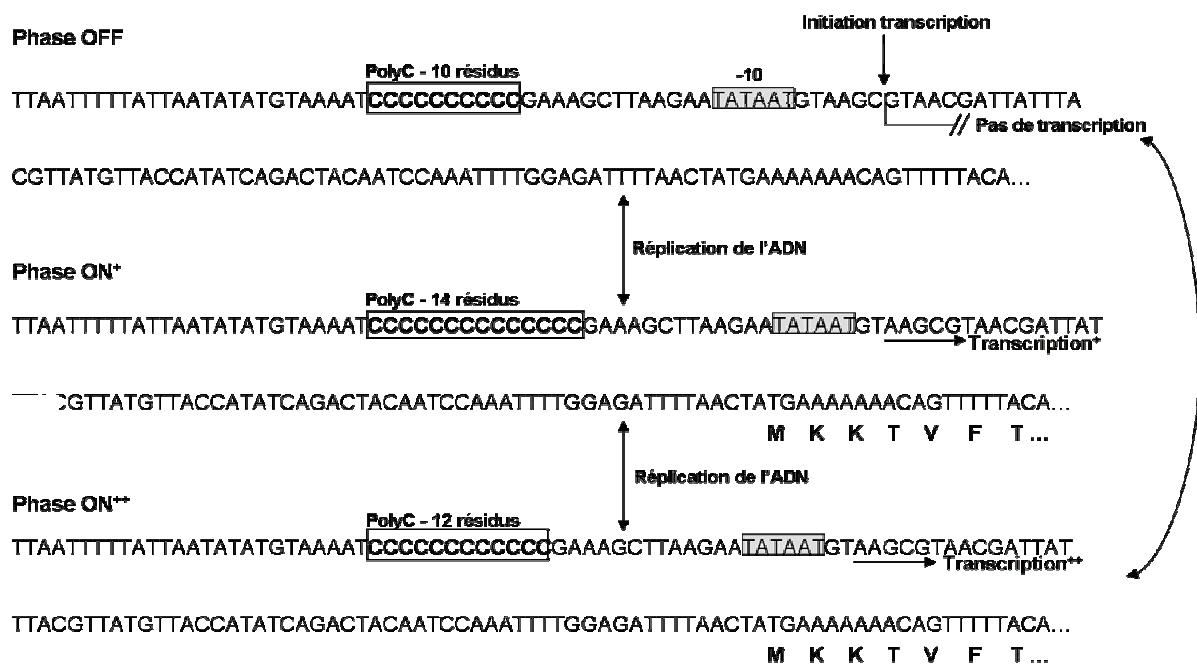


Figure 11: Représentation du SSM transcriptionnel du gène *opc* de *N. meningitidis*. La partie N-terminale de Opc, ainsi que la région génomique en amont du gène *opc* sont représentées. Les régions -10 et poly-C sont encadrées et le site du début de la transcription est indiqué par une flèche. La transcription a lieu quand polyC=14, devient optimale pour polyC=12 et s'interrompt quand polyC=10. (D'après Henderson, 1999)

1.1.3.2 SSM traductionnel du gène *mod* chez *Haemophilus influenzae*

Le gène *mod* de *H. influenzae*, qui code une protéine homologue aux méthyltransférases, présente une séquence de 4 nucléotides (AGTC) répétées 30 fois dans la région codante de la protéine. Lorsqu'une séquence AGTC est rajoutée lors de la réPLICATION ou lors de la réPARATION de l'ADN, l'ORF est altérée. Un codon stop est formé et la protéine tronquée n'est plus active (Figure 12) (van der Woude et Baumler, 2004).

1.2 Régulation épigénétique

1.2.1 Définition

L'épigénèse définit un changement de phénotype, héréditaire mais réversible, qui intervient sans modification du génotype. Ces mécanismes sont retrouvés chez différents micro-organismes comme *E. coli* (Guespin-Michel et al., 2003; Hernday et al., 2003), *S. enterica* (Casadesus et Low, 2006) ou *P. aeruginosa* (Filopon et al., 2006). La régulation épigénétique la plus étudiée repose sur des différences de méthylation des brins d'ADN. La méthylation d'une séquence cible d'ADN (comme la région régulatrice d'un opéron) empêche la fixation d'un régulateur et donc la transcription du ou des gènes.

1.2.2 Régulation épigénétique du SSTM chez *P. aeruginosa*

Le système de sécrétion de type III chez *P. aeruginosa* présente deux états stables. Les souches « inductibles » présentent une cytotoxicité dépendante du SSTM, activée *in vivo* par le contact avec les cellules hôtes ou *in vitro* par une déplétion calcique. Au contraire, il existe des souches non-cytotoxiques, qualifiées également de « non-inductibles », qui possèdent pourtant les gènes codant l'ensemble du SSTM (Dacheux et al., 2001). La régulation épigénétique consiste donc à faire basculer le SSTM de l'état non-inductible à l'état inductible, et vice-versa.

L'ensemble des gènes codant l'appareil de sécrétion/translocation et les toxines est sous le contrôle du régulateur transcriptionnel ExsA. ExsA active sa

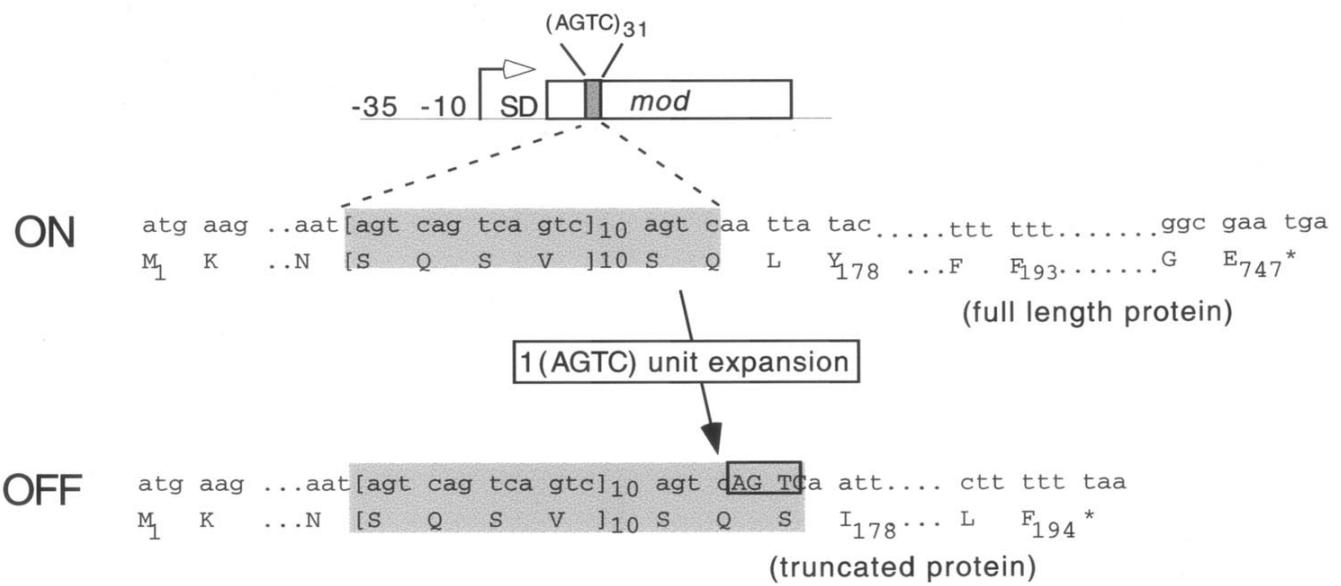


Figure 12: Représentation du SSM traductionnel du gène *mod* de *H. influenzae*. L'insertion d'un motif supplémentaire AGTC dans la partie codante provoque un décalage du cadre de lecture ce qui aboutit à la formation d'une protéine Mod tronquée (D'après Van der Woude 2004).

propre synthèse en se fixant sur l'opéron *exsCEBA*, créant ainsi une boucle de rétroaction positive. Elle active également l'expression d'*ExsD*, protéine qui se lie à *ExsA* et bloque son action, créant ainsi une boucle de rétroaction négative (**Figure 13, A**).

En créant un modèle mathématique prenant en compte les interactions entre les boucles positives et négatives au niveau d'*exsA* (**Figure 13, B**), et en testant les hypothèses par des expériences biologiques suggérées par le modèle, *Filopon et al.* ont ainsi pu mettre en évidence qu'une augmentation **transitoire** du régulateur transcriptionnel *ExsA* dans une souche de PAO1 non-inductible, permet de basculer vers un phénotype inductible « stable ».

Différentes études ont montré que les bactéries isolées en début d'infection des poumons présentent majoritairement un SSTT inductible, alors que la proportion des souches non-inductibles augmente au fur et à mesure de l'infection. La bascule de l'état inductible à non inductible est probablement due à une ou des modifications environnementales, comme le passage de croissance en mode biofilm (*Filopon et al.*, 2006).

1.2.3 Régulation épigénétique du système *pap* chez *E.coli*

Le premier système décrivant un contrôle direct de l'expression des gènes par un processus de méthylation de l'ADN est le système *pap* (**pyelonephritis-associated pili**) des souches d' *E. coli* uropathogènes (UPEC). Ces pili jouent un rôle important dans les infections du tractus urinaire par *E. coli* car ils permettent à la bactérie d'adhérer aux cellules uroépithéliales. La régulation de l'opéron *pap* fait intervenir un nombre important de facteurs qui permettent de basculer le système de la phase OFF (cellule n'exprimant pas les pili à leur surface) en phase ON, notamment à 37°C (van der Woude et Baumler, 2004).

La région régulatrice de l'opéron est constituée de 416 pb contenant les sites de fixation de différentes protéines régulatrices (Lrp, PapI, et CAP), de deux sites GATC (GATC-I et GATC-II), et de deux promoteurs (pI et pBA) (**Figure 14**). Le promoteur pI permet l'expression de la protéine régulatrice PapI tandis que pBA est le promoteur principal de l'opéron *pap*. Les deux séquences cibles GACT-I et GATC-II sont séparés par 102 pb et contiennent chacun trois sites de fixation pour Lrp (4,5,6 et 1,2,3 respectivement). L'expression de l'opéron *pap* dépend directement de

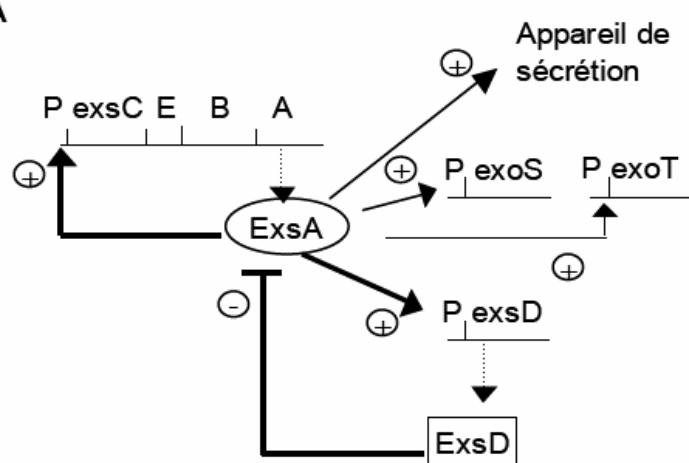
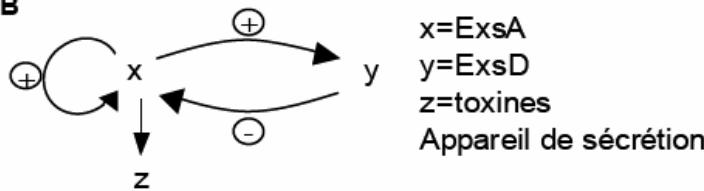
A**B**

Figure 13: (A) Schéma simplifié de la régulation du SSTM lors de l'activation par contact avec une cellule cible ou par déplétion calcique. ExsA s'auto-régule, active l'expression de l'appareil de sécrétion/translocation, des toxines et de l'inhibiteur ExsD.

(B) Schéma minimal de régulation issu de (A) montrant essentiellement les boucles de rétroactions servant à la modélisation.

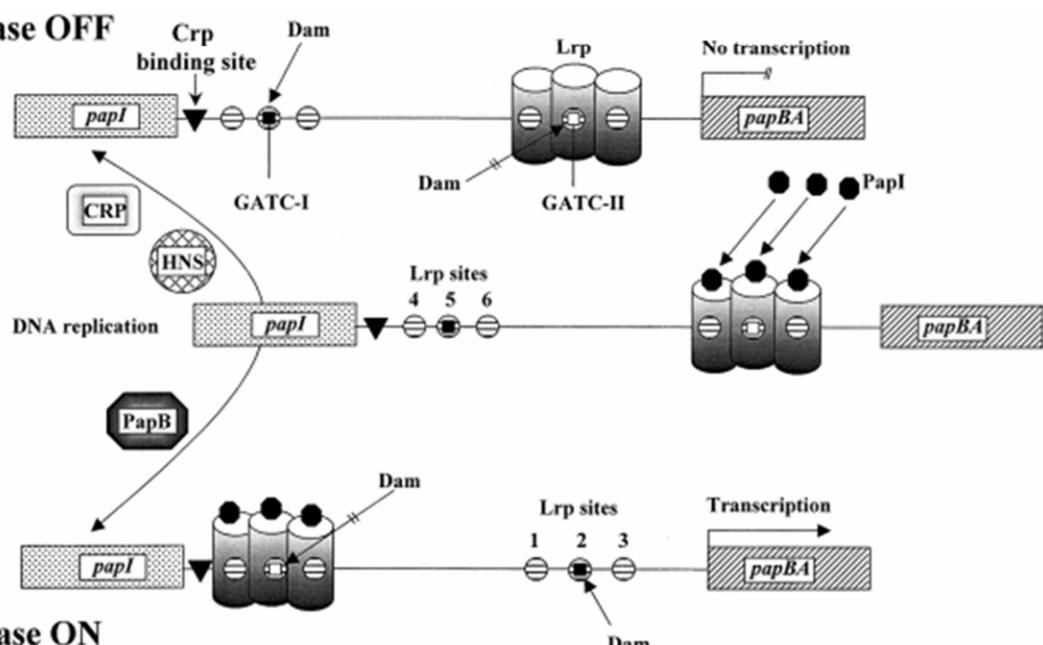
Phase OFF

Figure 14: Modèle de la variation de phase de l'opéron Pap. La figure montre la région intergénique entre les gènes *papI* et *papAB*. Les 6 sites de fixations de la protéine Lrp sont indiqués par des cercles hachurés. Les deux sites GATC (GACT-I et GATC-II), qui peuvent être différentiellement méthylés sous l'action de Lrp et de la méthylase Dam, sont représentés par des carrés (noir: méthylé; blanc: non méthylé). La phase OFF (transcription inactive de *papAB*) et la phase ON (transcription active de *papAB*) sont représentées. Les différentes protéines régulatrices sont représentées (PapI, PapB, CRP et HNS). Les flèches barrées indiquent une absence d'interaction. Pour le fonctionnement du modèle, se référer au texte. (D'après Henderson, 1999).

la fixation de Lrp sur l'une des deux séquences cibles GATC. La méthylation des séquences GATC par une déoxyadénosine méthyltransférase (Dam) empêche la fixation de la protéine régulatrice Lrp et régule ainsi l'expression différentielle du système (Henderson *et al.*, 1999).

En phase ON, le GATC-II est méthylé donc la protéine Lrp se fixe sur le site 5 du GATC-I. L'ARN polymérase se fixe sur le promoteur pBA et les cellules synthétisent leurs pili. Inversement, quand GATC-I est méthylé, Lrp se fixe sur le site 2 du GATC-II et empêche l'expression de l'opéron *pap*.

La complexité du système repose sur l'état de méthylation de l'ADN et sur la protéine régulatrice locale PapI. PapI se lie à Lrp et augmente son affinité pour l'ADN au niveau des sites GATC.

Le switch d'une phase à l'autre interviendra lorsque la méthylation des sites GATC sera inversée. Une telle inversion ne peut avoir lieu tant que la protéine Lrp est fixée sur l'ADN ce qui bloque l'accès à la Dam. Le switch peut donc avoir lieu pendant le processus de réPLICATION de l'ADN, avec la formation de brin d'ADN hémiméthylé (Hernday *et al.*, 2004).

De nombreux travaux ont permis d'élucider en partie la régulation de l'opéron *pap* mais le système semble encore plus complexe. De nombreuses protéines régulatrices interviennent. La protéine PapB entretient le système en augmentant le niveau d'expression de PapI (boucle de rétroaction positive) ainsi que sa propre expression. La protéine CAP est nécessaire à la transcription de *papI* et de *papBA*. Enfin, la protéine H-NS serait responsable de la thermorégulation du système en se fixant aux sites GATC et bloquerait leur méthylation (Hernday *et al.*, 2004).

2 Les phénotypes affectés par les variations de phase

2.1 Variation phénotypique des structures membranaires

Les variations de phénotype et les variations antigéniques ont d'abord été perçues comme une astuce permettant aux bactéries d'échapper au système immunitaire de l'hôte. En effet, les structures phase-variables les plus fréquemment décrites se trouvent majoritairement à la surface cellulaire. Les modifications des structures membranaires sont visibles à l'œil nu par observation des colonies. Un changement quelconque (mais réversible) dans la morphologie de la colonie (bords,

Tableau 7: Représentation non exhaustive des phénotypes régulés par des mécanismes de variation de phase (D'après Van der Woude, 2004 et Henderson, 1999)

	espèces	gènes ou opérons régulés	mécanismes moléculaires
Fimbriae	<i>Bordetella pertussis</i>	<i>fim3</i>	SSM
	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>hifA, hifB</i>	SSM
	<i>Proteus mirabilis</i>	opéron <i>mrp</i>	RSS
	<i>Salmonella enterica</i> serotype <i>Typhimurium</i>	opéron <i>pef</i>	ADN méthylé
	<i>Escherichia coli</i>	<i>fim</i> , opéron <i>fot</i> <i>pap</i> et <i>pap-like</i>	RSS ADN méthylé
	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>pilC</i>	SSM
Flagelle	<i>Campylobacter coli</i>	<i>flhA</i>	SSM
	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>maf1</i>	SSM
	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>fliP</i>	SSM
	<i>Salmonella enterica</i> serotype <i>Typhimurium</i>	<i>fliBA, fliC</i>	RSS
Protéine OM	<i>Escherichia coli</i>	<i>agn43</i>	ADN méthylé
	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>opc</i>	SSM
		<i>opa</i>	SSM
LPS	<i>Neisseria</i> spp.	<i>licA</i>	SSM
	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>futA, futB, futC</i>	SSM
Capsule	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>siaD</i>	SSM
		<i>siaA</i>	Transposition
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>cap3A</i>	Recombinaison
ADN	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>mod</i>	SSM
	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>mod</i>	SSM
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ADN méthylase	SSM

consistance, relief etc...), l'opacité ou la couleur indiquent que l'expression d'au moins une protéine est phase-variable. Le **tableau 7** représente les différentes structures membranaires concernées par les variations de phase.

Il existe cependant des variations de phase qui n'impliquent pas de changement de propriétés de surface. C'est notamment le cas de la variation de certains systèmes de réparation et de modification de l'ADN (**Tableau 7**).

2.2 Variation de phase des régulateurs globaux

L'expression différentielle de protéines régulatrices ou de régulateurs globaux par des mécanismes de variation de phase se répercute directement sur l'expression d'autres gènes. De fait, la variation d'expression d'un seul gène amène à une régulation coordonnée, ce qui aboutit à un réseau interdépendant d'expression de gènes « variables ».

C'est le cas du régulateur Mga de *Streptococcus pyogenes* (anciennement VirR) qui contrôle l'expression de nombreux facteurs de virulence, ainsi que de BvgS, le senseur du système à deux composantes BvgAS de *Bordetella pertussis* (Jones *et al.*, 2005).

3 La variation phénotypique chez les *Pseudomonas*

La variation de phénotype est fréquente chez les bactéries du genre *Pseudomonas*. Le nombre d'exemples de variation de phénotype ne cesse d'augmenter depuis ces dernières années, sans pour autant que les mécanismes moléculaires soient complètement élucidés (van den Broek *et al.*, 2005a).

P. aeruginosa thermorégule l'expression de l'épitope phosphocholine d'une protéine de 43 kDa, probablement impliquée dans la pathogénie de la souche (variation antigénique) (Weiser *et al.*, 1998). La diversité des variants phénotypiques identifiés à partir d'isolement de souches cliniques de *P. aeruginosa* est relativement importante. Ce panel est constitué de souches mucoïdes, de petites colonies composées de cellules hyperadhérentes (SCV), de bactéries dépourvues de mobilité ainsi que de souches résistantes à la phagocytose ou multirésistantes aux

antibiotiques (Smania *et al.*, 2004). L'expression des pili de type IV est soumise à des variations de phase, ce qui affecte directement les mobilités de type swimming et swarming et augmente la formation de biofilms (Deziel *et al.*, 2001).

Chez les souches de *Pseudomonas* de la rhizosphère, les variations phénotypiques influent principalement sur la colonisation des racines des plantes. Achouak *et al.* ont montré que la colonisation des racines d'*Arabidopsis thaliana* par la souche *P. brassicacearum* NFM421 est reliée à l'émergence de deux types de variants (variant de phase I et de phase II) (Achouak *et al.*, 2004). Les bactéries de phase II, plus mobiles que celles de phase I, sont retrouvées sur l'ensemble de la racine, et plus particulièrement dans la partie apicale, alors que les cellules de phase I sont retrouvées dans la partie basale de la racine. Cette diversité au sein de la population améliore la capacité de colonisation de la souche.

Chez *P. fluorescens* WCS365, la mutation de *sss*, une recombinase spécifique de site (RSS) dont la cible n'a pas encore été identifiée, diminue la capacité de la souche à coloniser les racines de tomate (Dekkers *et al.*, 1998).

La surexpression des gènes *sss* et *xerD* chez *P. fluorescens* F113 entraîne une augmentation du nombre de variants qui présentent des capacités de colonisation supérieures à la souche d'origine sur les racines de trèfle. Ces variants présentent tous une mutation dans les gènes *gacA* ou *gacS* (Martinez-Granero *et al.*, 2005), avec une préférence pour le gène *gacS*. Ils sont sélectionnés à deux niveaux, en phase stationnaire de croissance et/ou au niveau de la rhizosphère. D'après Martinez, l'implication de *sss* et *xerD* serait donc indirecte. Les recombinases augmenteraient le taux de mutations des souches et les variants mutés dans les gènes *gac* seraient sélectionnés *a posteriori*.

Les différences de phénotypes observés chez F113 concernent la capacité de colonisation, la mobilité, la production d'exo-enzymes, de métabolites secondaires comme le cyanure et la production de sidérophore (Sanchez-Contreras *et al.*, 2002). Ces modifications de phénotype résultent principalement de la perturbation du système de régulation globale GacA/GacS.

4 La variation phénotypique par la mutation spontanée du régulateur global Gac

Les bactéries ont développé, au cours de l'évolution, de nombreux systèmes moléculaires pour répondre aux variations de l'environnement. Chez les *Pseudomonas*, le système GacA/GacS régule la plupart des métabolites secondaires comme le cyanure (Duffy et Defago, 2000), les biosurfactants (Koch *et al.*, 2002) et des exo-enzymes (Sacherer *et al.*, 1994). Le système Gac est un système à deux composantes constitué des protéines GacS et GacA. GacS est une protéine kinase transmembranaire qui sert de senseur, tandis que GacA est le régulateur transcriptionnel du système. Les variations de l'environnement entraînent une modification conformationnelle de GacS et son autophosphorylation. GacS active ensuite GacA par transfert d'un groupement phosphate. La protéine GacA phosphorylée intervient dans la régulation de nombreux gènes, que ce soit de façon transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle par l'intermédiaire d'ARN antisens (**Figure 15**) (Heeb *et al.*, 2002). GacA active la synthèse des petits ARN non codants, RmsX, RsmY et RsmZ (Kay *et al.*, 2005). Ces ARN se lient aux répresseurs traductionnels RsmA et RsmE, qui bloquent la traduction de gènes cibles en se fixant au niveau du RBS de l'ARNm (Heeb *et al.*, 2006). Ainsi quand le système Gac est actif, les ARNm des gènes régulés par Gac peuvent être traduits. De récents travaux réalisés par l'équipe de Haas sur la souche *P. fluorescens* CHA0, montrent que cette cascade d'activation Gac-Rsm s'auto-entretiendrait via un signal de type quorum-sensing, indépendant du système des N-acylhomosérine lactone (Kay *et al.*, 2005) (**Figure 16**). La nature du signal n'a pas encore été identifiée, mais il s'agirait d'une molécule de faible masse moléculaire retrouvée dans le surnageant de culture de différentes espèces de *Pseudomonas*. Dubuis et Haas ont d'ailleurs montré que ce signal pouvait induire la cascade Gac-Rsm de *Pseudomonas* de plusieurs espèces différentes, ce qui correspond à une communication cellulaire inter-espèces (Dubuis et Haas, 2007).

Le système Gac est particulièrement bien conservé chez les *Pseudomonas*. L'équipe de Raaijmakers a d'ailleurs montré que le gène *gacA* peut être utilisé comme marqueur moléculaire en complément de l' ARNr 16S actuellement utilisé (de Souza *et al.*, 2003b).

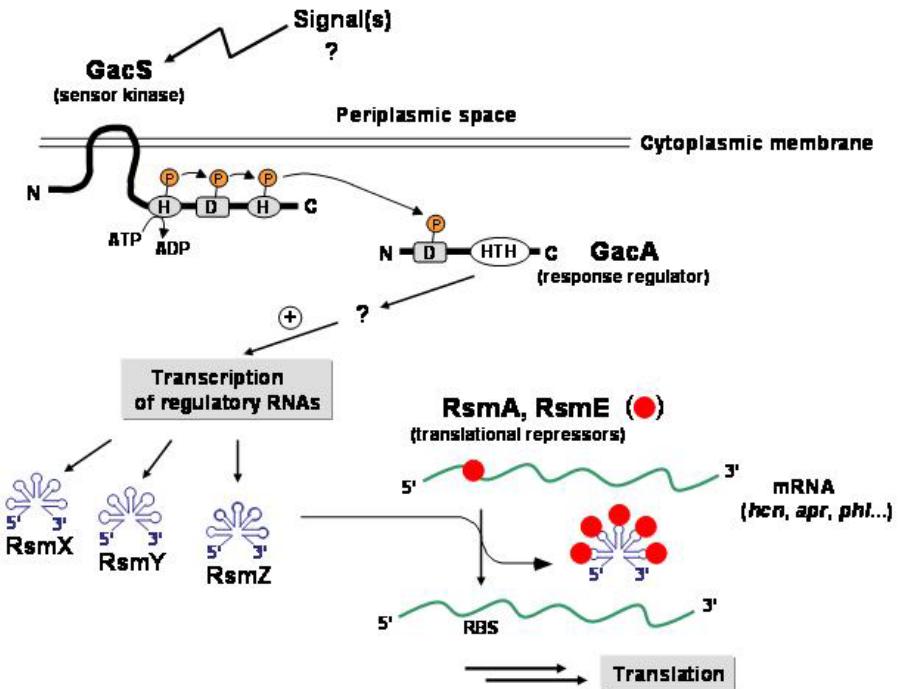


Figure 15: Modèle de fonctionnement du système à deux composantes GacA/GacS.
 (source: http://www.unil.ch/dmf/page18042_en.html)

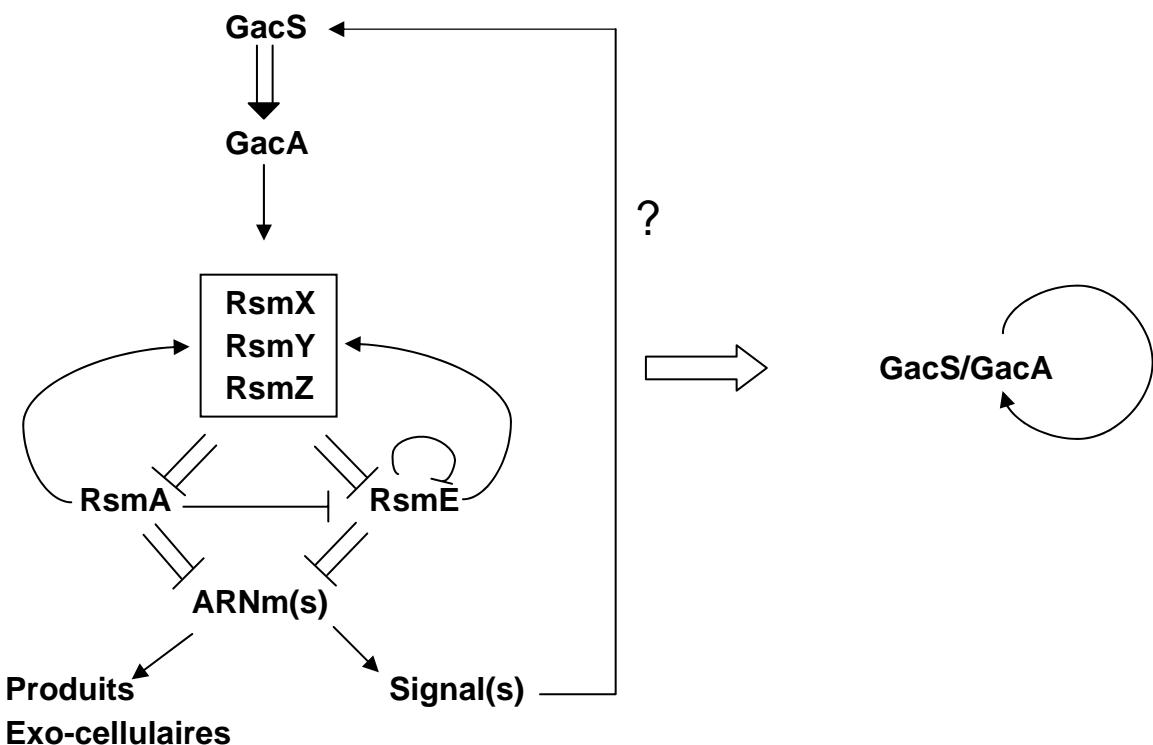


Figure 16: Modèle de régulation des gènes dans la cascade Gac/Rsm de *P. fluorescens* CHA0. (Adaptée de Kay et al. , 2005)

- effet positif
- régulation directe ou indirecte
- effet négatif
- interaction physique

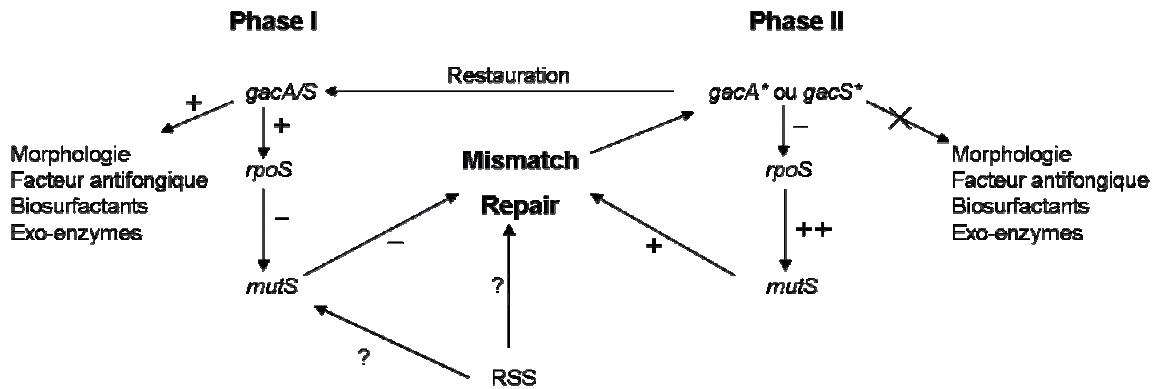


Figure 17: Modèle de la régulation génétique des mutations spontanées du système Gac. Le modèle représente le rôle de GacA/GacS, RpoS et MutS dans la régulation de la variation phénotypique chez PCL1171. Les cellules en phase I présentent des gènes *gac* intacts qui permettent l'expression de *rpoS*, qui, avec d'autres facteurs de la phase stationnaire, régule négativement l'expression de *mutS*. L'absence de réparation de l'ADN qui en résulte provoque une accumulation de mutations au sein des gènes *gacA* et *gacS* (indiqué par un astérisque), ce qui aboutit à la bascule des cellules en phase II. La mutation des gènes *gacA* et *gacS* diminue l'expression de *rpoS* et augmente par conséquent l'expression de *mutS*, ce qui baisse le taux de mutation. L'intervention d'une RSS pourrait favoriser l'émergence de mutations au niveau des gènes *gac* en agissant sur *mutS*. (Adaptée de Van den Broek, 2005).

Cependant, des mutants *gac* spontanés sont régulièrement retrouvés, particulièrement chez les souches de *Pseudomonas* impliquées dans le biocontrôle au sein de la rhizosphère. Un système Gac muté a été décrit chez *P. chlororaphis* (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 2003), *P. tolaasii* (Han *et al.*, 1997), *P. fluorescens* (Bull *et al.*, 2001; Duffy et Defago, 2000), *P. aureofaciens* 30-84 (Chancey *et al.*, 2002) et *Pseudomonas sp* PCL1171 (van den Broek *et al.*, 2003).

Les mutants *gac* présentent des cinétiques de croissance supérieures à la souche sauvage, mais sont incapables de réaliser leur activité de « biocontrôle » (absence de production de métabolites secondaires). Différents auteurs suggèrent que la mixité de la population bactérienne qui en résulte donne un avantage compétitif et explique le succès des *Pseudomonas* au niveau de la rhizosphère.

D'un point de vue moléculaire, les mutations, aléatoires par définition, sont observées dans les gènes *gacA* et/ou *gacS*. Le nombre et le type de mutations sont différents pour chaque variant (van den Broek *et al.*, 2005c): mésappariement de base, insertion courte (1 pb), délétion (jusqu'à 12 pb) et également de larges réarrangements chromosomiques ont été observés. D'après Van den Broek *et al.* (van den Broek *et al.*, 2005b), le système de réparation de l'ADN (MMR), et particulièrement le gène *mutS*, serait directement impliqué dans le mécanisme de mutations du système Gac, par l'intermédiaire de RpoS. En effet, chez PCL1171, RpoS régule l'expression de *mutS* dont l'expression est elle-même corrélée à l'émergence de variants phénotypiques.

Ce phénomène « non programmé » et aléatoire semble pourtant garantir de nombreux avantages aux bactéries. De nombreux éléments restent à découvrir pour déterminer l'organisation de ce réseau de régulation, notamment si l'on inclut l'implication d'une RSS (**Figure 17**). La RSS n'agirait pas directement sur les gènes *gac* et ceci est justifié par 2 éléments :

- différents points de mutation sont observés dans les gènes *gacA* et/ou *gacS*
- les gènes *gacA* et *gacS* sont situés sur des régions distinctes du chromosome

La RSS pourrait agir sur les gènes *mutS* ou *rpoS* mais rien n'est encore clairement établi.

Beaucoup de questions persistent également sur le côté réversible du système. La réversion de mutants *gac* spontanés a été observée pour la souche

PCL1171 et chez *P. tolaasii*, mais les mécanismes responsables de cette réversion ne sont pas encore connus.

Matériel & Méthodes

Tableau 8: Liste des souches utilisées lors de ce travail

Souches	Origine	Génotypes et caractéristiques	Références
<i>E.coli</i>			
S17.1		RP4-2-Tc ::Mu aph ::Tn7 recA [SmR] ; souche donneuse pour conjugaison biparentale	Simon (1983)
DH5 α mcr		F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcr</i> BC) φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>endA</i> 1 <i>recA</i> 1 <i>deoR</i> <i>thi-1</i> <i>supE44</i> λ - <i>gyrA</i> 96 <i>relA</i> 1	BRL ¹
<i>P. fluorescens</i>			
MF37	Lait	Mutant Rifampicine spontané de Mf0	Burini (1994)
MF3737	LMDF	MF37 adaptée à 37°C	Guérillon (non publié)
MFY162	hospitalière	Souche isolée d'expectorations pulmonaires	Bodillis (2004)
MFN1032	hospitalière	Souche isolée d'expectorations pulmonaires	Feuilloley (2007)
MFN1036		MFN1032 portant le plasmide pMF36, surexprime <i>plcC</i> sous le contrôle d'un promoteur inducible à l'IPTG	Ce travail
MFN1037		MFN1032 montrant une insertion chromosomique du plasmide pMF1034 au niveau du gène <i>plcC</i>	Ce travail
MFN1038		MFN1037 complémentée par pMF36	Ce travail
<i>P.aeruginosa</i>			
PAO1	environnement	Souche n'exprime pas le SSTT	Holloway (1979)
CHA	hospitalière	Souche isolée d'un patient atteint de mucoviscidose, exprimant le SSTT	Toussaint (1993)

¹ Bethesda Research Laboratories**Tableau 9: Liste des plasmides utilisés lors de ce travail**

Plasmides	Génotypes et caractéristiques	Références
pMos	Vecteur permettant le sous clonage de produits PCR	Amersham
pUCP20	Ap ^R , dérivé de pUC18/19, réplicatif dans <i>E. coli</i> et <i>Pseudomonas</i>	West 1994
pMF36	Ap ^R (Mezlo ^R), pUCP20 portant le fragment PCR de 1,6 kb de <i>plcC</i> de MFN1032	Ce travail
pME3087	Tc ^R , plasmide suicide chez <i>Pseudomonas</i>	Schnider 1995
pMF1034	Tc ^R , PME3087 portant le fragment PCR de <i>plcC</i> tronqué de MFN1032 double digéré par HindIII/EcoRI (1 kb)	Ce travail
pME6010	TcR, vecteur d'expression, mobilisable chez <i>E.coli/Pseudomonas</i> , stable chez <i>Pseudomonas</i>	Heeb 2000
pMP6562	pME6010 portant le gène <i>gacS</i> (3,2 kb) d'une souche de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , PLC1171	Van den Broek 2003
pMP5565	pME6010 portant le gène <i>gacA</i> (1,2 kb) d'une souche de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , PCL1446	Kuiper (non publié)
pMP6603	pM6010 portant les gènes <i>gacA</i> et <i>gacS</i> , construit à partir des plasmides pMP6562 et pMP5565	Van den Broek 2005

Tableau 10: Composition et préparation des milieux de culture

Milieu	Composition et/ou fournisseur
Luria Bertani (LB/LBG)	<p>Tryptone 10g</p> <p>Extraits de levure 5g</p> <p>NaCl 5g ou 10g selon l'étude</p> <p>NaOH (10N) 0,1 mL</p> <p>H₂O qsp 1L</p> <p>Agar (milieu gélosé LBG) 15g</p> <p>pH 7,2</p>
King B (KB/KBG)	<p>Protéose peptones n°3 20g</p> <p>Glycérol 10g</p> <p>K₂HPO₄ 1,5g</p> <p>MgSO₄, 7H₂O 1,5g</p> <p>Agar (pour KBG) 15g</p> <p>H₂O qsp 1L</p>
Gélose Trypto-caséine Soja (GTS) ou Bouillon (TSB)	<p>Solution commerciale en poudre (AES) reconstituée selon les indications fournies par le fabricant</p>
Gélose au lait	<p>GTS en surfusion 500 mL</p> <p>Lait UHT écrémé 125 mL</p>
Gélose à l'oeuf	<p>GTS en surfusion 500 mL</p> <p>Jaune d'œuf stérile à 50% (AES) 50 mL</p>
Gélose au sang de mouton	Gélose Columbia, AES

I- Physiologie bactérienne

1 Souches bactériennes et plasmides :

L'ensemble des souches et des plasmides utilisés lors de ce travail est présenté dans les **tableaux 8 et 9**, respectivement.

1.1 La souche MFN1032

1.1.1 Origine

La souche MFN1032 a été isolée au sein d'un hôpital de Haute-Normandie à partir d'expectorations d'un patient souffrant d'une infection du tractus pulmonaire.

1.1.2 Identification

La souche a été isolée par le personnel hospitalier et pré-identifiée à partir d'une galerie antibiogramme ATB PSE (bioMérieux sa, France). L'identification a été réalisée au sein du laboratoire par une approche de taxonomie polyphasique. Le séquençage de l'ARNr 16S a été réalisé par Josselin Bodilis selon une méthode précédemment décrite (Bodilis *et al.*, 2004).

1.2 Cultures Bactériennes

1.2.1 Conservation des souches

Les souches sont conservées à -80°C ou -20°C à partir d'une culture en fin de phase exponentielle de croissance en milieu LB avec 15 % de glycérol final pour les *Pseudomonas*, et 40% de glycérol final pour les *E.coli*.

1.2.2 Composition des milieux de culture

Les milieux de culture sont préparés comme indiqués dans le **tableau 10**. Ils sont ensuite stérilisés par un autoclavage de 20 min à 120°C sous pression de vapeur saturante. L'ajout de composés thermosensibles (antibiotiques, lait et jaune d'œuf) est réalisé dans les milieux maintenus en surfusion en conditions stériles.

1.2.3 Conditions de culture

1.2.3.1 *Les pré-cultures*

Les précultures sont réalisées directement à partir du souchier par ensemencement d'un tube contenant 5 mL de milieu (1/10^{ème} du volume). Pour les mutants, un isolement est effectué au préalable sous pression de sélection d'antibiotique, puis le milieu est ensemencé à partir de colonies isolées. Les conditions de cultures de la préculture sont rigoureusement identiques à celles requises pour les cultures (température, agitation/oxygénation).

1.2.3.2 *Les cultures*

L'ensemencement des cultures est réalisé à partir de la préculture de manière à obtenir une DO_{580nm} initiale de 0,06. Les cultures se font en erlenmeyer avec un rapport volume de culture / volume de l'rlenmeyer de 1/10^{ème}, dans des bains thermostatés à agitation orbitale (New Brunswick, USA), et sur une gamme de température comprise entre 8°C et 37°C.

La croissance peut être suivie au cours du temps par des mesures régulières de la DO₅₈₀ (Spectrophotomètre spectronic 601), proportionnelle à la densité de la suspension cellulaire. Ces données permettent de tracer la courbe de la croissance bactérienne ($\text{Log (DO}_{580}\text{)=f (t)}$), et d'en déduire le temps de génération ou de doublement (G, exprimé en h) et le taux de croissance (μ , exprimé en h⁻¹) sur la phase exponentielle de croissance, ainsi que la DO_{580nm} maximale atteinte.

1.2.3.3 *Les cultures sur milieux solides*

Les isolements et repiquages des souches sont réalisés sur le milieu LBG. Les boîtes sont incubées 24h à 28°C. Les géloses au sang, à l'œuf, au lait ou KBG sont incubées plusieurs jours à 28°C ou 37°C.

2 Détermination des fréquences de variation phénotypique

Le protocole de détermination des fréquences de variation des souches a été adapté de la méthode décrite par Van den Broek *et al.* (2003 ; 2005). Les bactéries sont isolées sur milieu KBG. Après 24h d'incubation à 28°C, une colonie est reprise dans 20 mL de KB contenu dans un erlen d'une capacité de 250 mL. Une numération initiale est réalisée en étalant les dilutions appropriées sur milieu KBG et les boîtes sont incubées 3 jours à température ambiante. L'rlen est incubé 72h à 28°C ou 37°C sous agitation (180 rpm). Au bout des 72h, on réalise une numération bactérienne en étalant les bactéries sur KBG et les boîtes sont incubées 3 jours à température ambiante.

Après incubation, on compte le nombre total de colonies (> 1500) et le nombre de colonies présentant un phénotype translucide. Les fréquences sont déterminées en rapportant le nombre de variants au nombre de colonies totales dénombrées, et par génération bactérienne. L'étalement des bactéries peut également être réalisé sur gélose au lait où l'on apprécie directement le caractère protéase des bactéries.

3 Dosage des activités extracellulaires

3.1 Préparation des échantillons

L'ensemble des dosages a été effectué sur les surnageants de cultures bactériennes âgées de 15 G. Les cultures sont centrifugées 15 minutes à 7500 g (Centrifugeuse Sorvall RC-5B), puis les surnageants sont filtrés sur membrane millipore de 0,22 μ m (filtres Sartorius, Millipore). Quand cela est précisé, les surnageants sont concentrés sur filtre Amicon Ultra-15 (seuil de coupure de 10 kDa) de Millipore.

Pour les cinétiques, des prélèvements sont réalisés tout au long de la croissance bactérienne et sont préparés dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment.

3.2 Dosage de l'activité hémolytique sécrétée

3.2.1 Préparation des hématies

Le dosage est réalisé avec des hématies de mouton fournies par Eurobio (France). Les hématies sont lavées trois fois dans du tampon PBS pH 7,4 (NaCl 8 g.L⁻¹, KCl 0,2 g.L⁻¹, Na₂HPO₄.2H₂O 2,21 g.L⁻¹, KH₂PO₄ 0,8 g.L⁻¹), et resuspendues dans du milieu RPMI-1640 sans indicateur coloré pH (Sigma) de manière à obtenir une densité finale de 5.10⁸ hématies par mL.

3.2.2 Dosage de l'activité hémolytique sécrétée

Le dosage est réalisé en tubes Eppendorf® contenant 600 µL d'hématies à 5.10⁸/mL et 600 µL de surnageant de culture. Les tubes sont placés au bain thermostaté à 37°C pendant 2h. Le relargage de l'hémoglobine est déterminé par mesure de l'absorbance à 540 nm, après centrifugation des tubes pendant 8 minutes à 10000 g et à 4°C. L'activité hémolytique est exprimée en pourcentage de lyse et a été calculée selon la formule suivante :

$$\% \text{ AH} = (X-B) * 100 / (T-B)$$

- B représente le contrôle négatif de la lyse des hématies dans le milieu LB. Il est obtenu en ajoutant 600 µL d'hématies à 5.10⁸/mL et 600 µL de milieu LB stérile.
- T représente un contrôle positif (100 % de lyse) et est obtenu par le mélange de 600 µL d'hématies à 5.10⁸/mL et 600 µL de LB/SDS 0,1 %.
- X est l'absorbance à 540 nm de l'échantillon.

Chaque dosage a été réalisé trois fois sur au moins trois cultures indépendantes.

3.2.3 Effet du D609 sur l'activité hémolytique sécrétée

30 µL de D609 2 mM sont ajoutés à 570 µL de surnageant de culture (la concentration finale de D609 est de 1 mM). Les tubes sont maintenus à température ambiante pendant 1 heure, puis mis en contact avec les 600 µL d'hématies. Le témoin T0 contient 570 µL de LB et 30 µL d'eau distillée stérile. Le dosage est celui présenté dans le paragraphe précédent.

3.3 Dosage de l'hydrolyse du p-nitrophénylphosphorylcholine (pNPPC)

3.3.1 Préparation des échantillons et dosage

L'activité phospholipase C du surnageant de culture a été estimée par un dosage colorimétrique utilisant le substrat chromogène *p*-nitrophénylphosphorylcholine (pNPPC, de Fluka). Le tampon de réaction est constitué de pNPPC 100mM, de tampon Tris-HCl 250 mM (pH 7,2), de glycérol 60 % (w/w), de ZnCl₂ 1µM, et de CaCl₂ 10mM. Le milieu réactionnel est composé de 80µL de tampon de réaction et de 20µL de surnageant de culture concentré. Le mélange est placé pendant 3h à 37°C, puis la réaction est arrêtée par l'addition de 200µL de tampon carbonate de sodium 0,4 M pH 10. L'absorbance du pNPP formé est mesurée à 405 nm après ajout de 600µL d'eau distillée. L'activité est exprimée en µmoles de pNP formé par heure.

3.3.2 Influence du pH sur l'activité pNPPC et de la température d'incubation

Pour mettre en évidence l'influence du pH sur l'activité pNPPC, le dosage se déroule comme détaillé dans le paragraphe précédent en faisant varier le pH du milieu réactionnel sur une gamme de 3 à 8,5. Pour la gamme de pH de 3 à 5,8, le tampon de réaction est composé de tampon citrate 250 mM à la place du tampon Tris-HCl. Pour les pH 6,5 à 8,5, du tampon Tris-HCl 250 mM a été utilisé.

Pour déterminer la température optimale d'hydrolyse du pNPPC par le surnageant, le milieu réactionnel est incubé pendant 3h sur une gamme de température comprise entre 4°C et 60°C.

3.3.3 Influence du D609 sur l'activité pNPPC

Une gamme de 2 mM à 20 mM de D609 est préparée en eau distillée. 1 µL de D609 est ajouté à 19 µL de surnageant de culture concentré et maintenu à température ambiante pendant une heure (concentration finale de D609 comprise entre 0,1 et 1 mM). Les 20 µL sont ensuite dosés avec le substrat pNPPC comme précisé plus haut.

3.4 Dosage du KDO dans le surnageant de culture

L'acide 2-kéto-3-déoxyoctulonique (KDO) est présent au niveau cellulaire uniquement au sein du core interne du LPS. Son dosage permet donc une évaluation indirecte de la quantité de LPS présent. Le dosage est réalisé selon le protocole décrit par Karkhanis sur le surnageant de culture concentré (Karkhanis *et al.*, 1978). Le surnageant est dans un premier temps hydrolysé pendant 30 minutes à 100°C en présence d'acide sulfurique 0,2 N. Après refroidissement et centrifugation (13000g, 5 min), 0,5mL sont prélevés et incubés 20 minutes en présence de 0,25mL d'acide périodique 0,04 M/acide sulfurique 0,125 N. 0,25mL d'arséniate de sodium 2,6% / acide chlorhydrique 0,5 N sont ensuite ajoutés, et une coloration transitoire brune apparaît. Après ajout de 0,5mL d'acide thiobarbiturique 0,6%, le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 min. Le chromophore rouge formé est stabilisé avec 1mL de diméthylsulfoxyde (DMSO). Le dosage s'effectue par mesure de l'absorbance à 548 nm, contre une gamme étalon préparée à partir de KDO lyophilisé (Sigma), solubilisé extemporanément dans l'acide sulfurique 0,2 N.

3.5 Mesure de l'activité protéolytique du surnageant de culture

L'activité protéolytique a été dosée par l'azocaséïne. 500 µL d'azocaséïne (Sigma) à 0,5% (m/v) préparée dans du tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8 sont ajoutés à 500 µL de surnageant de culture. Le mélange est incubé 30 minutes à 37°C et la réaction est stoppée par 1 mL d'acide trichloroacétique à 10%. Le mélange est refroidi à -20°C pendant 10 minutes et centrifugé 20 minutes à 5000g (centrifugeuse Biofuge fresco, Heraeus). 500 µL de surnageant sont prélevés et ajoutés à 500 µL de NaOH 1 N, puis l'absorbance est mesurée à 440 nm. Pour le blanc, le surnageant de culture est remplacé par du milieu de culture stérile. La pyoverdine absorbant à 440nm, un témoin est réalisé dans lequel on remplace l'azocaséïne par de l'eau.

4 Etude des flagelles bactériens

4.1 La mobilité bactérienne

4.1.1 Mobilité de type swimming

Le swimming est réalisé sur des boîtes de Pétri de 140 mm diamètre contenant 50 mL de milieu LBG gélosé à 0,3 % (m/v, agar). Les bactéries sont au préalable isolées sur milieu LBG et incubées 24h à 28°C. Une colonie est piquée au cure-dent et inoculée dans la partie superficielle de la gélose. Au total 3 colonies par souche sont repiquées, chacune sur 3 boîtes de Pétri indépendantes (n=9). Les boîtes sont incubées à 28°C et le diamètre des auréoles est mesuré après 16h, 24h et 40h d'incubation.

4.1.2 Mobilité de type swarming

Le swarming est réalisé sur des boîtes de Pétri de 140 mm diamètre contenant 50 mL de milieu LBG gélosé à 0,6 % (m/v, agar). Les bactéries sont isolées sur milieu LBG et incubées 24h à 28°C. Une colonie est prélevée et resuspendue dans 500 µL d'eau physiologique stérile (9 g/L de NaCl). 5 µL de suspension bactérienne sont déposés à la surface de la gélose et les boîtes sont mises à incuber à 28°C. Pour chaque bactérie, on réalise 3 suspensions bactériennes que l'on dépose sur 3 boîtes de Pétri indépendantes. Les boîtes sont incubées à 28°C et le diamètre des auréoles est mesuré après 16h, 24h et 40h d'incubation.

4.2 Capacité à former des biofilms

La capacité à former des biofilms est adaptée de la technique décrite par O'Toole et Kolter (O'Toole et Kolter, 1998b). Les biofilms sont réalisés sur des plaques à microtitration de 96 trous type ELISA (Sero-Well, Bibby Sterilin Ltd., Angleterre). Les bactéries sont isolées sur milieu LBG, et incubées à 28°C pendant 24h. Pour chaque bactérie, on réalise 3 suspensions bactériennes à une DO_{580nm} de 0,4 (~ 2. 10⁸ bactéries / mL) et on dépose 100 µL de suspension par trou (3 trous/suspension). Les plaques sont ensuite incubées 24h à 28°C ou 37°C. Après 3 rinçages avec 150 µL/trou d'eau physiologique, les bactéries sont colorées au cristal

violet 0,1 % (100 µL/puits). Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, les puits sont de nouveau rincés 3 fois à l'eau physiologique (150 µL/puits).

Les bactéries fixées dans les puits sont lysées par ajout de 100 µL de SDS 1 %. L'absorbance à 595 nm, proportionnelle au nombre de bactéries fixées, est mesurée pour chaque puits à l'aide d'un lecteur de microplaques (Microplaques reader 680, BioRad).

Les résultats sont exprimés en % d'adhésion par rapport à la souche de référence MFN1032 (100 % d'adhésion à 28°C).

4.3 Visualisation des flagelles en microscopie électronique

La visualisation des flagelles bactériens a été réalisée en collaboration avec le laboratoire d'Anatomie Pathologique du CHU de Rouen.

La visualisation est réalisée par une coloration négative à l'acide phosphotungstique inspirée de celle décrite par Givaudan (Givaudan *et al.*, 1995). Après 16h de culture à 28°C en milieu LB, les bactéries sont fixées (v/v) par une solution de Karnofsky modifiée (glutaraldéhyde 2,5 %, paraformaldéhyde 1% dilué dans du tampon cacodylate de sodium à 0,15 M pH 7,4) pendant au moins 10 minutes. Une goutte du mélange est déposée sur une grille de nickel (200 mesh) pendant 10 minutes et les grilles sont rincées 3 fois dans de l'eau ultrapure. Après un séchage d'1h à 37°C, les grilles sont immergées pendant 10 secondes dans l'acide phosphotungstique à 0,5 % (m/v). L'observation des grilles a été réalisée sur le microscope électronique (Philips CM10).

5 Production et caractérisation des biosurfactants

5.1 Test qualitatif de l'étalement de la goutte d'eau

Une goutte d'eau est déposée sur une surface hydrophobe (plastique d'une boîte de Pétri par exemple). Sur cette goutte, on vient déposer une goutte de surnageant de culture filtré (concentré ou non) et on observe si l'ensemble se maintient ou s'étale sur le support. L'étalement de la goutte montre l'activité tensio-active du surnageant testé.

5.2 Analyse des surnageants par HPLC/MS

5.2.1 Les échantillons

Les surnageants filtrés de culture âgées de 15 G en milieu LB sont dilués au ½ par un mélange eau / acétonitrile / acétate d'ammonium 10/90/4mM.

5.2.2 La séparation HPLC

Une chaîne HPLC Agilent Technologie Série 1100 (Hewlett Packard) constituée d'un dégazeur à vide, d'une pompe binaire et d'un passeur d'échantillons a été utilisée. 20 µL d'échantillon ont été injectés dans une colonne C18 (Hypersil ODS, 2.1 x 200 mm, taille de particules 5 µm). Deux solvants d'élution, **A** (eau/acétonitrile/acétate d'ammonium 65/35/4 mM) et **B** (eau/acétonitrile/acétate d'ammonium 10/90/4mM) ont été utilisés en gradient. Le gradient est composé de 100 % de A pendant 4 min puis on effectue un gradient linéaire de 0 à 27,3 % de B (eau/acétonitrile 50/50) pendant 5 minutes. On termine par un profil isocratique à 27,3 % de B pendant 11 minutes et un gradient de 37,3 à 100 % de B en 35 min. Le débit est fixé à 0.4 mL/min et l'éluat est fractionné par une vanne Upchurch (1/10^{ème} est dirigé vers le détecteur).

5.2.3 La détection par spectrométrie de masse

Les composés séparés par HPLC sont détectés par un spectromètre de masse (modèle Esquire-LC, Bruker) constitué d'un électrospray pour l'ionisation et d'une trappe ionique pour l'analyse des ions. L'électrospray utilise l'azote pour la nébulisation (P : 15 psi) et comme gaz séchant (débit : 7 mL/min). La température de séchage est de 300° C. Les différents réglages de l'interface sont optimisés sur la valeur m/z 800 par l'emploi de la fonction Tune Smart. La pression d'hélium dans la trappe ionique est 6.10⁻⁶ mbar. La détection, en ionisation positive, est effectuée en mode Full-Scan de m/z 50 à 2000.

Tableau 11: Composition des gels SDS-PAGE

Réactifs	Gel de résolution (Vol) 10%	Gel de concentration (Vol) 7%
Acryl/bisacrylamide (30%:0,8%)	3,35 mL	1,08 mL
Tris-HCl 0,75 M, pH 8,8	2,35 mL	-
Tris-HCl 0,25 M, pH 6,8	-	1,15 mL
H ₂ O distillée	3,70 mL	2,38 mL
Temed (N,N,N',N'- tétraméthyléthylènediamine)	6 µL	3 µL
persulfate d'ammonium 1%	600 µL	380 µL

6 Méthodes analytiques des protéines du surnageant

L'étude des protéines est réalisée en parallèle des dosages de l'activité hémolytique sécrétée et de l'hydrolyse du pNPPC des surnageants de culture. La préparation des échantillons est par conséquent identique à celle décrite précédemment (centrifugation des cultures âgées de 15 G à 7000 rpm pendant 15 minutes, stérilisation des surnageants sur membrane Millipore de 0,22 µm). Les protéines sont ensuite concentrées soit par filtration (Amicon Ultra-15 de Millipore, seuil de coupure 10 kDa), soit par précipitation au sulfate d'ammonium.

6.1 Dosage des protéines du surnageant de culture

La méthode utilisée pour la quantification des protéines est le dosage de Bradford. 20 µL de surnageant concentré (Amicon) sont ajoutés à 1mL de réactif de Bradford préparé extemporanément (BioRad). Après 5 minutes à température ambiante, l'absorbance à 595 nm est mesurée contre une gamme étalon de sérum albumine bovine de 0 à 1000 µg/mL (BSA à 2 mg/mL, Boehringer).

6.2 Electrophorèse en conditions dénaturantes SDS-PAGE

L'electrophorèse est réalisée en conditions dénaturantes SDS-PAGE selon le système discontinu de Laemmli (Laemmli *et al.*, 1970). Les gels se composent d'un gel de résolution à 10 % d'acrylamide final et d'un gel de concentration à 7 % d'acrylamide. La composition de chacun des gels est résumée dans le **tableau 11** (cas d'un petit gel). Les échantillons sont repris volume à volume dans un tampon de charge (Tris-HCl 0,5M pH 6,8, de glycérol 10%, bleu de bromophénol 0,01 %, SDS 2 % et β- mercaptoéthanol 5%) et chauffés 3 minutes à 100°C.

Le gel est placé dans une cuve contenant un tampon de migration constitué de glycine 0,192 M, Trizma-Base 0,025 M et de SDS 0,1%, pH 8,3. La migration s'effectue sous ampérage constant (10 mA par gel pendant 50 minutes pour les petits gels, 30mA par gel pendant environ 5 heures pour les grands).

6.3 Electrophorèse en conditions non dénaturantes (ND-PAGE)

Un gel de polyacrylamide à 9% est préparé en tampon Tris-HCl 0,38 M pH 8,9. Les échantillons sont repris volume à volume dans un tampon de charge Tris-HCl 0,38 M pH 8,9 contenant 10% (v/v) de glycérol et 0,01 % (m /v) bleu de bromophénol. Le gel est placé dans une cuve contenant un tampon de migration constitué de glycine 38 mM et le pH est ajusté à 8,3 avec du Tris. La migration s'effectue sous ampérage constant (60 mA, 30W et 500V pendant 2h30 à 4°C) (BioRad).

6.4 Révélation des protéines sur le gel

La révélation des protéines s'effectue par l'une des deux méthodes suivantes.

6.4.1 Coloration au bleu de Coomassie

Les protéines sont fixées dans une solution méthanol/ acide acétique/ eau (5/ 1/ 4) contenant du bleu de Coomassie G-250 0,125% pendant une heure. La décoloration du fond du gel et la révélation s'effectuent par des bains successifs d'une heure dans des solutions méthanol/ acide acétique / eau (5/ 1/ 4, et 0,8/ 0,7/ 8,5, respectivement et successivement).

6.4.2 Coloration au nitrate d'argent

Les protéines sont fixées pendant 20 minutes dans une solution éthanol/ acide acétique (30:10, v/v), puis lavées 2 fois dans l'éthanol 10 % (v/v). On effectue 3 rinçages dans de l'eau distillée sous agitation constante. Les protéines sont alors sensibilisées dans une solution de thiosulfate de sodium à 0,02 %, puis incubées 20 minutes dans une solution de nitrate d'argent (0,1 % m/v). La révélation se fait par des bains successifs du gel dans une solution de carbonate de sodium (1,2%), thiosulfate de sodium (0,004%) et formaldéhyde (0,01%). La coloration est arrêtée par un bain d'acide acétique 2 %. Enfin le gel est rincé 3 fois dans de l'eau distillée et peut être conservé dans du méthanol 20%.

6.5 Zymogramme de l'activité lécithinase sur gélose à l'œuf

La masse moléculaire de la phospholipase C a été déterminée par zymogramme sur gélose à l'œuf. Après migration du surnageant concentré sur un gel SDS-PAGE à 10% d'acrylamide, le gel est coloré au nitrate d'argent, rincé à l'eau 15 minutes puis déposé sur une gélose à l'œuf. Le gel peut également être déposé après migration SDS-PAGE et un rinçage à l'eau, sans étape de coloration. La gélose à l'œuf est incubée 18h à 37°C. L'activité lécithinase est révélée par l'apparition d'un précipité blanc opaque et la masse moléculaire de la protéine est identifiée par comparaison avec le marqueur de masses moléculaires (Bio Rad).

6.6 Détermination de la séquence N-terminale

6.6.1 Electrotransfert des protéines sur membrane PVDF

Une membrane de polyvinyldifluoré (PVDF, Immobilon, Millipore) est trempée pendant 2 secondes dans du méthanol, lavées 2 minutes dans de l'eau ultrapure puis équilibrée 10 minutes dans le tampon de transfert contenant du Tris-HCl 25 mM, de la glycine 192 mM, du méthanol 20% et du SDS 0,1 %, pH 8,3. Après migration électrophorétique SDS-PAGE, les gels de polyacrylamide sont équilibrés 15 minutes dans le tampon de transfert. L'ensemble gel / membrane est comprimé entre deux blocs de Scotch-Brite®. Le transfert des protéines s'effectue sous voltage constant de 100V et sous un courant de 0,5 A pendant 5h (Trans-blot cell, BioRad).

6.6.2 Révélation des protéines

La membrane de PDVF est colorée 5 minutes dans une solution méthanol/ acide acétique/ eau (5/ 1 / 4) contenant du Bleu de Coomassie 0,125 %. La décoloration s'effectue dans la même solution sans Bleu de Coomassie. La membrane est ensuite séchée à l'air libre.

6.6.3 Microséquençage chimique des protéines

Après transfert sur membrane PVDF et coloration au Bleu de Coomassie, les protéines d'intérêt sont découpées et séquencées par application de la dégradation d'Edman (492 automated Protein Sequencer, Applied Biosystems).

II- Techniques de biologie moléculaire

1 Extraction des acides nucléiques

1.1 Extraction du chromosome bactérien

25 mL de culture bactérienne en phase stationnaire sont centrifugés à 6000 rpm pendant 10 minutes (Sorvall RC-5B). Le culot est repris dans 9,5 mL de tampon Tris-HCl 10 mM pH 8 / EDTA 1 mM / NaCl 10 mM, 0,5 mL de SDS 10%, 50 µL de protéinase K (20 mg/mol) et incubé à 50°C pendant 4h. 10 mL de phénol-chloroforme (1/1, v/v) sont ajoutés et l'ensemble est mélangé au vortex et centrifugé à 12000 rpm pendant 15 minutes. La phase supérieure est délicatement prélevée et 10 mL (1/1, v/v) alcool isoamylique (12/1, v/v) sont ajoutés.

Après centrifugation à 12000 rpm pendant 15 minutes, 10 mL d'éther sont ajoutés à la phase supérieure. Une dernière centrifugation est réalisée et l'ADN est récupéré dans la phase inférieure. L'ADN est précipité à l'éthanol absolu à froid (2v) et le tube est centrifugé à 12000 rpm pendant 15 minutes. On réalise un lavage avec 10 mL d'éthanol 70 % froid et après une dernière centrifugation, le culot d'ADN est séché, resolubilisé dans 1 mL d'eau distillée stérile et congelé à -20°C.

1.2 Extraction plasmidique

L'extraction plasmidique à partir de culture *E. coli* a été réalisée par la technique « miniprep ». 1,5 mL d'une culture de 16h est centrifugé 5 minutes à 5000g et le culot est repris dans 100 µL de GTE (Glucose 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM pH8). Les bactéries subissent ensuite une lyse alcaline par l'addition de 200 µL d'une solution de NaOH 0,2 N/ SDS 5% pendant 5 minutes. La soude permet une dénaturation des acides nucléiques, en priorité de l'ADN chromosomique. Pour ne pas dénaturer l'ADN plasmidique, au bout des 5 minutes on ajoute 150 µL d'acétate de potassium 3 M afin de neutraliser le pH et de précipiter le SDS. Après agitation et 5 minutes dans la glace, les protéines et acides nucléiques précipités sont éliminés par centrifugation à 4°C pendant 5 minutes à 17500g. L'ADN plasmidique est ensuite précipité par 0,6 volume d'isopropanol pendant 10 minutes à

température ambiante. Après 5 minutes de centrifugation à 17500g, le culot est lavé par une solution d'éthanol glacée à 70% en eau, séché à température ambiante et repris dans de l'eau.

Pour l'extraction plasmidique de souches de *Pseudomonas*, on utilise le kit de miniprep « Qiaprep Spin miniprep kit » de Qiagen (France). Après la lyse alcaline des bactéries, l'ADN contenu dans la phase aqueuse est déposé sur une colonne de silicate. L'ADN retenu sur la colonne est ensuite lavé et élué à l'eau selon les instructions du fabricant.

Les plasmides obtenus sont conservés à -20°C.

2 Manipulation des fragments d'ADN

2.1 Amplification par PCR

Les fragments correspondants aux gènes recherchés ont été amplifiés par PCR (Polymerisation Chain Reaction), en utilisant des amorces consensus obtenues après alignement des séquences par Clustal W (**Tableau 12**).

Les programmes d'amplification utilisés pour les différents fragments sont présentés dans le **tableau 13**.

Dans tous les cas, un mélange PCR de 25 µL a été préparé de la façon suivante :

dNTP à 2,5 mM	2 µL
Tampon 10X	2,5 µL
Amorce sens à 10 µM	2 µL
Amorce antisens à 10 µM	2 µL
ADN	2 µL
Taq DNA pol (Roche)	1 U
H ₂ O distillée stérile	qsp 25 µL

L'amplification est effectuée dans un thermocycleur (Perkin Elmer, GeneAmpPCR system 2400).

Tableau 12: Noms et séquences des amores utilisées pour le séquençage du gène *plcC* et de ses régions amont et aval

Gène à amplifier	Amorce « sens » (5' → 3')	Amorce « antisens » (5' → 3')	Taille attendue des fragments
PlcC	plc1- ATGTCAGGTCTTGAACTCGCA	plc2-TTAGTTGGCGGGTTGGTTT	~ 1150 pb
PlcC +Région amont	plc0- GGTGGAAATCACCCCTGG	plc2-TTAGTTGGCGGGTTGGTTT	~ 1400 pb
Région aval	plc- GCAAGGACGTCAACGATTG	GntR- CCGAGTCGGCGATCATG	~ 1000 pb

Tableau 13: Programmes PCR utilisés pour l'amplification du gène *plcC* et des régions amont et aval

	Amplification par plc0/1-plc2		Amplification par plc-GntR	
	94°C	2 min	94°C	2 min
30 cycles	$\left\{ \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \\ \textbf{55}^{\circ}\text{C} \\ 72^{\circ}\text{C} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ min} \\ 30 \text{ sec} \\ 1 \text{ min 30s} \end{array} \right.$	30 cycles	$\left\{ \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \\ \textbf{58}^{\circ}\text{C} \\ 72^{\circ}\text{C} \end{array} \right.$
	72°C	10 min	72°C	10 min

Dans le cas de PCR sur colonie, les colonies sont piquées au cure-dent et resuspendues dans 50 µL d'eau distillée stérile. Après 5 minutes à 100°C, le tube est centrifugé 5 minutes à 6000 rpm et l'ADN est prélevé dans le surnageant.

2.2 Digestion enzymatique

Les enzymes de restriction utilisées pour digérer l'ADN sont des endonucléases clivant l'ADN double brin au niveau de sites de reconnaissance spécifiques à l'enzyme. Elles sont utilisées selon les instructions du fabricant (Roche, France). Les conditions d'incubation varient selon l'enzyme, mais la plupart des enzymes ont une activité optimale à 37°C. L'arrêt de la digestion s'effectue par la chaleur (65°C, 10 minutes) ou par ajout du tampon de charge pour la migration sur gel.

2.3 Electrophorèse d'ADN

Les fragments d'acides nucléiques sont séparés par électrophorèse horizontale en gel d'agarose dans du tampon TAE (Tris 40 mM, acide acétique 0,1%, EDTA 2 mM, pH 8,5). La concentration en agarose dépend de la taille des fragments à amplifier. Dans la majorité des cas, on utilise des gels d'agarose à 1% dans du TAE. Les échantillons sont déposés sur le gel après ajout d'un tampon de charge (1/10, v/v) (bleu de bromophénol 0,25 %, xylène cyanol FP 0,25 %, glycérol 30 %). Après une migration à 100V, les gels sont plongés dans un bain de bromure d'éthidium ($1\mu\text{g.mL}^{-1}$) qui se fixe sur les acides nucléiques, pendant 10 à 15 minutes. Les gels sont ensuite visualisés sous UV (312 nm) à l'aide d'une caméra (BioRad).

2.4 Extraction et purification de fragments d'ADN

Après migration sur un gel d'agarose, les bandes de taille attendue ont été découpées du gel sous UV et purifiés à l'aide d'une colonne Amicon ultra Free DNA (Millipore) après 10 minutes de centrifugation à 5000 rpm. L'ADN est ensuite visualisé sur un gel d'agarose.

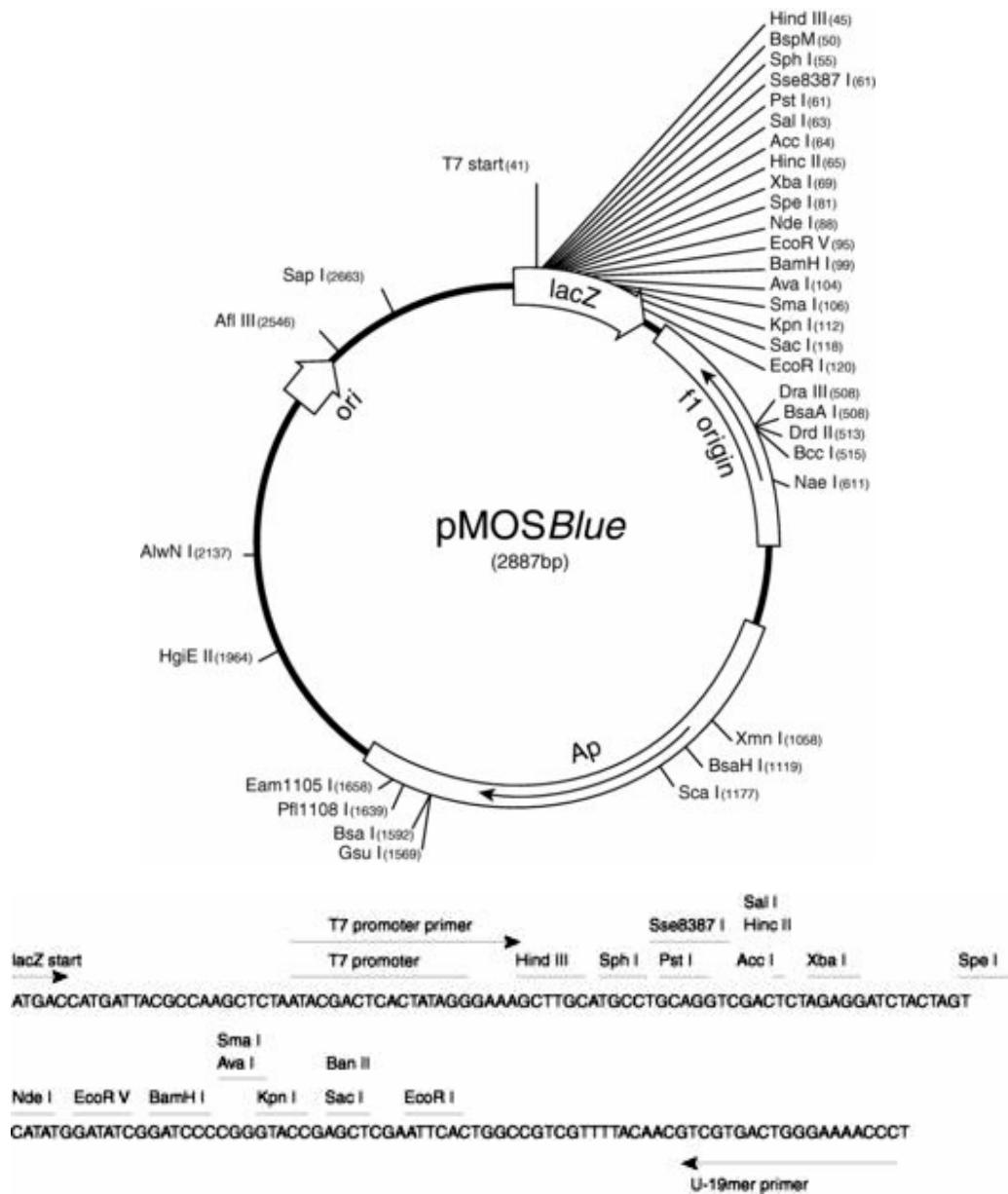


Figure 18: Carte du vecteur pMOSBlue.

3 Clonage

3.1 Sous clonage

Le sous-clonage des fragments d'ADN a été réalisé à l'aide du kit « pMosBlue blunt ended cloning kit » développé par Amersham Biosciences (**Figure 18**), selon les instructions données par le fournisseur. Ce kit permet l'insertion de fragments d'ADN dans le vecteur pMosBlue. Brièvement, les fragments d'ADN sont phosphorylés pendant 40 minutes à 22°C. Le vecteur pMosBlue est quant à lui vendu digéré par EcoRV (bouts francs) et déphosphorylé. La ligature est réalisée sur la nuit à 22°C. L'insertion de l'insert dans le vecteur au niveau de la cassette de multiclonage interrompt le gène *lacZ* codant la β -galactosidase. Après transformation des cellules Mos compétentes, les bactéries sont étalées sur milieu LBG sélectif (Ampicilline 100 μ g/mL, X-Gal 24 μ g/mL, IPTG 40 μ g/mL). Après incubation, les colonies blanches sont repiquées sur milieu sélectif et vérifiées par PCR (PCR sur colonie) ou par extraction plasmidique et digestion enzymatique pour contrôler la taille de l'insert.

3.2 Séquençage

Le séquençage des différents fragments d'ADN a été réalisé par la société Génome Express (Meylan, France).

3.3 Clonage

3.3.1 Transformations

3.3.1.1 Transformation des cellules *E. coli*

➤ Préparation de cellules compétentes de *E. coli*

Les cellules de *E. coli* (S17.1 et DH5amcr) sont rendues compétentes par un traitement au chlorure de calcium. 25 mL de culture en phase exponentielle de croissance ($D_{0.580\text{nm}}$ entre 0,6 et 0,8) sont centrifugés pendant 5 minutes à 4°C et à 7500 g. Le culot est repris dans 10 mL de CaCl_2 0,05 M froid et laissé dans la glace pendant 15 à 20 minutes puis centrifugé à 4°C pendant 5 minutes à 7500 g. Le culot

est repris délicatement dans 2 mL de Ca Cl₂ 0,05 M froid. Les cellules sont placées dans la glace toute la nuit. Le lendemain, les bactéries sont aliquotées et prêtes pour la transformation. Le reste des cellules peut être congelé à -80°C pour les transformations ultérieures.

➤ Transformation des cellules par choc thermique

La transformation est réalisée en ajoutant 3 à 5 µL de plasmide ou de réaction de ligature à 100 µL de cellules compétentes. Après 25 minutes dans la glace, les bactéries subissent un choc thermique par passage à 42°C pendant 40 secondes. Après 10 minutes de refroidissement à température ambiante, on ajoute 1 mL de LB et les bactéries sont incubées pendant au moins 2h à 37°C sous agitation (expression phénotypique). Les bactéries sont ensuite étalées sur milieu sélectif approprié par rapport au vecteur.

3.3.1.2 Transformation chez *Pseudomonas* par électroporation

➤ Préparation de cellules compétentes de *Pseudomonas*

La technique de Enderle et Farwell a été utilisée pour préparer les cellules électrocompétentes de *Pseudomonas* (Enderle et Farwell, 1998). Les bactéries sont prélevées sur une boîte fraîche (24h de croissance sur LBG sans passage au froid) et lavées deux fois dans 500 µL d'eau distillée stérile. Le culot bactérien est ensuite repris dans 40 µL d'eau stérile et les tubes sont mis dans la glace.

➤ Transformation de *Pseudomonas* par électroporation

La transformation par électroporation consiste à rendre les cellules perméables à l'ADN au moyen d'une décharge électrique. 10 µL de plasmide sont ajoutés aux 40 µL de cellules compétentes. Après 10 minutes dans la glace, le mélange est transféré dans une cuve à électroporation préalablement refroidie à -20°C sur laquelle est appliquée une décharge électrique de 1800V pendant 5 millisecondes (Gene transformer GTF100, Savant). Le mélange est repris par 1 mL de LB et mis à incuber pendant au moins 2h à 28°C sous agitation. Les transformants sont sélectionnés sur milieu LB contenant les antibiotiques appropriés.

3.3.2 Construction d'un mutant de surexpression *plcC*

Le gène de la phospholipase C *plcC* a été amplifié à partir du jeu d'amorce *plc0/plc2* qui permet d'obtenir la région codante de la protéine et une région amont de 250 pb. Le gène a ensuite été sous cloné dans le vecteur pMosBlue. A partir du vecteur, on procède à une digestion enzymatique de l'insert par les enzymes de restriction Hind III et BamHI. L'insert digéré est mélangé dans un rapport 1/3 au vecteur pUCP20 également digéré par Hind III/BamHI, en présence d'une unité de ligase. Le pUPCP20 est un vecteur navette de surexpression chez *E. coli* et *Pseudomonas*. Le mélange de ligature est incubé sur la nuit à 4°C puis mis en contact avec les cellules DH5amcr compétentes. Après transformations, 50 à 200 µL de cellules sont étalées sur le milieu LB contenant de 100 µg/mL d'ampicilline. Les transformants sont contrôlés par extraction plasmidique et digestion enzymatique par le couple HindIII/BamHI et le plasmide est baptisé pMF36. Dans un deuxième temps, on procède à la transformation par électroporation des cellules de *P. fluorescens* par pMF36 (paragraphe 3.3.1.2). Les transformants sont sélectionnés sur milieu LBG contenant de la mezlocilline à 500 µg/mL et contrôlés par PCR et/ ou par extraction plasmidique et digestion enzymatique par le couple HindIII/BamHI. Le clone sélectionné, MFN1036, est ensuite cultivé sur milieu LB/LBG contenant 500 µg/mL de Mezlocilline et de l'IPTG (200 mM).

3.3.3 Mutagenèse par insertion chromosomique dans le gène *plcC*

3.3.3.1 Construction du vecteur suicide pME3087 portant le gène *plcC* tronqué : pMF1034

Le gène *plcC* a été amplifié par PCR à l'aide des amorces *plc1/plc2*. Le fragment d'ADN obtenu a été digéré par le couple d'enzyme EcoRI/HindIII pour générer un fragment de 1 kb correspondant au gène *plcC* déleté en 3'. Ce fragment a ensuite été cloné dans le vecteur pME3087, plasmide réplicatif chez *E.coli* et suicide chez *Pseudomonas*. Après sélection des *E. coli* DH5amcr transformées sur milieu sélectif LBG contenant de la tétracycline (20 µg/mL), une extraction plasmidique et une digestion enzymatique de contrôle sont effectuées. Le plasmide obtenu, baptisé pMF1034, est ensuite transféré dans la souche conjugative de *E. coli* S17.1 et les clones sont sélectionnés sur milieu sélectif LBG contenant de la

tétracycline (20 µg/mL) et contrôlés par extraction plasmidique et digestion enzymatique.

3.3.3.2 Conjugaison biparentale

Le plasmide pMF1034 a été transféré chez MFN1032 par conjugaison biparentale entre MFN1032 et la souche S17.1/pMF1034. Une goutte de culture bactérienne de MFN1032 en phase stationnaire de croissance à 28°C et une goutte de culture de S17.1/pMF1034 en phase exponentielle de croissance à 37°C sont mélangées puis déposées, sans étalement, sur gélose ordinaire GNO. Après une nuit à 28°C, la colonie formée est reprise dans 500 µL d'eau physiologique et la suspension est étalée sur milieu LBG contenant de la tétracycline (20 µg/mL) et de l'ampicilline (100 µg/mL). Seules les souches de *Pseudomonas* ayant intégré le plasmide pMF1034 par simple recombinaison homologue pourront se développer sur le milieu.

La vérification des clones Tet^RAmp^R est ensuite réalisée par PCR à l'aide des amorces plc1/plc2 et plc0/plc2 et par appréciation de l'activité lécithinase sur gélose à l'œuf supplémentée de tétracycline (20 µg/mL). Pour stabiliser la mutation, les clones subissent plusieurs repiquages successifs sur LBG contenant de la tétracycline à 20 puis 40 µg/mL. Le mutant sélectionné, MFN1037, est ensuite cultivé en présence de Tétracycline à 40 µg/mL.

3.3.4 Complémentation du gène *plcC* en trans

Le mutant complémenté MFN1038 a été obtenu en transférant le plasmide pMF36 dans MFN1037 par électroporation (paragraphe 3.3.1.2). Les transformants ont été sélectionnés sur milieu LBG contenant de la mezlocilline (500 µg/mL) et de la tétracycline (40 µg/mL), vérifiés par PCR et par extraction plasmidique. MFN1038 est cultivée sur milieu contenant de la mezlocilline (500 µg/mL), de la tétracycline (40 µg/mL) et de l'IPTG (200 mM).

3.3.5 Complémentation de MFN1032 et des variants phénotypiques par les gènes *gacA* et *gacS*

Les plasmides pME6010, pMP5565 (*gacA*⁺) et pMP6562 (*gacS*⁺) ont été utilisés pour la complémentation de MFN1032 et de ses variants en *trans*. Les différents plasmides sont transférés dans les bactéries par électroporation (paragraphe 3.3.1.2) et les clones sont sélectionnés sur milieu LBG contenant de la tétracycline (40 µg/mL).

Résultats - Discussion

Partie 1 :

Identification de la souche MFN1032

1 Origine et identification de la souche

MFN1032 est une souche d'origine hospitalière collectée par les hôpitaux de Haute-Normandie. Isolée d'expectorations purulentes d'un patient atteint d'infection pulmonaire, elle a été identifiée par antibiogramme par le personnel hospitalier comme appartenant à l'espèce *Pseudomonas fluorescens*. Une identification plus approfondie a été réalisée au sein du Laboratoire de Microbiologie Du Froid par une approche taxonomique polyphasique. La démarche d'identification a été la suivante :

- test de fluorescence sur milieu King B
- réalisation d'une galerie API 20NE
- test d'assimilation des composés carbonés pour la détermination du biovar
- sidérotypage de la pyoverdine produite par la souche
- séquençage de l'ARN 16S

La souche MFN1032 produit sur KB un pigment jaune-vert, fluorescent sous UV (365nm). Par galerie API 20NE et après 24h et 48h, la souche est identifiée comme appartenant à l'espèce *P. fluorescens* à 99,8%. Les tests d'assimilation (**Tableau 14**) montrent que la souche est capable d'assimiler lalanine, le sorbitol, le xylose, le trehalose, le tryptophane et le saccharose mais ni le tartrate ni l'arabinose. Elle est lévanase⁺ et ne possède pas de nitrate réductase.

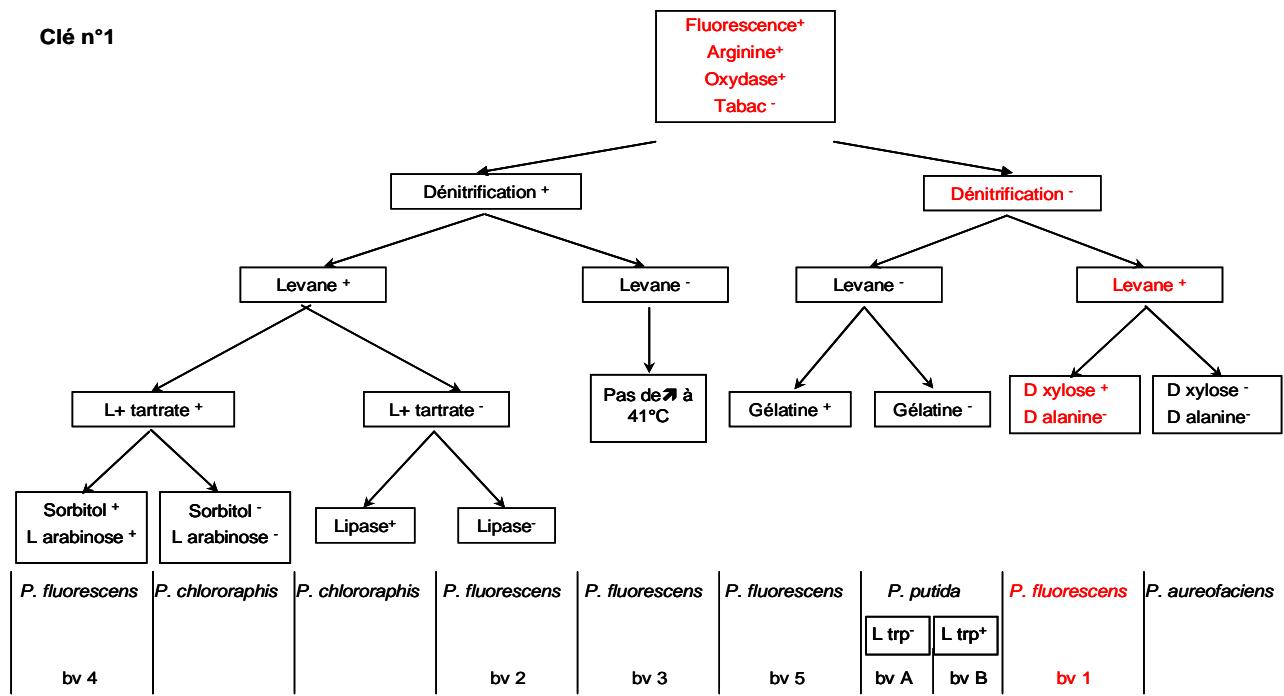
Tableau 14 : Tests d'assimilation des source de carbone par MFN1032

Alanine	+
Sorbitol	+
Tartrate	-
Xylose	+
Arabinose	-
Trehalose	+
Tryptophane	+
Saccharose	+

+: assimilation

-: absence d'assimilation

Clé n°1



Clé n°2

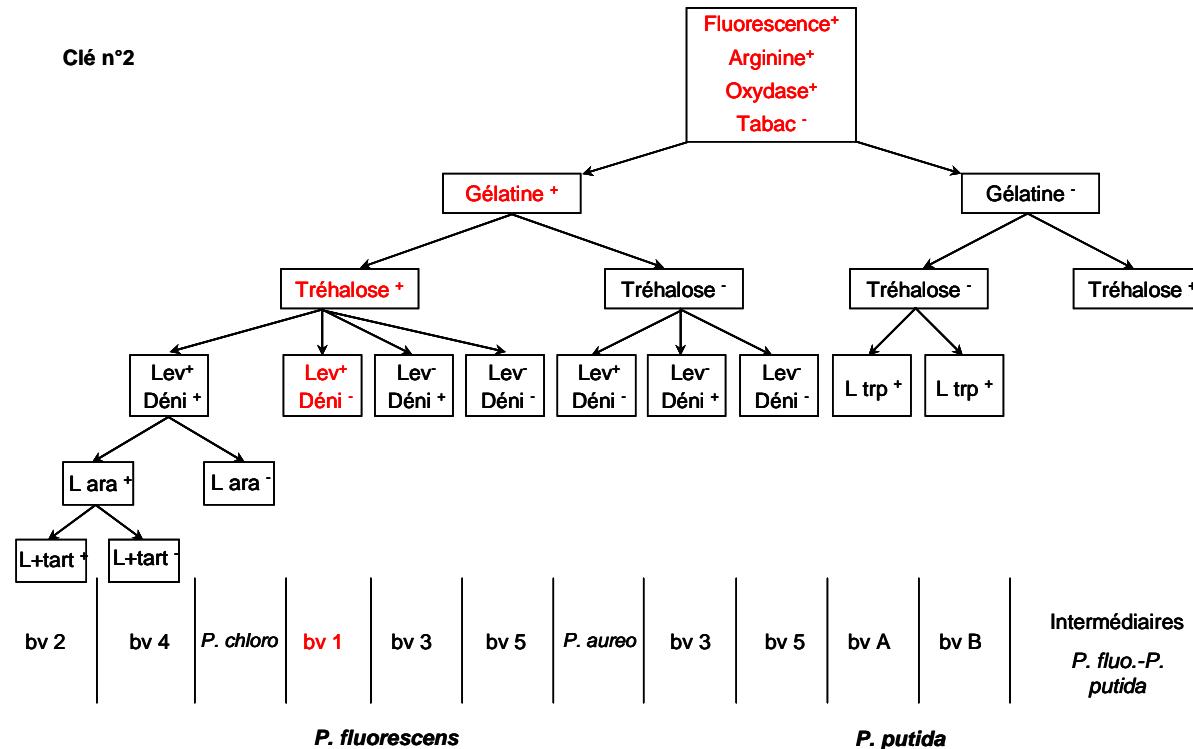


Figure 19: Clés de détermination utilisées pour l'identification des *Pseudomonas fluorescens* saprophytes, établies d'après les résultats de Stanier et al. (1966) et Palleroni (1984) par Digat et Gardan (1987) et Bossis et al. (2000). Les résultats obtenus pour MFN1032 sont indiqués en rouge. *P.aureo* : *P.aureofaciens* ; *P.chloro* : *P.chlororaphis* ; *P.fluo* : *P.fluorescens* ; bv : biovar ; L-ara : L-arabinose ; Den : dénitification ; Lev : levane ; L(+)-tar : L(+)-tartrate ; L-trp : L-tryptophane.

Si l'on se réfère aux clés dichotomiques proposées par Digat et Gardan (Digat et Gardan, 1987), il apparaît que la souche MFN1032 appartient au biovar I de l'espèce *P. fluorescens* (**Figure 19**).

Parallèlement, le laboratoire a procédé selon une démarche identique à l'identification de différentes souches d'origine hospitalière et à celle de la souche modèle du laboratoire MF37, un mutant spontanément résistant à la rifampicine de la souche MF0 isolée du lait cru. Les souches hospitalières ont été identifiées comme étant soit des *P. fluorescens* bv I (MFN1032 et MFY162), soit des *P. mosselii* (nouvelle espèce proposée par Jean-Marie Meyer regroupant des *P. fluorescens* adaptées au milieu hospitalier (Dabboussi *et al.*, 2002). MF37, comme MF0, appartient quant à elle au groupe des *P. fluorescens* bv V.

Le sidérotypage de la pyoverdine de MFN1032 a été réalisé par le professeur Jean-Marie Meyer à Strasbourg, comme décrit précédemment (Meyer *et al.*, 2002). Le profil d'isoélectrofocalisation obtenu pour la souche MFN1032 est similaire à celui de la souche de référence, *P. fluorescens* ATTC13525, et à celui de MF37.

Le séquençage partiel de l'ARN 16S de MFN1032, réalisé par Josselin Bodilis de l'Université de Rouen, confirme son identification en tant que *P. fluorescens*. La séquence présente une homologie importante avec les séquences 16S des souches de *P. fluorescens* SBW25 et ATTC13525 (Feuilloley *et al.*, 2007).

2 Caractérisation phénotypique et physiologique de la souche

2.1 Détermination des cinétiques de croissance en fonction de la température

MFN1032 est capable de pousser sur une large gamme de températures comprises entre 0 et 37°C, mais ne pousse pas à 41°C contrairement à *P. aeruginosa* et à *P. mosselii*. La **figure 20** montre l'effet de la température sur le taux

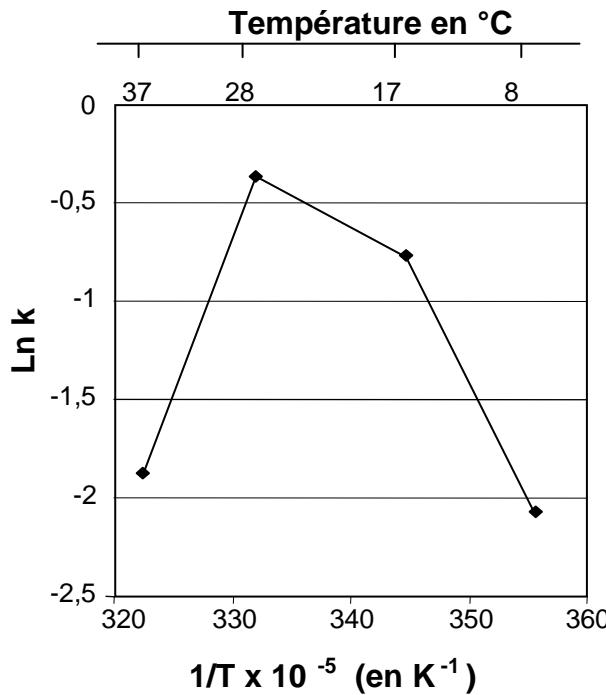


Figure 20: Courbe d'Arrhenius ($\ln k$ en fonction de la réciproque de la température absolue) de MFN1032 en milieu LB. Le taux de croissance spécifique k est exprimé en heures $^{-1}$ et la température sur l'axe des x est exprimée en Kelvin. L'équivalence en °C est reportée en haut de l'axe des abscisses.

Tableau 15: Antibiogramme de la souche MFN1032 incubée à 28°C et 37°C. L'antibiogramme a été réalisé en microgalerie ATB Pseudo selon les indications du fournisseur.

Antibiotiques	Concentrations critiques (mg/mL)	Inc. à 28°C	Inc. à 37°C
		Résistance	Résistance
Ticarcilline	16 - 64	R	R
Ticarcilline/ ac.clav	16/2 - 64/2	R	R
Ceftazidime	4 - 32	I	I
Aztreonam	4 - 32	R	I
Cefepime	4 - 32	I	I
Imipenème	4 - 8	R	R
Piper+tazobactam	16/4 - 64/4	I	I
Piperacilline	16	S	R
Colistine	2	R	S
Tobramycine	4 - 8	S	S
Amikacine	8 - 16	S	I
Gentamicine	4	S	R
Netilmicine	4	S	S
Ofloxacine	1 - 4	S	I
Ciprofloxacine	1 - 2	I	I
Fosfomycine	32	R	R
Cotrimoxazole	2/38	R	R

R: résistant; S: sensible; I: intermédiaire; Inc: incubation

de croissance spécifique de la souche MFN1032 cultivée en milieu LB (courbe d'Arrhénius).

La souche a une température optimale de croissance comprise entre 28 et 30°C. On observe une cassure autour de 17°C dans la courbe d'Arrhénius, caractéristique des micro-organismes psychrotropes (Guillou et Guespin-Michel, 1996).

2.2 Résistance aux antibiotiques

Un antibiogramme pour *Pseudomonas* a été réalisé en incubant une microgalerie ATB Pseudo à 28 °C et 37°C. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 15** et montrent que la souche résiste à de nombreux antibiotiques.

La sensibilité vis-à-vis de certains antibiotiques varie en fonction de la température d'incubation. L'aztréonam et la colistine sont plus efficaces lorsque la souche est incubée à 37°C, tandis que la bactérie résiste à la pipéracilline, l'amikacine, la gentamycine et à l'ofloxacine à 37°C et non à 28°C. La souche devient dans l'ensemble plus résistante lorsqu'elle pousse à 37°C.

2.3 Activités extracellulaires

Comme la plupart des *P. fluorescens*, MFN1032 est capable de produire un nombre important d'enzymes dégradatives. Elle possède entre autres des activités protéase, estérase, lécithinase et présente une activité β-hémolytique sur gélose au sang (**Figure 21**). MFN1032 présente donc un arsenal de facteurs de virulence potentiels assez conséquent.

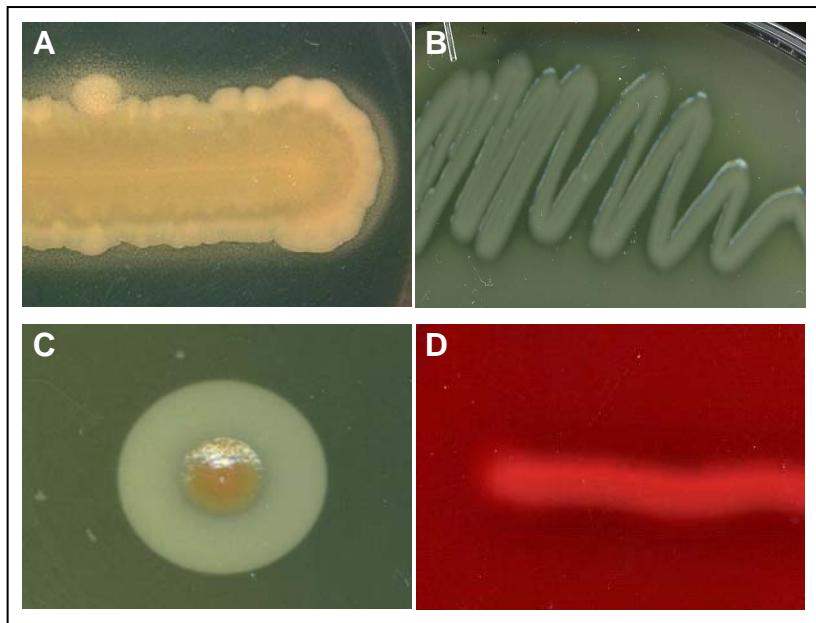


Figure 21: Activités extracellulaires de la souche MFN1032. A: activité estérase sur gélose au Tween 80; B: activité protéase sur gélose au lait; C: activité lécithinase sur gélose à l'œuf; D: activité hémolytique sur gélose au sang (Columbia). Les géloses sont ensemencées par stries (A,B,D) ou par piqûre (C). Les boîtes sont incubées 48h à température ambiante (A) ou à 28°C (B,C,D). L'activité estérase est visualisée par un précipité d'acides gras (hydrolyse du Tween 80), l'activité protéase correspond à l'éclaircissement de la gélose (dégradation des caséines du lait), l'activité lécithinase est révélée par le précipité opaque autour de la croissance bactérienne et l'activité hémolytique est révélée par un éclaircissement de la gélose.

CONCLUSION PARTIE I

La souche MFN1032, clairement identifiée comme appartenant à l'espèce *P. fluorescens*, a été retrouvée au niveau d'un compartiment normalement stérile d'un patient hospitalisé, les alvéoles pulmonaires. Capable de pousser à 37°C et de produire un nombre important de facteurs de virulence potentiels, elle présente de nombreux traits relatifs à un pathogène opportuniste. L'étude de cette souche hospitalière, du point de vue de sa virulence et de ses propriétés adaptatives, doit aider à comprendre l'émergence de cette espèce en tant que pathogène opportuniste dans les infections nosocomiales.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication (Feuilloley, 2007), présentée en annexe (Annexe 1).

La suite du travail a consisté à étudier l'activité hémolytique de la souche MFN1032, avec l'objectif de caractériser les facteurs impliqués dans cette activité.

Résultats - Discussion

Partie II : Activité hémolytique sécrétée de
la souche MFN1032

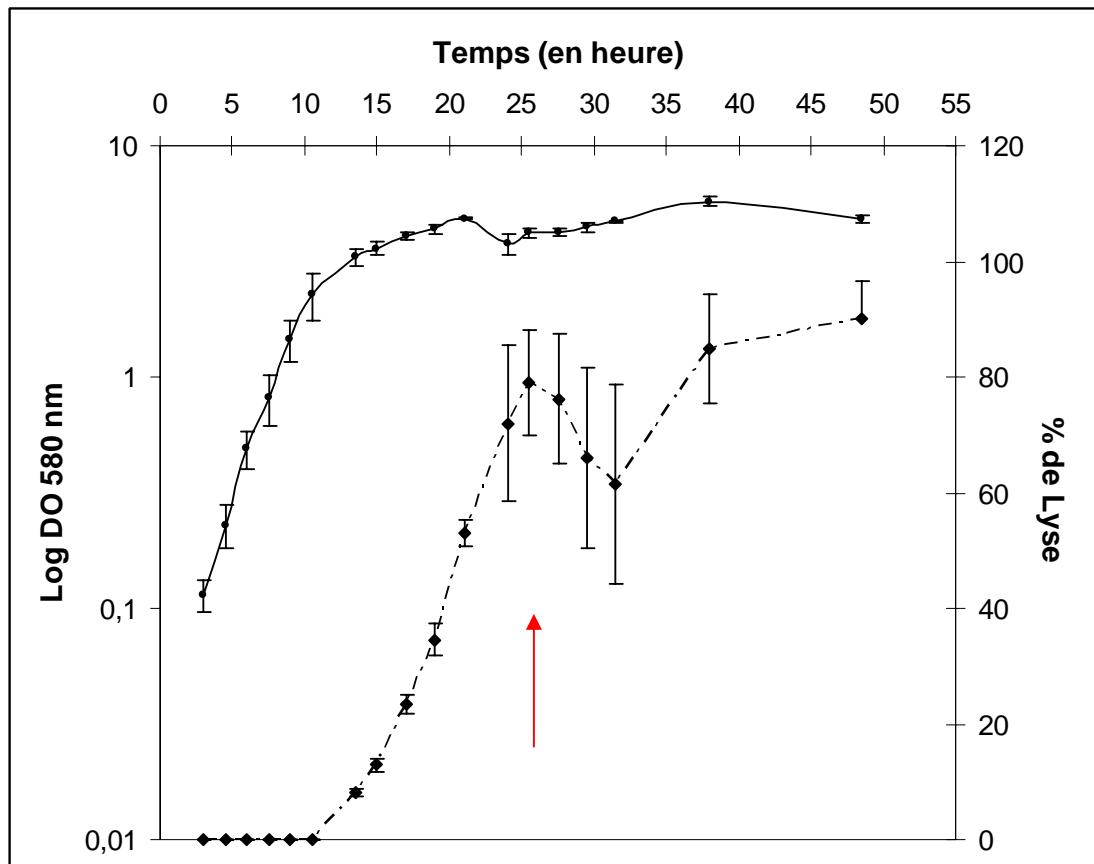


Figure 22: Suivi de croissance et de la production de l'AH-S de MFN1032.
 Les cultures ont été incubées en milieu LB à 17°C sous agitation. La croissance (●) a été mesurée par la densité optique à 580 nm et l'activité hémolytique (% de lyse) (◆) a été calculée comme décrit dans le matériel et méthodes. (n=3). La flèche rouge indique le moment choisi pour arrêter les cultures.

L'activité hémolytique des souches peut être observée sur gélose au sang. Il s'agit alors d'une activité globale, résultant principalement de la sécrétion d'hémolysines par la bactérie mais également de l'activité associée aux cellules, notamment par l'action d'un système de sécrétion de type III fonctionnel.

La souche MFN1032 produisant un nombre important d'enzymes dégradatives, l'étude des facteurs sécrétés pouvant être responsables de la lyse cellulaire a été entreprise à partir des surnageants de culture.

1 Etude de l'activité hémolytique globale sécrétée

L'étude de l'activité hémolytique sécrétée (AH-S) a été réalisée de manière quantitative par la mise au point d'un dosage inspiré de la technique décrite par Dacheux *et al.*. Le dosage a d'abord été mis au point avec la souche PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa*. Les premiers essais réalisés pour la souche MFN1032 ont montré que cette bactérie sécrétait une ou plusieurs hémolysines dans le surnageant de culture. Le milieu LB a été retenu pour cette étude car il permet d'obtenir une croissance optimale de la souche ainsi que la production de l'activité hémolytique.

L'objectif de ce travail a consisté à caractériser cette activité en déterminant le ou les facteurs sécrétés impliqués.

1.1 Cinétique de production de l'activité hémolytique sécrétée

La croissance et la production de l'activité hémolytique de la souche ont été suivies en milieu LB et à 17°C. L'activité hémolytique est détectable dès la fin de phase exponentielle de croissance et atteint rapidement 80% de lyse en phase stationnaire (**Figure 22**). L'activité diminue légèrement au cours de la phase stationnaire (60% de lyse) puis finit par remonter (90% de lyse). Il est possible que ces deux pics d'activité soient dus à des facteurs distincts.

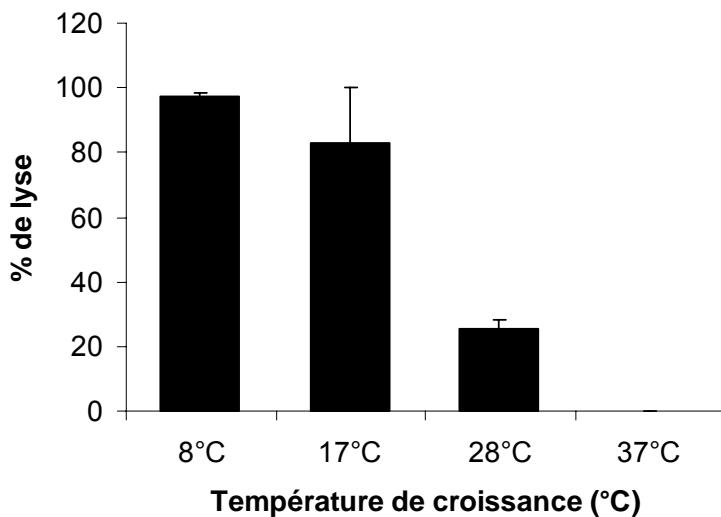


Figure 23: Effet de la température de croissance sur l'AH-S de la souche MFN1032. Le dosage est réalisé sur les surnageants de cultures obtenues en milieu LB âgées de 15 G. Les bactéries ont été incubées sur une gamme de températures comprises entre 8°C et 37°C ($n \geq 3$).

Par la suite, afin de pouvoir étudier l'activité hémolytique en faisant varier différentes conditions, nous avons décidé de toujours arrêter les cultures après un temps correspondant à 15 «générations».

1.2 Influence de la température de croissance sur l'activité hémolytique sécrétée de MFN1032

Chez *P. fluorescens*, 40% des gènes sont régulés par la température de croissance (Regeard *et al.*, 1999). Les études de l'influence de la température de croissance sur la sécrétion d'enzymes extracellulaires telles que les lipases, protéases et estérases ont montré qu'il existait une température critique (17°C) pour laquelle la production des enzymes est maximale. L'activité hémolytique de la souche MFN1032 a été déterminée sur les surnageants de cultures de MFN1032 ayant poussé entre 8 et 37°C (**Figure 23**). La lyse des hématies est maximale à 8 et 17°C (100 ± 1% et 83 ± 17% de lyses respectivement). Elle est plus faible à 28°C (25 ± 3% de lyse), et aucune activité n'est retrouvée lorsque la souche est cultivée à 37°C.

MFN1032 montre clairement une régulation basse température, en accord avec sa nature psychrotrophe. Le profil de thermorégulation obtenu est caractéristique des activités extracellulaires retrouvées chez *P. fluorescens* (Burini *et al.*, 1994; Gugi *et al.*, 1991). L'absence d'activité hémolytique à 37°C *in vitro* dans les conditions testées ne signifie pas que la souche ne présente pas cette cytotoxicité *in vivo*, où divers paramètres environnementaux peuvent induire l'activité (pH, osmolarité..). Afin de déterminer si cette activité est spécifique de cette souche clinique, le dosage a été réalisé pour différentes autres souches de *P. fluorescens* et une souche de *P. aeruginosa*.

1.3 Comparaison des activités hémolytiques sécrétées de MFN1032 et de différentes souches de *Pseudomonas*

L'activité hémolytique de la souche MFN1032 a été comparée à celles de différentes souches de *P. fluorescens* du laboratoire et à celle de *P. aeruginosa* PAO1. La souche modèle du laboratoire MF37 ne présente aucune activité

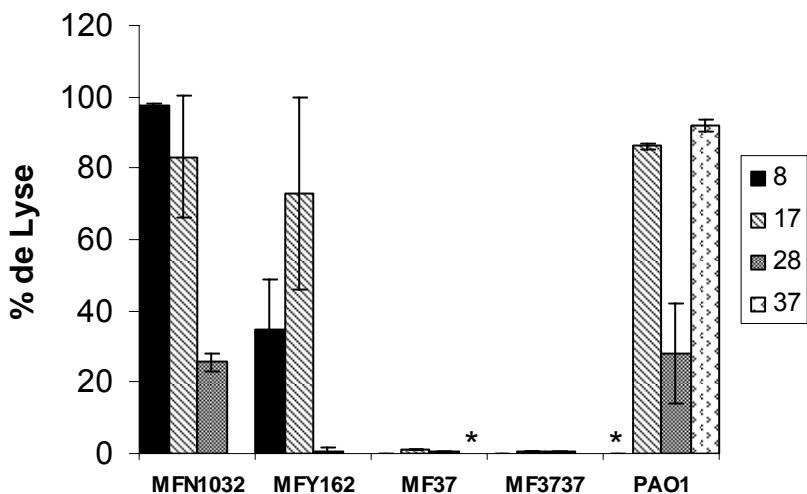


Figure 24: Comparaison de l'AH-S de MFN1032 à celles de différentes souches de *Pseudomonas*. Le dosage de l'activité hémolytique est réalisé sur les surnageants de cultures obtenues en milieu LB âgées de 15 G ($n \geq 3$). Les bactéries sont cultivées à des températures comprises entre 8°C et 37°C. (* : Non déterminé).

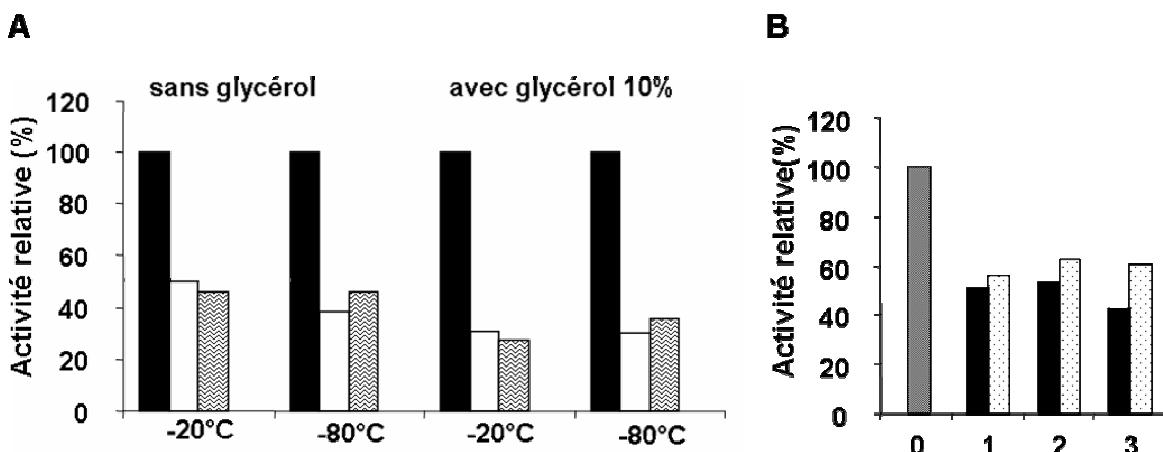


Figure 25: Effet de la congélation sur l'AH-S de MFN1032 cultivée à 28°C. Les surnageants de culture sont obtenus après 15h de culture à 28°C en milieu LB.

- (A)** Stabilité de l'activité hémolytique à la congélation. Le surnageant est aliquoté et stocké à -20°C ou -80°C pendant 3 (■), 10 (□) ou 30 (▨) jours, avec ou sans glycérol 10%, et sans décongélation intermédiaire. L'activité déterminée est exprimée en pourcentage d'activité relative par rapport à l'activité initiale mesurée.
- (B)** Influence des congélations et décongélations successives sur la stabilité de l'activité hémolytique. Le surnageant est aliquoté et stocké à -20°C pendant 3 jours avec (□) ou sans (■) glycérol 10% final. 1, 2 et 3 correspondent au nombre de congélations/décongélations. L'activité déterminée est exprimée en pourcentage d'activité relative par rapport à l'activité initiale mesurée (■).

hémolytique quelle que soit la température de croissance étudiée (cette souche est incapable de pousser à 37°C) (**Figure 24**). La souche MF3737, issue de MF37 et adaptée à la température de croissance de 37°C au laboratoire, est également non hémolytique. La souche MFY162, une souche hospitalière de *P. fluorescens* bv I issue d'expectorations pulmonaires comme MFN1032, est hémolytique. Cependant, le profil de thermorégulation de l'activité hémolytique diffère de celui obtenu pour MFN1032 (**Figure 24**), bien que les souches soient très proches à la fois d'un point de vue taxonomique, physiologique et d'origine (Feuilloley *et al.*, 2007).

Comparée à l'activité hémolytique retrouvée chez PAO1 (**Figure 24**), MFN1032 présente un pouvoir hémolytique d'intensité voisine. Seul les profils de régulation par la température sont différents. Alors que MFN1032 présente un profil « basse-température », PAO1 présente une activité maximale à sa température optimale de croissance (37°C). Cependant, le profil de régulation de PAO1 paraît atypique. A 17°C, l'activité est très proche de celle obtenue à 37°C (90% versus 100%) mais une activité plus faible, et très variable, est retrouvée à 28°C ($\sim 30 \pm 14\%$). PAO produit plusieurs hémolysines, dont au moins deux sont susceptibles d'être sécrétées dans nos conditions d'études : les rhamnolipides et PlcH. Il est possible que ces deux facteurs soient régulés de manière différente par la température de croissance.

MFN1032 et MFY162 présentent donc des comportements différents de celui des souches de *P. fluorescens* non cliniques MF37 et MF3737. Ces souches ne produisent donc pas le(s) facteur(s) impliqué(s) dans cette activité.

1.4 Stabilité de l'activité

Afin de déterminer la stabilité de l'activité hémolytique, le dosage a été réalisé sur un surnageant avant et après congélation. Les résultats obtenus montrent une perte d'activité hémolytique d'au moins 50% dès 3 jours de congélation à -20°C et à -80°C (**Figure 25, A**). Le glycérol, parfois utilisé comme agent conservateur notamment lors de la congélation d'extraits purifiés plus instables (Doi et Nojima, 1971), n'a pas ou très peu d'effet.

% de Lyse initiale	44	32	70	59
% de Lyse après chauffage	30	22	49	41
<hr/>				
% de perte d'activité	34	34	35	34

Figure 26: Effet de la chaleur sur l'AH-S de MFN1032. L'activité hémolytique a été déterminée sur les surnageants de différentes cultures de MFN1032 âgées de 15 G obtenues à 28°C ou 17°C. L'effet du chauffage a été évalué par le dosage des surnageants chauffés 5 minutes à 100°C et des surnageants non chauffés, après 2h de contact avec les hématies à 37°C.

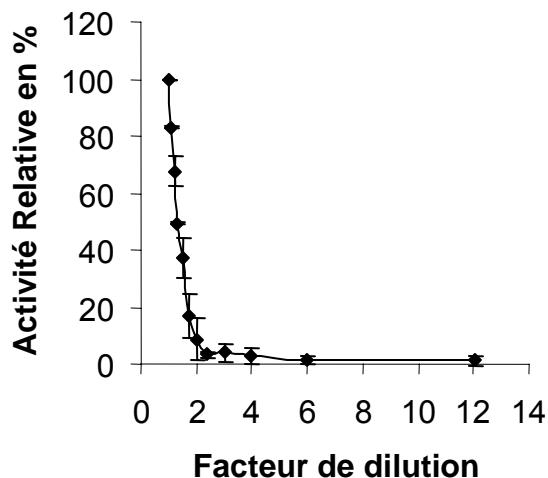


Figure 27: Influence de la dilution du surnageant de culture sur l'activité hémolytique de MFN1032. Le dosage est réalisé sur des cultures de MFN1032 âgées de 15 G obtenues à 17°C. Les surnageants sont dilués en milieu LB et incubés avec les hématies 2h à 37°C. L'activité est exprimée en % d'activité hémolytique relative par rapport à l'activité du surnageant initial non dilué (n≥3).

Plusieurs congélations/décongélations successives des échantillons ne provoquent pas de perte supplémentaire d'activité comme on peut le constater sur la **Figure 25, B.**

Le gain d'activité observé en présence de glycérol n'est pas dû à un effet protecteur. En effet, lorsqu'on dose une culture « fraîche » de MFN1032 supplémentée en glycérol, l'activité est légèrement plus importante qu'en son absence. Le glycérol est utilisé lors de dosages de phospholipase C. Il est possible qu'il augmente l'affinité de l'enzyme pour son substrat grâce à des interactions physicochimiques. Il peut également favoriser la formation de micelles de molécules de biosurfactants.

L'effet de la congélation varie en fonction des échantillons. La perte d'activité est moins importante pour les surnageants de culture obtenus à 8°C ou 17°C et varie en fonction des cultures.

L'effet de la chaleur sur la stabilité de l'activité hémolytique a été évalué en chauffant à 100°C pendant 5 minutes les surnageants de cultures. Le chauffage des échantillons provoque une perte de 34% de l'activité hémolytique globale, ce qui montre que cette activité est relativement thermostable (**Figure 26**).

1.5 Effet-dilution

Dans le but de pouvoir comparer l'activité de surnageants qui provoquaient 100 % de lyse des hématies, les surnageants de culture de MFN1032 ont été dilués au demi dans du milieu LB. Contre toute attente, la proportionnalité d'activité hémolytique après dilution n'a pas été retrouvée. L'effet de la dilution du surnageant sur l'activité hémolytique a donc été recherchée. Lorsque le surnageant est dilué en milieu LB et mis en contact avec une quantité fixe d'hématies, on observe une courbe de type « tout ou rien » (**Figure 27**).

Ce profil d'activité suppose une coopération allostérique. Dans la première partie de la courbe, la lyse est proportionnelle à la quantité de facteurs présents dans le surnageant, tandis que dans la partie 2, aucune lyse n'est présente. On observe donc un phénomène de tout ou rien, avec l'existence d'un nombre « limitant » de facteurs hémolytiques. Un seul facteur pourrait être impliqué (profil type des concentrations micellaires critiques retrouvées pour les biosurfactants) ou plusieurs

	Surnageant de culture	Surnageant concentré sur Amicon ultra-15		
Activité hémolytique relative	100 %	Non redilué	Dilué dans le milieu LB	Dilué dans le filtrat
		50 %	0%	0%

Figure 28: Effet de la concentration du surnageant de culture sur filtre Amicon sur le pouvoir hémolytique du surnageant. Le surnageant de culture de MFN1032 (17°C) a été concentré 50 fois sur filtre Amicon ultra-15 (seuil de coupure de 10 kDa). 12 µL de surnageant concentré ont été mis en contact avec 600 µL d'hématies à 2% pendant 2 heures à 37°C. Le surnageant concentré a été dilué 50 fois, soit dans du milieu LB, soit dans le filtrat récupéré après concentration sur filtre Amicon, et 600 µL ont été mis en contact avec les hématies. L'activité hémolytique est calculée par rapport à l'activité initiale du surnageant non concentré.

facteurs qui agiraient de façon synergique, comme cela est retrouvé pour la céréolysine AB de *Bacillus cereus* (Pomerantsev *et al.*, 2003). On peut supposer que l'absence ou la diminution d'un des partenaires affecte complètement la lyse.

D'autre part, lorsque le surnageant de culture est concentré sur filtre Amicon (avec un seuil de coupure de 10kDa), on observe également une perte d'activité hémolytique (**Figure 28**). Le surnageant concentré directement mis en contact avec les hématies perd 50% de pouvoir hémolytique. Dilué 50 fois dans le milieu LB pour revenir à la concentration initiale, le surnageant perd toute activité hémolytique. Cette perte d'activité n'est pas liée à une perturbation de la force ionique puisque le surnageant concentré et redilué avec son propre filtrat ne présente également aucune lyse. Une partie des facteurs impliqués pourrait donc adhérer au filtre. La quantité d'hémolysines deviendrait alors trop faible pour provoquer la lyse et on se retrouverait dans la partie 2 de la courbe de dilution.

Cette synergie peut également expliquer la perte importante d'activité hémolytique après congélation. Si l'activité hémolytique est faible, la moindre instabilité d'un des facteurs peut avoir une forte répercussion sur l'activité hémolytique. Au contraire, pour une activité hémolytique forte (à 8°C ou à 17°C), une instabilité d'une partie des facteurs entraîne seulement une baisse négligeable de l'activité.

Ces deux constatations sur la stabilité et « l'effet dilution » suggèrent qu'au moins deux facteurs distincts, relativement thermostables, interviennent dans l'hémolyse sécrétée chez MFN1032, dont au moins un serait instable dans le temps.

2 Les différents facteurs pouvant intervenir dans l'activité hémolytique sécrétée

2.1 La production de biosurfactants

La production de biosurfactant par la souche MFN1032 a été évaluée par le test de la goutte. Le pouvoir tensioactif du surnageant de culture de MFN1032 varie en fonction de la température de croissance. Des travaux réalisés au laboratoire, en

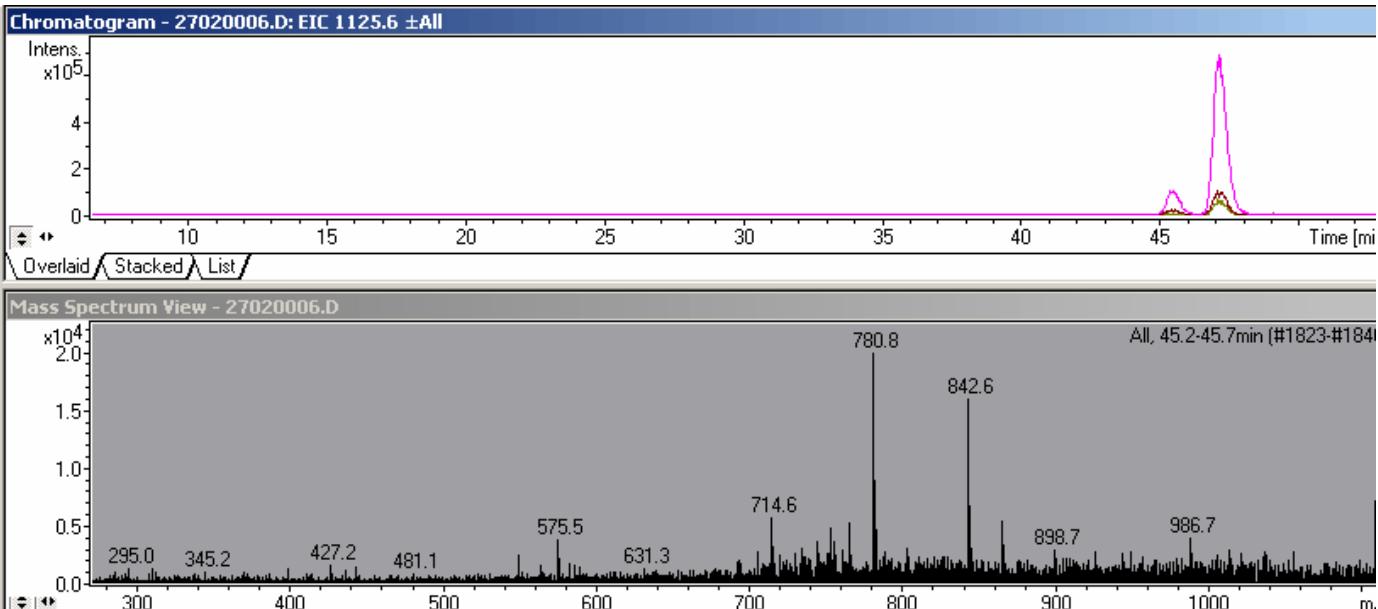
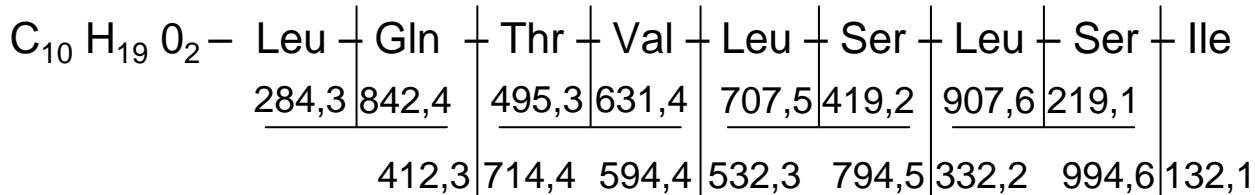
A**B**

Figure 29: Caractérisation des biosurfactants produits dans le surnageant de culture de la souche MFN1032 par HPLC-MS. Le surnageant de culture âgé de 15 G obtenu à 28°C en milieu LB est analysé par HPLC, et les pics sont caractérisés par un détecteur MS à ionisation positive. L'analyse des spectres est réalisée par comparaison avec les molécules référencées dans la banque de données MS. **A-** Exemple de chromatogramme et de spectre de masse en fragmentation positive. **B-** Structure de la viscosinamide en ionisation positive caractérisée dans le surnageant de MFN1032. La fragmentation spécifique de la molécule génère des fragments dont la taille permet de déterminer l'enchaînement en acides aminés de la séquence. Leu: leucine; Gln: glutamine; Thr: thréonine; Val: valine; Ser: sérine; Ile: isoleucine.

Tableau 16: Biosurfactants (CLPs) caractérisés dans les surnageants de culture de MFN1032 en milieu LB à 28°C et 17°C.

CLP	Viscosinamide	Viscosinamide '	α
Tr (en min)	47,1	45,4	43,7
MM (en Da)	1125,8	1125,8	1111,8

Tr: temps de rétention; MM: masse moléculaire

collaboration avec le laboratoire INRA de Massy, ont montré que la souche MFN1032 élabore des biosurfactants dont la production est maximale pour les basses températures (Thèse de Sandra N'Goya, 2007).

L'analyse des surnageants de culture de la souche MFN1032 par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) a été réalisée à l'USBS de Lorient. L'HPLC est une méthode séparative qui permet d'éluer les composés en fonction de l'affinité qu'ils présentent pour la colonne chromatographique dans les conditions expérimentées, ce qui se traduit par des temps de rétention (Tr) différents. La spectrométrie de masse permet quant à elle de déterminer avec précision et sensibilité la masse de molécules à travers des mesures de rapport de masse (m) sur le nombre de charges (z) de molécules individualisées et ionisées, grâce à la perte ou au gain de charges ioniques. La séparation LC-MS se traduit par l'apparition de pics chromatographiques à des temps différents. A chaque pic est attribué une masse, qui est obtenue à l'aide de la MS en ionisation positive (protonique), notée m/z H⁺ (**Figure 29**).

Les analyses HPLC sont réalisées à partir des surnageants de culture obtenus à 28°C et 17°C en milieu LB après 15 G. Trois pics présentant des temps de rétention différents ont été détectés sur le chromatogramme des surnageants obtenus aux deux températures de croissance. MFN1032 produit donc au moins 3 molécules différentes, dont les masses observées sont similaires à celles des cyclolipopeptides (CLP) déjà identifiés dans la littérature comme étant des biosurfactants.

La fragmentation spécifique obtenue grâce à une trappe ionique présente au niveau du détecteur MS permet de déterminer l'enchaînement en acides aminés pour chaque molécule détectée. Les trois molécules séparées en HPLC ont ainsi pu être identifiées comme étant des CLP (**Tableau 16**). MFN1032 produit 2 CLP qui présentent la même MM (1125,8 Da) avec des Tr différents (**Tableau 16**). Un de ces CLP correspond à la viscosinamide (Tr= 47,1 min) et le second est probablement un isomère de la viscosinamide. Il présente un Tr de 45,4 min et a été baptisé viscosinamide « ' ». Le troisième CLP n'a encore jamais été décrit dans la littérature. Son Tr est de 43,7 min, sa MM est égale à 1111,8 Da et cette molécule a été baptisée « α ».

Les CLPs sont les biosurfactants majoritairement retrouvés chez les *P. fluorescens*. Chez la souche DR54, la viscosinamide intervient dans l'activité de



Figure 30: Activité lécithinase de MFN1032 incubée à 37°C. L'activité lécithinase correspond au précipité blanc opaque sur la gélose au niveau de la croissance bactérienne. La gélose a été ensemencée par strie et piqûre centrales, et incubée 5 jours à 37°C.

biocontrôle de la bactérie grâce à ses propriétés antifongiques et antibiotiques. Aucune donnée bibliographique ne précise si cette molécule est capable de lyser les érythrocytes.

2.2 La production de phospholipases

La production de phospholipase C a été évaluée par l'activité lécithinase sur gélose à l'oeuf. Les phospholipases C y dégradent la lécithine (ou phosphatidylcholine) et forment un précipité blanc opaque. MFN1032 présente une activité lécithinase sur gélose à l'oeuf. Cette activité apparaît quelle que soit la température d'incubation, y compris à 37°C après 4 à 5 jours d'incubation (**Figure 30**).

3 Implication d'une phospholipase C dans l'activité hémolytique sécrétée

Un des objectifs de mes travaux de thèse a été d'évaluer l'implication d'une phospholipase C dans l'activité hémolytique de la souche MFN1032. La démarche a consisté dans un premier temps à comparer la production et les caractéristiques des deux activités hémolytique et phospholipasique, puis à caractériser la phospholipase. La construction de mutants phospholipase a permis d'évaluer l'impact de l'enzyme sur le pouvoir hémolytique de la souche.

La production de la phospholipase C a été appréciée par l'utilisation du substrat chromogène pNPPC (p-nitrophénylphosphorylcholine), largement utilisé dans la littérature pour le dosage des phospholipases C bactériennes (Titball, 1993).

3.1 Dosage de l'activité pNPPC hydrolase de la souche MFN1032

Le dosage utilisé pour cette étude est celui décrit Sacherer *et al.*, mis en place pour le dosage d'une phospholipase C produite par une souche de *Pseudomonas fluorescens* (Sacherer *et al.*, 1994).

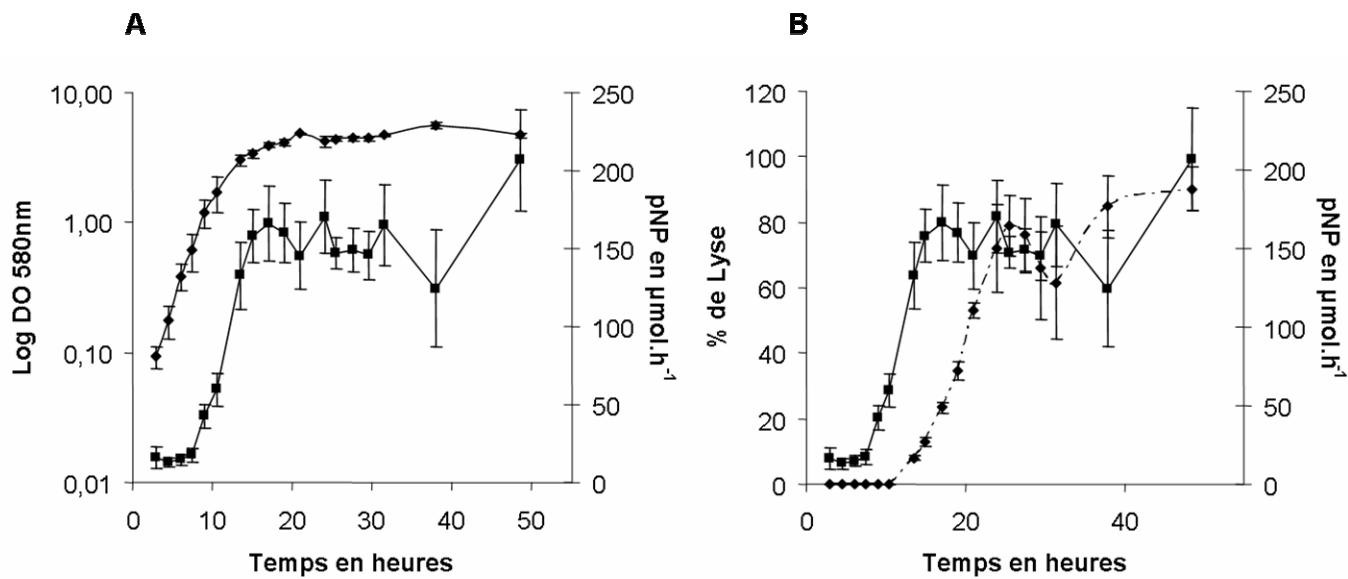


Figure 31: Cinétique de production de l'activité pNPPC hydrolase de la souche MFN1032 (A) comparée à celle de l'activité hémolytique (B). La production des deux activités a été suivie au cours de la croissance de la souche MFN1032 cultivée en milieu LB et à 17°C sous agitation. L'activité pNPPC hydrolase (—■—) est exprimée en μmol de pNP formé par heure. L'activité hémolytique (---◆---) est exprimée en % de lyse. (n=3).

Tableau 17: Activité pNPPC hydrolase de MFN1032, MF37 et PAO1 en fonction de la température de croissance.

Température de croissance	8°C	17°C	28°C	37°C
MFN1032	45 ± 4	18 ± 3	17 ± 1	1 ± 1
MF37	23 ± 1	19 ± 1	17 ± 1	nd
PAO1	nd	3490 ± 153	435 ± 245	47 ± 16

L'activité est déterminée sur les surnageants concentrés sur Amicon Ultra-15 à partir de culture réalisées en milieu LB et âgées de 15 G. Les résultats sont exprimés en μmol de pNPP formées par heure et par unité de DO_{580nm} ($\mu\text{mol.h}^{-1}/\text{UDO}$). (n≥3).

3.1.1 Cinétique de production en fonction de la croissance

L'hydrolyse du pNPPC a été suivie au cours de la croissance de la souche MFN1032 à 17°C dans le milieu LB. L'activité pNPPC hydrolase est déterminée en mesurant l'absorbance à 405 nm du pNP issu de l'hydrolyse du substrat. Les surnageants ayant été concentrés, les activités mesurées sont ramenées à un facteur de concentration de 100 pour une meilleure comparaison des résultats.

L'hydrolyse du pNPPC commence en phase exponentielle de croissance et devient maximale en phase stationnaire. L'activité semble diminuer au cours de la phase stationnaire (**Figure 31, A**). Ce type de cinétique correspond à celle retrouvée pour la sécrétion de la phospholipase C de *P. fluorescens* A-3-I (Doi, 1973). La production de l'activité pNPPC hydrolase apparaît plus tôt dans la phase de croissance que l'activité hémolytique (**Figure 31, B**).

Il est possible qu'une accumulation d'hémolysines soit nécessaire pour déclencher la lyse, ou qu'un des facteurs nécessaire à l'hémolyse soit sécrété plus tard dans la phase exponentielle de croissance.

3.1.2 Influence de la température de croissance sur l'activité pNPPC hydrolase

La production de pNPPC hydrolase a été déterminée aux différentes températures de croissance. Les résultats présentés dans le **tableau 17** montrent que l'activité pNPPC de la souche MFN1032 est maximale à 8°C. L'activité est équivalente à 17°C et 28°C, et aucune activité n'est détectée à 37°C.

Par comparaison, MF37 sécrète également une pNPPC hydrolase dont la production est stable quelle que soit la température de croissance et dont les valeurs sont dans le même ordre de grandeur que celle de la souche MFN1032, sauf à 8°C où MFN1032 montre une activité deux fois supérieure. Etant donné que la souche MF37 est non hémolytique, ce résultat suggère que la souche produit une phospholipase C non hémolytique et/ou une autre enzyme capable d'hydrolyser le pNPPC.

L'activité pNPPC hydrolase de PAO1 est maximale à 17°C et décroît avec l'augmentation de la température de croissance. Il est donc possible que l'activité

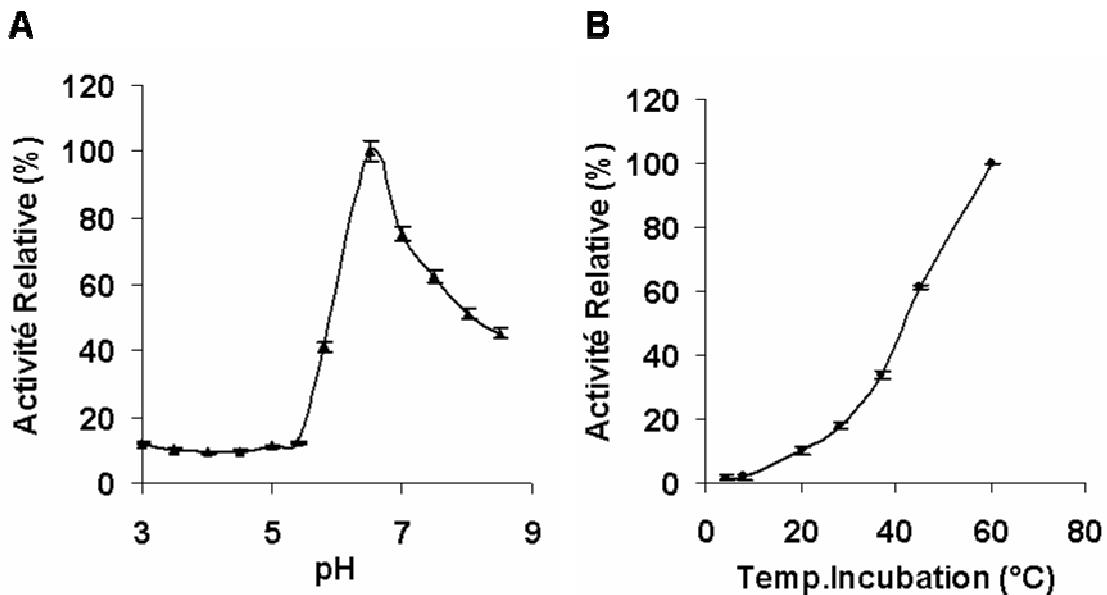


Figure 32: Influence du pH (A) et de la température d'incubation (B) sur l'activité pNPPC hydrolase de la souche MFN1032. L'activité pNPPC hydrolase est dosée en présence de 100 mM de pNPPC sur le surnageant de culture de MFN1032 concentré sur Amicon Ultra-15. Pour la gamme de pH de 3 à 5,8, le tampon de réaction est composé de tampon citrate 250 mM à la place du tampon Tris-HCl. Pour les pH 6,5 à 8,5, du tampon Tris-HCl 250 mM a été utilisé. L'activité est exprimée en % d'activité relative par rapport à l'activité obtenue au pH (A) ou à la température (B) habituels d'incubation, i.e pH 7 et 37°C respectivement.

hémolytique déterminée à 17°C soit préférentiellement due à l'action de phospholipases C.

A 8°C, MFN1032 présente une activité équivalente à celle produite par PAO1 à sa température optimale de croissance (37°C). A 17 et 28°C, l'activité pNPPC hydrolase de MFN1032 est jusqu'à 200 fois inférieure à celle de PAO1.

Le pNPPC est un substrat synthétique dont le groupement polaire, la phosphorylcholine, est lié au paranitrophénol qui fait office de chaîne carbonée. Bien qu'il soit facilement hydrolysé par les métallophospholipases C à zinc (PLCs de *B. cereus* et *C. perfringens*) ou par les PC-PLCs (PAO, *B. cepacia*), les PLCs de certaines souches de *P. fluorescens* sont incapables d'hydrolyser ce substrat, ou seulement quand une forte concentration de pNPPC est utilisée (100mM) (Ivanov et al., 1996; Sacherer et al., 1994).

Dans tous les cas, le profil de thermorégulation de l'activité pNPPC hydrolase de MFN1032 est différent de celui obtenu pour l'activité hémolytique. Si une phospholipase C est impliquée dans l'hémolyse, une fois encore ces résultats suggèrent qu'au moins un autre facteur est impliqué dans cette activité.

3.1.3 Conditions optimales d'activité

L'influence du pH et celle de la température d'incubation sur l'activité pNPPC hydrolase ont été déterminées et sont présentées **figure 32**. L'hydrolyse est maximale à pH 6,8 (**Figure 32, A**) et lorsque la température d'incubation est supérieure ou égale à 60°C (**Figure 32, B**), ce qui peut paraître surprenant pour une activité sécrétée par une souche psychrotrophe.

La courbe montrant l'influence du pH sur l'activité pNPPC hydrolase présente un épaulement correspondant probablement à un deuxième optimum à un pH de 7,5. Il est possible que MFN1032 sécrète plusieurs PLCs ou d'autres enzymes capables d'hydrolyser le pNPPC. En effet, de nombreux travaux montrent que les PLD, mais également certaines phosphatases, peuvent dégrader le pNPPC (Fliegera et al., 2000).

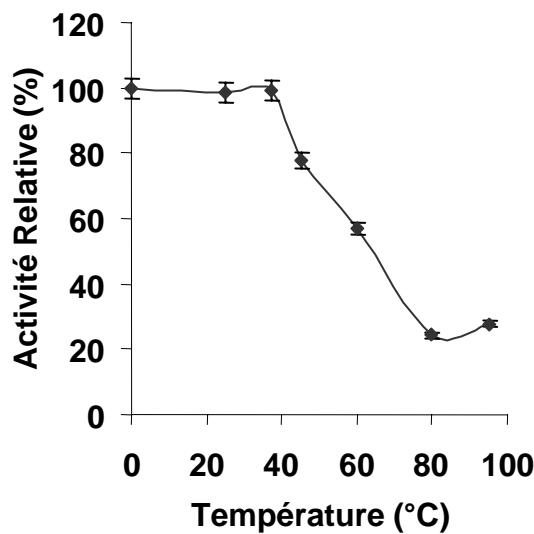


Figure 33: Thermostabilité de l'activité pNPPC hydrolase de la souche MFN1032. L'activité pNPPC hydrolase est déterminée sur le surnageant de culture de MFN1032 obtenu à 17°C, concentré sur Amicon Ultra-15. Les surnageants sont préalablement incubés 5 minutes à des températures comprises entre 0 et 100°C. L'activité est exprimée en % d'activité relative par rapport à l'activité obtenue à la température habituelle d'incubation de 37°C.

3.1.4 Stabilité de l'activité pNPPC hydrolase

Nous avons pu voir que l'activité hémolytique était instable après congélation. Afin de déterminer si cette perte d'activité serait due au manque de stabilité d'une phospholipase, nous avons dosé l'activité pNPPC hydrolase après congélation ou chauffage de différents surnageants de la souche MFN1032.

Une perte de 30% d'activité n'est constatée que systématiquement au-delà de 15 jours de stockage à -20 ou -80°C.

L'activité est relativement thermostable puisque l'activité résiduelle est de 25% après chauffage des échantillons 5 minutes à 100°C (**Figure 33**).

Par comparaison, le surnageant de PAO1 cultivé à 37°C testé dans les mêmes conditions ne présente plus d'activité pNPPC hydrolase après chauffage, alors que l'activité reste relativement stable après plusieurs semaines de congélation. Les propriétés de l'activité pNPPC hydrolase des deux souches sont par conséquent différentes et suggère donc une différence de structure des enzymes impliquées chez ces deux espèces.

La stabilité des deux activités hémolytique et pNPPC hydrolase est différente. Le facteur instable à la congélation impliqué dans l'hémolyse n'est pas lié à l'activité pNPPC hydrolase chez MFN1032. Il est également possible que les deux fonctions biologiques de l'enzyme (hydrolyse des phospholipides et activité hémolytique) soient « dissociées », comme cela a pu être montré pour l'α-toxine de *C. perfringens*. La congélation pourrait entraîner des modifications affectant le site actif responsable de l'hémolyse.

3.1.5 Effet du D609

Le D609 est un inhibiteur spécifique des phospholipases C hydrolysant préférentiellement la phosphatidylcholine. Utilisé dans un premier temps pour l'étude des phospholipases C eucaryotes, il sert également à l'étude d'enzymes bactériennes. Ainsi, ce composé est décrit comme fortement inhibiteur des métallophospholipases C à zinc (Amtmann, 1996), mais n'aurait aucun effet sur les PC-PLCs (Stonehouse *et al.*, 2002), probablement à cause de conformation différente des sites actifs. Chez *B. cereus*, 6,5 µM de D609 suffisent à diminuer de 50% l'activité PLC. En ce qui concerne *P. fluorescens*, Preuss *et al.* ont montré que

le D609, à une concentration molaire de 420 μ M finale, entraînait une perte de 50% sur la capacité d'hydrolyse phospholipidique.

Le surnageant concentré de MFN1032 a été pré-incubé pendant 1h à température ambiante avec le D609 à des concentrations finales comprises entre 100 μ M et 1 mM et testé en activité pNPPC hydrolase. Aucune perte d'activité n'est détectable quelle que soit la concentration testée et même après une nuit d'incubation avec l'inhibiteur. Deux hypothèses sont alors possibles :

- i)- l'activité pNPPC hydrolase de la souche MFN1032 ne résulte pas de l'action de phospholipases C
- ii)- MFN1032 produit une phospholipase C, mais le D609 n'a pas d'effet sur sa capacité d'hydrolyse du pNPPC. Le site actif pour l'hydrolyse du pNPPC pourrait être différent de celui de l'hydrolyse des phospholipides membranaires et/ou de l'activité hémolytique.

Afin de s'assurer de l'implication d'une phospholipase C dans l'activité hémolytique de la souche MFN1032, le surnageant de culture a été pré-incubé avec le D609 à une concentration finale de 1 mM pendant une heure et à température ambiante puis mis au contact des hématies pendant 2h à 37°C. Le dosage de l'activité hémolytique montre que le surnageant traité au D609 perd 68% de pouvoir hémolytique ($92 \pm 1\%$ de lyse versus $30 \pm 3\%$ de lyse en présence de D609). Ce résultat suggère qu'une PLC est bien impliquée dans l'activité hémolytique chez MFN1032. Le dosage utilisant le pNPPC comme indicateur de l'activité phospholipase C paraît par conséquent inapproprié à notre étude, d'une part parce qu'il est probable que MFN1032 produise d'autres enzymes capables de dégrader le substrat (comme l'estérase) et que l'hydrolyse enzymatique du substrat ne reflète certainement pas le fonctionnement naturel de l'enzyme.

3.2 Caractérisation de la phospholipase C de MFN1032

La phospholipase C produite par MFN1032 a dans un premier temps été caractérisée par zymogramme sur gélose à l'œuf. Le gène codant la PLC a ensuite été identifié, séquencé et comparé aux banques de données.

3.2.1 Localisation de la phospholipase C sur SDS-PAGE par zymogramme sur gélose à l'œuf

L'objet de cette étude est de déterminer la masse moléculaire apparente de la phospholipase C produite par MFN1032.

Les surnageants de culture sont concentrés et soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes SDS-PAGE. Après la migration, le gel est coloré au nitrate d'argent puis déposé directement sur une gélose à l'œuf. Après 18h d'incubation à 37°C, l'apparition d'un précipité opaque est visible au niveau d'une seule bande. La taille apparente de la bande est estimée, d'après le marqueur de masse moléculaire, à 42 kDa (**Figure 34**). Cette masse moléculaire est tout à fait en accord avec celles retrouvées pour les PLCs de certaines souches de *P. fluorescens*.

Une seule bande apparaît sur gélose à l'œuf ce qui suggère que la souche MFN1032 ne sécrète qu'une seule phospholipase C, ou des phospholipases C de même masse moléculaire. Mais il ne faut pas oublier que seules les protéines qui résistent aux différents traitements (chaleur, SDS, β -mercaptopropanol et coloration au nitrate d'argent) ont pu être révélées sur la gélose par zymogramme.

3.2.2 Séquençage du gène codant la phospholipase C de MFN1032

3.2.2.1 Choix des amores et PCR

Le gène codant la PLC de MFN1032 a été amplifié à partir d'amorces établies selon la séquence de la phospholipase C décrite par Preuss *et al.*. Deux jeux d'amorces ont été construits : Plc1/Plc2, qui permet l'amplification de la partie codante de la protéine (du codon initial au codon stop) et Plc0/Plc2 qui permet l'amplification de 300pb supplémentaires en amont du gène. Les fragments obtenus après amplification par PCR ont une taille d'environ 1200 et 1500 nucléotides respectivement (**Figure 35**) et correspondent aux tailles attendues selon la séquence de Preuss.

Les fragments PCR ont été sous-clonés dans le vecteur pMos et séquencés par la société Génome Express (France).

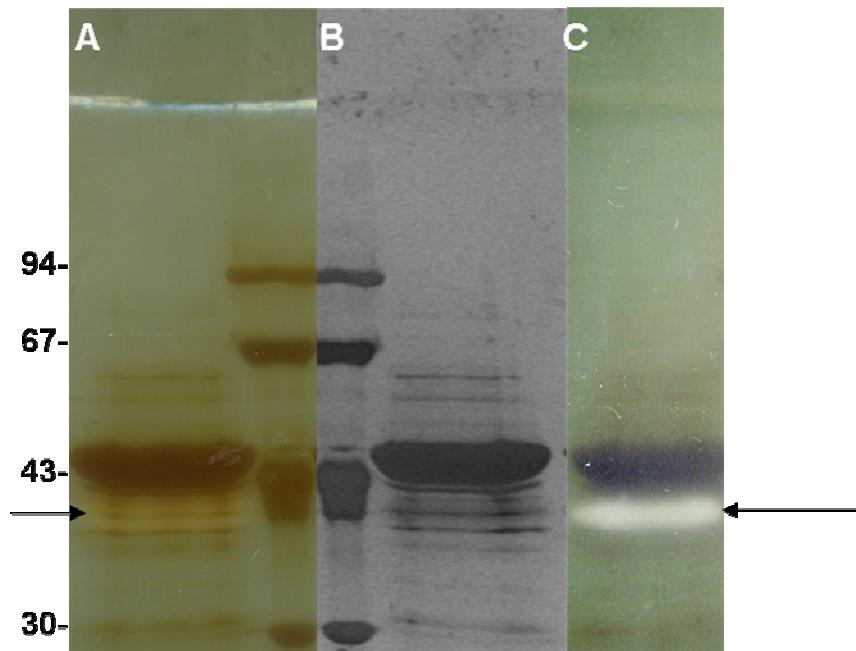


Figure 34: Détermination de la masse moléculaire de la phospholipase C produite par MFN1032 par zymogramme d'un gel SDS-PAGE sur gélose à l'œuf. Le surnageant d'une culture incubée à 17°C est concentré sur Amicon Ultra-15 puis déposé sur un gel de polyacrylamide à 10%. Après migration, le gel est coloré au nitrate d'argent (B) puis déposé sur gélose à l'œuf (A, C). La gélose est incubée sur la nuit à 37°C. La PLC provoque un précipité opaque sur la gélose (→).

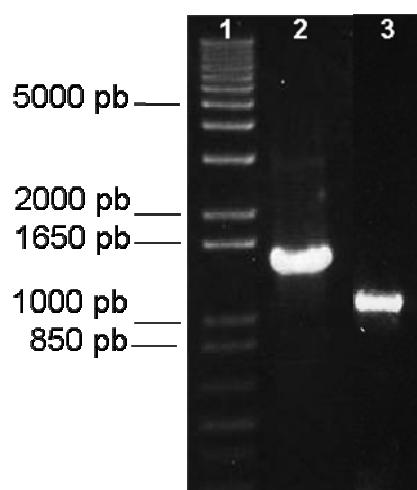


Figure 35: Amplification par PCR du gène codant la phospholipase C de la souche MFN1032. 1- Ladder 1 Kb ; 2- amplification de l'ADN avec les amores Plc0/Plc2 ; 3- amplification de l'ADN avec les amores Plc1/Plc2.

gatggacttcagttttgtggattcattattcgaacaccctggcgaagacttctaaacgaaagggtgttgt	72
tggtttcatgtgtcgtagtcgtacaactataaataattcgtaactgcaattcatcctgcgtact	144
cctgcgaaggcttaagacgcggcttgcgttagaaattctcacctatgattcagataactgtatgaata	216
tacagtcatcacgaaagattcctacgacatagcaagggactaac AGGAGCTAAC ATG TCA GGT CTT GAA CTC GCA	281
M S G L E L A	7
GCA CCC GAA AAA ACA CCA CCT ACA CTG CGC TTC GAA GGC GGT GAA CAC ACC GCC	335
A P E K T P T L R F E G G E H T A	25
ATC GGC GAT GAC ACC CTG CTT CGC TTC GTC AAG AAC GCC CCG GCC ATT CCT GCG	389
I G D D T L L R F V K N A P A I P A	43
CGC CAA GTC GAA CTG CAC CTG CCC AAC GGG CTT GCG CTG ACC TAT GGC CAA GTG	443
R Q V E L H L P N G L A L T Y G Q V	61
ATC GCC CTG GGC GGC GAC TTC TAT GGC ATC CCC GGC CAA CCG ATC AGC GAT GGC	497
I A L G G D F Y G I P G Q P I S D G	79
AAC TCC CCG GCC GAA CGC GTG CAA CGC TTT AAC GCG GCC TTC AAT TCT CTT GCC	551
N S P A E R V Q R F N A A F N S L A	97
GTG TTG CCC GCT TCA CGG GAA GAA GCG CAG AAG ATC CTG GCG GTG ATG CAA AAG	605
V L P A S R E A Q K I L A V M Q K	115
GAG ATC AAC GCC GTC AAC CAG GCG ATC AAG GAC GGC AAA CAG CCG CAC GAA GCC	659
E I N A V N Q A I K D G K Q P H E A	133
TAC GAC GCC CTG GGT GAT ACG TTG TCC GAG GAG TGG AAC CGC ATC ACT GGC GGC	713
Y D A L G D T L S E E W N R I T G G	151
GGC AGC GCT GTT TCG GCC CTC GTG CCA CTA GGC CGC TAC CTG AAA CTG GCA GCG	767
G S A V S A L V P L G R Y L K L A A	169
GAC AAC GCC GAT CAC TTC GGT GAG TGG GCC TTG TCG GCC TAC ATG GCC GGC CAT	821
D N A D H F G E W A L S A Y M A G H	187
ACG GCA GCA CTG CAA CAG GCA GTG ATG GCC CAT CAG ACC GGC ACC GAC CAG GCC	875
T A A L Q Q A V M A H Q T G T D Q A	205
CTG GAA TTG GCT TAC GCC ATG AAC AGC TTT GCC GAT CAC TTT TTG ACC GAC CTG	929
L E L A Y A M N S F A D H F L T D L	223
TTT TCC GCC GGC CAC CTG CGG GTA CCG CGT AAA CAA CTG GCG GCA GTG GTG ACG	983
F S A G H L R V P R K Q L A A V V T	241
CCA GGA GAA CTC GGC TCG CTG ATC AGC CGC TTC ATG CAC GAT GAA GAC AGT AAA	1037
P G E L G S L I S R F M H D E D S K	259
TTC GGG CTC AAG GTG CGC AAT GCC ATG GGC GCT CAG TGG CAT GCC TAC GGC GAC	1091
F G L K V R N A M G A Q W H A Y G D	277
AAG CGC TAC TTC GAC AGC ATT GAC GCC GAC AAT CGC GTG CAG GTC AAA CGG GCA	1145
K R Y F D S I D A D N R V Q V K R A	295
GTA CAG GCC TCG GCA GAT GAA ATC TTC GAA ACC TTC ATC AGC GGC ATC GCG CCC	1199
V Q A S A D E I F E T F I S G I A P	313
TCC CCG GCT GAA TTC AAG GCA CCG CTG TAT GTG CCC GAC CTG AAC GCC GCG CAA	1253
S P A E F K A P L Y V P D L N A A Q	331
AAC CCG GCG AAT AAC TTC TCG CCG CTG TTC AAG ATG GAG GGG GAC AAG GTG CTG	1307
N P A N N F S P L F K M E G D K V L	349
CGG CGC AAG GAC GTC AAC GAT TTG AAC GAC AAG CAC TGG ACC AAT GAT TGG TGG	1361
R R K D V N D L N D K H W T N D W W	367
GGG TGG AGT ACG TAT TTG CTG CTT AAA GAC TAC AAG CCA AAC CAA CCC GCC AAC	1415
G W S T Y L L K D Y K P N Q P A N	385
<u>TAA</u> atccatatgactagtagatcct	1440
	386

Figure 36 : Séquences du gène codant la phospholipase C PlcC et de la protéine déduite.

Les flèches indiquent la position des amorces utilisées pour l'amplification de *plcC*: rouge :plc0 ; verte : plc1 ; noir : plc2. Le RBS putatif est encadré en jaune.

Figure 37: Alignement des séquences des PLC produites par les *P. fluorescens*. Les séquences protéiques des différentes PLCs ont été obtenues sur le site ncbi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) avec les numéros d'accession suivants: PLC (Preuss): AJ304443; Pf0-1: YP_346558 ; Pf5: AAY90175. La séquence de la PLC produite par la souche SBW25 a été obtenue sur le site de l'Institut Sanger (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/pf/>). L'alignement a été réalisé par le logiciel Clustal W avec les paramètres par défaut. Les parties encadrées correspondent aux domaines qui ne sont pas retrouvés chez l'ensemble des souches.

3.2.2.2 Séquence du gène codant la phospholipase C de MFN1032

L'amplification à partir du jeu d'amorce Plc1/Plc2 donne un fragment de 1158 nucléotides correspondant à la phase ouverte de lecture et dont la séquence est représentée **Figure 36**. La protéine est composée de 386 résidus aminoacides avec une masse moléculaire théorique de 42 kDa, ce qui correspond à la taille estimée de la phospholipase C par SDS-PAGE et sur gélose à l'œuf. La séquence a été renommée *plcC* et enregistrée dans les banques de données sous le numéro d'acquisition DQ462712.

Le second jeu d'amorce Plc0/Plc2 a permis de caractériser la région amont de la protéine sur environ 260 pb. Le RBS putatif (**Figure 36**) présente un motif peu conservé (AGGAGCT). La séquence amont présente une forte homologie avec le gène codant la dihydropicolinate synthétase retrouvé en amont du gène *plc* chez Pf0-1. Ce gène n'est pas orienté dans le même sens que *plcC*.

3.2.2.3 Analyse de la séquence *plcC* et de la protéine déduite PlcC

3.2.2.3.1 Comparaison de la séquence aux banques de données

La séquence *plcC*, ainsi que la protéine déduite PlcC, ont été comparées aux banques de données (www.ncbi/blast). Un alignement de séquence a été réalisé avec les phospholipases C produites par les souches de *P. fluorescens* dont le génome est séquencé (Pf0-1, Pf-5 et SBW25) et la PLC décrite par Preuss *et al.* (**Figure 37**). La protéine PlcC présente une très forte identité avec la phospholipase C décrite par Preuss *et al.* (98%) ainsi qu'avec les phospholipases C des différentes souches de *P. fluorescens* : SBW25 (92% id.), Pf-5 (76% id.) et Pf0-1 (65% id.). Les phospholipases C putatives de Pf0-1 et Pf-5 ont des masses moléculaires estimées supérieures à celles produites par MFN1032, la souche décrite par Preuss, ainsi que celle de la PLC putative de SBW25 (**Tableau 18**). La différence de masse moléculaire s'explique principalement par l'absence d'une cinquantaine de résidus amino-acides dans la partie N-terminale de PlcC. La partie N-terminale est d'ailleurs la partie qui présente le moins d'homologies sur l'ensemble de la séquence (**Figure 37**). La PLC retrouvée chez Pf-5 possède un domaine C-terminal supplémentaire et donc une masse moléculaire plus importante.

Tableau 18: Comparaison des PLCs produites par les souches de *P. fluorescens* dont la PLC est séquencée

souches	Nombres Résidus acides aminés	pl	MM en kDa
MFN1032	385	5,58	42
PLC Preuss	385	5,57	42
SBW25	383	5,85	42
Pf-5	546	5,78	59
Pf0-1	437	5,44	48

pl: point isoélectrique; MM: masse moléculaire

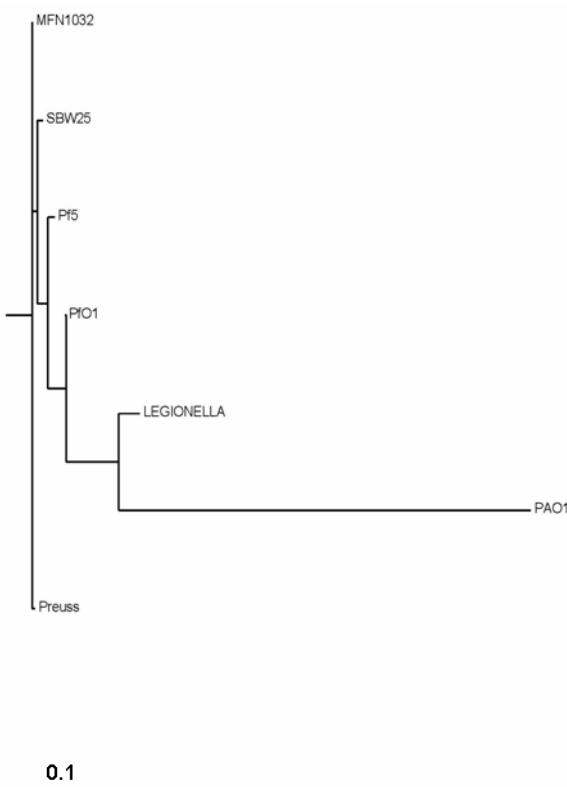


Figure 38: Dendrogramme des PLCs de MFN1032 (N°Acc: DQ462712), Preuss (N°Acc AJ304443), SBW25 (cette séquence a été obtenue à partir du site de l'institut Sanger, <ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/pf/>), Pf0-1 (N°Acc : YP_346558), Pf-5 (N°Acc AAY90175), *L. pneumophila* (N°Acc AF454865) et PAO1 PlcH (N°Acc A26391). Les analyses phylogénétiques ont été réalisées à partir des séquences réduites aux zones d'homologies, avec le logiciel Phylip version 3.5 après un alignement avec le logiciel Clustal W version 1.83 (paramètres par défaut).

La séquence de PlcC a également été comparée à celle de phospholipases C produites par des souches de *Legionella pneumophila*, qui présentaient une forte homologie avec PlcC, ainsi qu'avec la phospholipase C hémolytique PlcH de *P. aeruginosa*. L'ensemble des séquences a été aligné à l'aide du logiciel Clustal W puis, après restriction aux régions présentant le plus d'homologie, un dendrogramme a été construit (Figure 38). PlcC est proche des phospholipases C produites par des souches de *L. pneumophila* (43% d'identité) mais aucune homologie n'est retrouvée avec PlcH produite par PAO1.

Les PLCs des *P. fluorescens* sont éloignées des PLCs produites par les bactéries à Gram positif et celles regroupées dans la classe des PC-PLCs, auxquelles appartiennent les PLCs de *P. aeruginosa* ou *B. cepacia*.

D'après l'analyse *in silico*, les autres espèces appartenant au groupe des *Pseudomonas* fluorescents produisent soit des phosphatidyl-inositol phospholipases C (*P. putida*), soit ne produisent pas de phospholipases C homologues (*P. syringae*).

3.2.2.3.2 Recherche de peptide signal

La taille théorique de la protéine (42 kDa) étant identique à celle retrouvée dans le surnageant de culture en SDS-PAGE, il semblerait que la PlcC soit sécrétée dans le milieu extérieur sans étape de clivage préalable. L'analyse *in silico* par l'utilisation de différents logiciels montre l'absence de motif caractéristique de séquences signal connues. Ce résultat est en accord avec les éléments donnés par Preuss qui décrit qu'aucun peptide signal connu n'est retrouvé dans la séquence de la phospholipase. Preuss observe une différence de 1,5 kDa entre la taille théorique de l'enzyme et celle qu'il détermine sur SDS-PAGE, ainsi il propose l'implication des 8 premiers résidus d'acides aminés dans la sécrétion de la protéine. Par comparaison, la PLC sécrétée par *L. pneumophila*, PlcA, serait sécrétée par un système Tat-dépendant. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour déterminer la/les voie(s) de sécrétion empruntée(s) par la protéine.

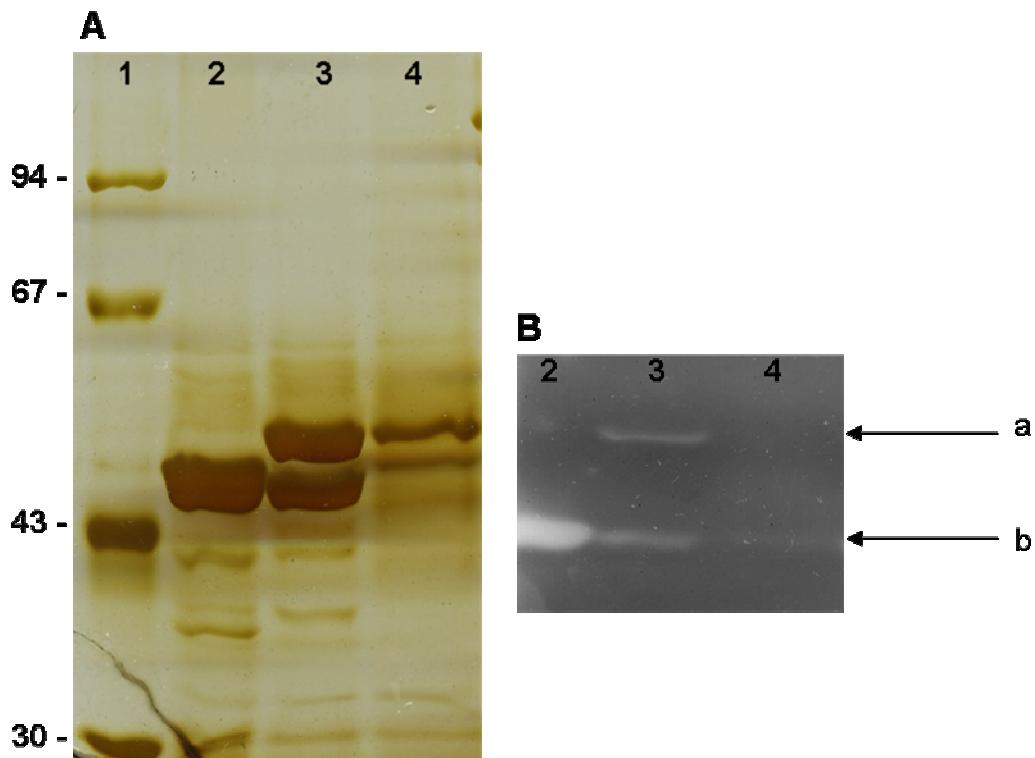


Figure 39: Localisation de l'activité lécithinase de la souche MF37 par zymogramme sur gélose à l'œuf. Les souches MFN1032, MF37 et le mutant MF37 estérase déficient ont été cultivés en milieu LB et à 17°C sous agitation. Les surnageants de culture concentrés sont déposés sur un gel de polyacrylamide 10%. Après migration, le gel est coloré au nitrate d'argent (**A**) ou déposé directement sur une gélose à l'œuf et incubé à 37°C jusqu'à l'apparition du précipité opaque (**B**). Les flèches **a** et **b** font respectivement référence à l'estérase et à la phospholipase C. 1- Marqueur de taille ; 2- MFN1032 ; 3- MF37 ; 4- MF37 estérase négative.

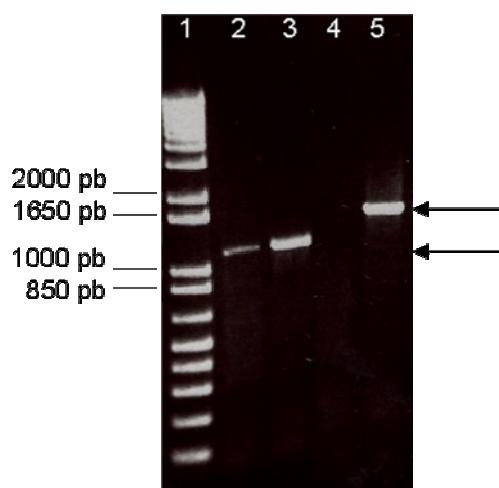


Figure 40: Amplification par PCR d'ADN de MF37 à partir des amores Plc1/Plc2 et Plc0/Plc2. Les amores Plc1/Plc2 (2 et 3) permettent l'amplification d'un fragment de 1,2 kb et les amores Plc0/Plc2 (4 et 5) permettent l'amplification d'un fragment de 1,6 kb chez MFN1032. 1- Ladder 1 kb ; 2 et 4- MF37 ; 3 et 5- MFN1032.

3.2.2.4 Recherche de la séquence *plcC* chez la souche modèle du laboratoire : *P. fluorescens* MF37

La protéine PlcC est retrouvée chez l'ensemble des souches de *P. fluorescens* dont le génome est séquencé, avec des différences notables en N-terminale et en C-terminale chez Pf0-1 et Pf-5. La souche modèle du laboratoire, MF37, présente une activité lécithinase sur gélose à l'œuf et possède une activité pNPPC hydrolase, mais ne présente pas d'activité hémolytique sécrétée. La recherche d'une protéine homologue à PlcC chez MF37 a donc été entreprise.

Des surnageants de MFN1032, MF37 et d'un mutant estérase déficient de MF37 cultivées à 17°C en milieu LB ont été analysés par migration sur SDS-PAGE (**Figure 39 A**). Un zymogramme de l'activité lécithinase a été réalisé sur gélose à l'œuf. Après 18h d'incubation à 37°C, une ou deux bandes opaques apparaissent sur le gel, selon les échantillons: l'une vers 42 kDa (**Figure 39 B**, flèche a) et la seconde, d'intensité plus faible, vers 50 kDa (**Figure 39 B**, flèche b).

La protéine de 50 kDa n'est retrouvée que chez MF37 et correspond à l'estérase puisque la bande est absente du zymogramme obtenu à partir du mutant MF37 estérase déficient (**Figure 39 B**, flèche b). Bien que MFN1032 soit capable de produire une estérase, comme on a pu le constater sur gélose au Tween 80, cette bande n'apparaît pas sur le zymogramme du surnageant de culture de la souche.

La protéine de 42 kDa produite par MF37 est une phospholipase C potentielle dont la taille est identique à la phospholipase C produite par MFN1032. La présence du gène *plcC* a donc été recherchée chez MF37 à partir des amorces Plc1/Plc2 et Plc0/Plc2. Seul le couple Plc1/Plc2, qui permet l'amplification du cadre ouvert de lecture de la PLC chez MFN1032, génère un fragment d'environ 1,2 kb. Aucune amplification n'est obtenue avec le second couple d'amorce (**Figure 40**).

Le fragment PCR obtenu a été séquencé et comparé aux banques de données. Les 1136 nucléotides amplifiés codent différentes ORF, dont une correspond à la protéine CysZ, une protéine impliquée dans le transport du sulfate.

MF37 produit donc une lécithinase qui ne présente pas d'homologie stricte avec la PlcC produite par la souche MFN1032.

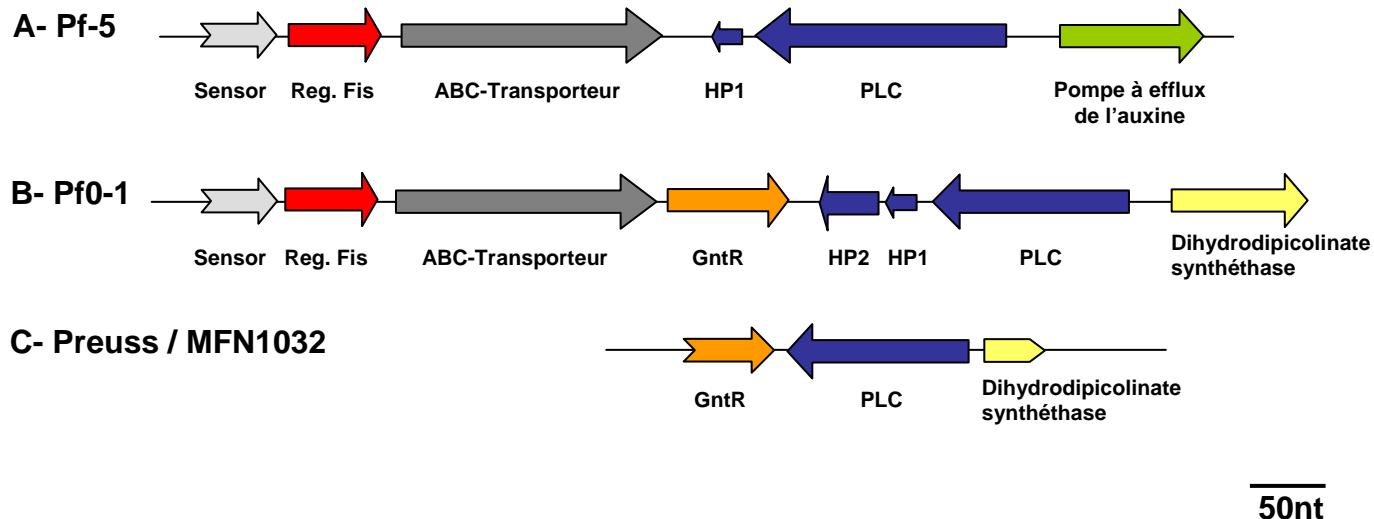


Figure 41 : Analyse de la région génique des PLCs de Pf-5 (A), Pf0-1 (B), Preuss (C) et MFN1032 (C). Les gènes retrouvés dans les régions amont et aval du gène codant la phospholipase C homologue à PlcC sont représentés. Les fonctions des protéines putatives sont indiquées en dessous de chaque gène. Les flèches bleues correspondent aux gènes en opéron avec la PLC. Pour les autres gènes, une même couleur indique une forte homologie de séquence. HP: protéine hypothétique. Les séquences ont été récupérées sur le site ncbi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): génome de Pf0-1 (locus de PLC: Pfl_0826); génome de Pf-5 (locus de PLC: PFL_0888); Preuss: AJ304443.

1-

GATGGACTTCAGTTCTTGTGGATTCAATTATTGAAACACCCCTGGGCGAAGACTTTCTA
 ACGAAAGGTTGTTGGTTTGATGATGTCGTACGTCA **TCGTACA** **ACTATAAATAA**
 ATTCTGTCAGTCAATTCTACCTCGCGTACTCCTGCGAAGGCTTAAGACGCGGCTCTT
 GACGTAGGAAATTCTCACCTATGATTGAGATAACTGTATGAATATAACAGTCATCAC
 GGAAGATTCTACGACATAGCAAGGAGCTAACATG.....260

Figure 42 : Région amont de *plcC* de MFN1032. La région amont du gène *plcC* présente le motif consensus du site de fixation du régulateur transcriptionnel GntR, précisément de la sous famille FadR: (T.GT-N(0-3)-AC.A) (indiqué en rouge).

3.2.2.5 Caractérisation de la région aval du gène *plcC*

L'analyse *in silico* des opérons PLCs chez Pf-5 et Pf0-1 montre que les deux souches possèdent respectivement un et deux gènes en aval, orientés dans le même sens que la PLC (**Figure 41, A et B**). Ces gènes codent des protéines putatives de fonction inconnue (HP1, HP2).

Chez Preuss, le séquençage de la région aval de la PLC montre qu'il n'existe pas de gènes organisés en opéron avec la PLC chez cette souche. Le gène situé en aval du gène codant la PLC est orienté en sens inverse, et code une protéine régulatrice de la famille GntR. Le gène codant cette protéine est également retrouvé chez Pf0-1, mais pas chez Pf-5. La région génique est très variable en fonction de la souche concernée (**Figure 41, A et B**).

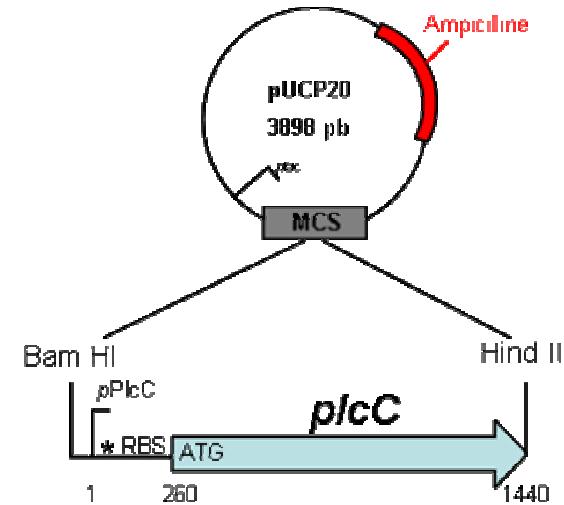
L'analyse de la région aval de *plcC* chez MFN1032 a donc été entreprise. Les amores ont été choisies à partir de la séquence génique pour laquelle MFN1032 présentait le plus d'homologie, donc celle de Preuss, de manière à amplifier les gènes situés entre le gène spécifiant la protéine GntR et *plcC*. Un fragment d'environ 800 pb a été obtenu. Le fragment PCR a été séquencé et la séquence comparée aux banques de données. La région aval de *plcC* chez MFN1032 est identique à celle de la PLC décrite par Preuss (**Figure 41, C**). Le gène *plcC* est immédiatement suivi du gène codant une protéine régulatrice de type GntR, orienté en sens inverse de *plcC*.

La comparaison aux banques de données du gène spécifiant la protéine régulatrice GntR de MFN1032 montre que la séquence présente le motif consensus de la sous-famille FadR. Les protéines FadR représentent 40% des protéines GntR connues, et sont généralement impliquées dans la régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras (Rigali *et al.*, 2002).

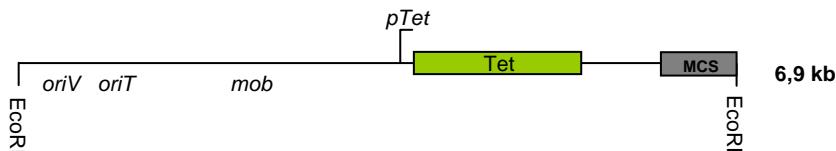
Ces protéines régulatrices se dimérisent et interagissent avec l'ADN au niveau du promoteur du gène qu'elles régulent, grâce à la structure « Hélice-Tour-Hélice » de la partie N-Terminale de la protéine. Ces régulateurs peuvent être des activateurs ou des répresseurs, et entretiennent également leur propre expression (boucle de rétroaction poitive).

Le consensus du site de liaison des facteurs transcriptionnels de la sous-famille FadR (T.GT-N(0-3)-AC.A) a été déterminé par Rigali *et al.* (Rigali *et al.*, 2002). Ce consensus est retrouvé dans la région amont du gène *plcC* (**Figure 42**), suggérant

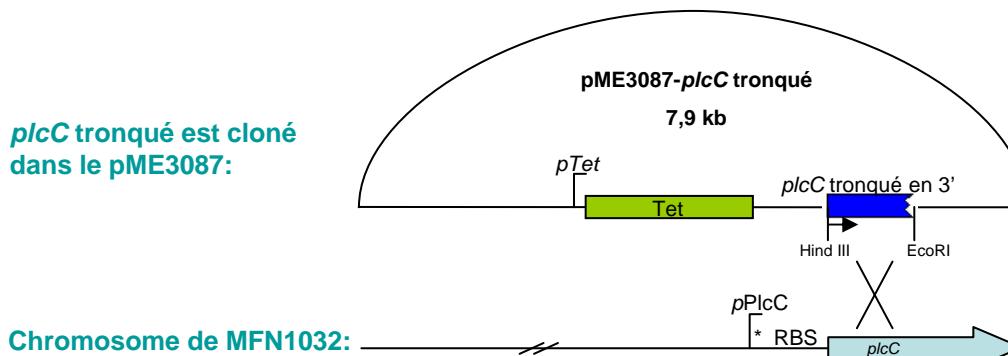
A- pMF36



B- 1- pME3087



2- Simple recombinaison homologue



3- Insertion chromosomique: obtention de la souche MFN1037

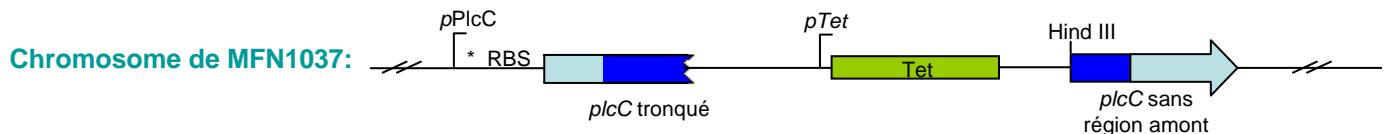


Figure 43: Construction des mutants *pICC* de MFN1032.

A- Plasmide pMF36: le gène codant *plcC* et sa région amont ont été clonés dans le vecteur pUCP20, transférable chez *Pseudomonas*, pour donner le plasmide pMF36. Le gène est placé sous le contrôle du promoteur *plac*, inducible par l'IPTG.

B- Interruption du gène *plcC* chez MFN1032: le gène *plcC* a été cloné dans le vecteur pMosBlue puis digéré par le couple d'enzymes HindIII/EcoRI pour donner une séquence de 1kb tronquée en 3'. Le gène tronqué a été cloné dans le vecteur suicide pME3087 (1), qui porte la résistance à la tétracycline. Chez MFN1032, le plasmide est intégré dans le chromosome par simple recombinaison homologue (2). Chez MFN1037, la région présente une séquence *plcC* tronquée et une séquence *plcC* sans région amont, indispensable à l'expression du gène (3). Le mutant complémenté MFN1038 est obtenu par complémentation de la souche MFN1037 par le plasmide pME36.

MCS: site de multiclonage; **RBS**: Ribosome Binding Site; **pPlcC**: promoteur de *plcC*; *: site de fixation du GntR; **Tet**: gène de résistance à la tétracycline

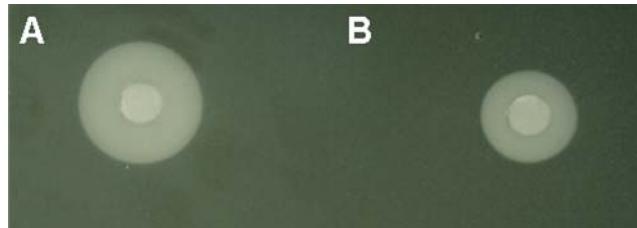


Figure 44: Appréciation de l'activité lécithinase sur gélose à l'œuf de MFN1032 et MFN1036. Les surnageants de culture des souches MFN1036 (A) et MFN1032 (B) cultivées à 28°C, ont été concentrés sur filtre Amicon Ultra-15. 5 µL de surnageant ont été déposés sur un filtre stérile disposé sur une gélose à l'œuf. La gélose a été incubée à 37°C sur la nuit.

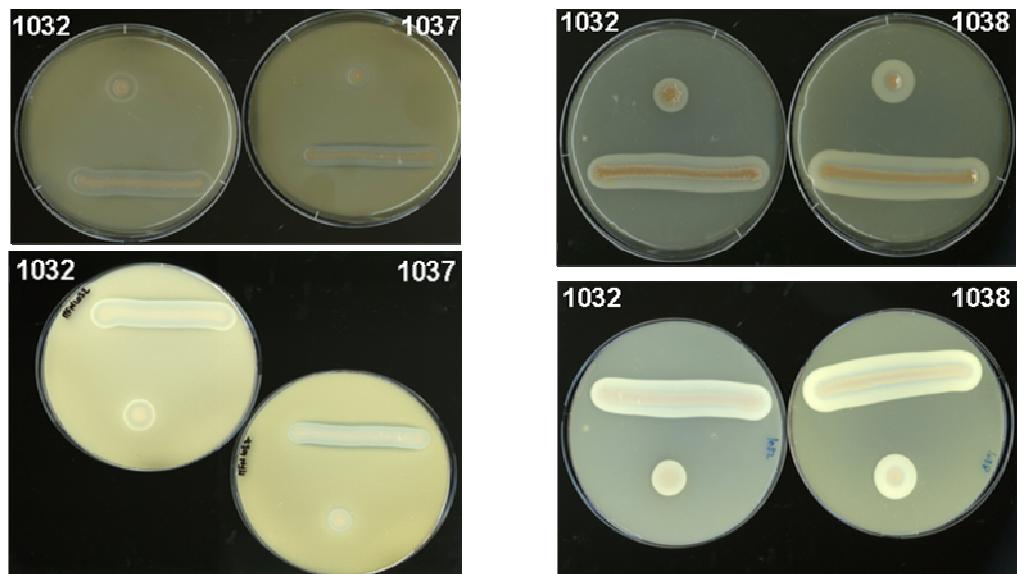


Figure 45: Activité lécithinase sur gélose à l'œuf à 28°C de MFN1032 et de ses mutants MFN1037 (*pICC*-déficient) et MFN1038 (*pICC*-déficient complémenté). Les bactéries ont été ensemencées par strie ou piqûre centrale. Les géloses ont été incubées 48h à 28°C. L'activité lécithinase est révélée par la présence du halo opaque autour de la croissance bactérienne. A: géloses vues du dessus; B: géloses vues du dessous.

que l'expression de la phospholipase C produite par MFN1032 est sous le contrôle de ce régulateur transcriptionnel.

3.3 Construction de mutants *plcC*

3.3.1 Construction des mutants – présentation des souches

Afin de déterminer l'impact de la phospholipase C PlcC sur l'activité hémolytique de la souche MFN1032, différents mutants *plcC* ont été construits (**Figure 43**).

Le mutant MFN1036 possède le plasmide pUCP20 qui porte le gène *plcC* sous le contrôle du promoteur inductible *p lac* (pMF36). Il permet de surexprimer *plcC* par addition d'IPTG dans le milieu de culture. Le mutant MFN1037 a été obtenu par insertion du plasmide pME3087 portant le gène *plcC* tronqué en 3' dans le chromosome de MFN1032. Le mutant MFN1037 a été complémenté en *trans* par le plasmide pMF36 pour donner MFN1038.

L'ensemble des constructions a été vérifié par extraction plasmidique suivie d'une digestion enzymatique (MFN1036 et MFN1038) ou par PCR (MFN1037).

3.3.2 Phénotypes des différents mutants sur gélose à l'œuf

La surexpression de *plcC* par MFN1036 a été contrôlée par appréciation du diamètre de l'activité lécithinase sur gélose à l'œuf. Les surnageants concentrés sont déposés sur un disque stérile, lui-même disposé sur une gélose à l'œuf. Après quelques heures d'incubation à 37°C, MFN1036 produit un précipité plus important que la souche sauvage (**Figure 44**).

La vérification des souches MFN1037 et MFN1038 a été réalisée par étude phénotypique sur gélose à l'œuf (**Figure 45**). Malgré l'extinction du gène *plcC*, la souche MFN1037 présente une activité lécithinase. Cette activité est réduite par rapport au sauvage mais suppose que MFN1032 sécrète plusieurs phospholipases ou d'autres enzymes capables d'hydrolyser la lécithine, comme c'est le cas de l'estérase produite par MF37 par exemple, ou que le gène *plcC* est exprimé faiblement à partir du promoteur *pTet*.

Tableau 19: Comparaison de l'activité hémolytique de la souche MFN1032 avec les mutants *plcC*

Température de croissance	8°C	17°C	28°C
	% de Lyse		
Souches			
MFN1032	98 ± 1	83 ± 17	26 ± 3
MFN1036	nd	100 ± 2	74 ± 13
MFN1037	2 ± 1	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,2
MFN1038	2 ± 1	0,4 ± 0,1	1 ± 0,2

MFN1036 : mutant surexprimant *plcC*

MFN1037 : mutant *plcC* déficient

MFN1038 : mutant MFN1037 complémenté en *trans* par pMF36.

L'activité hémolytique est déterminée sur les surnageants de cultures âgées de 15 G et réalisées en milieu LB à différentes températures de croissance. (n≥3).

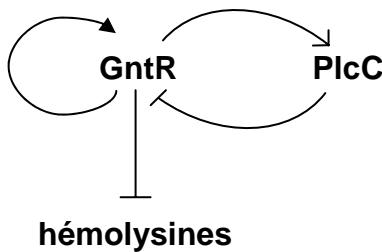


Figure 46: Schéma de modélisation des interactions possibles entre PlcC et GntR.

Le régulateur transcriptionnel GntR stimule la synthèse de PlcC et sa propre synthèse (boucle de rétroaction positive), mais réprime celle d'un facteur impliqué dans l'hémolyse. En contrepartie, PlcC réprime l'expression de *gntR* créant ainsi une boucle de rétroaction négative. L'augmentation de l'expression de PlcC, comme chez le mutant MFN1036, inhibe l'expression de *gntR*, ce qui a pour conséquence une augmentation d'hémolysines. Chez MFN1037, *plcC* est éteint donc GntR est produit en grande quantité et la synthèse d'hémolysine est inhibée. Chez MFN1038, l'expression de PlcC ne suffit pas à faire diminuer la quantité de GntR, à cause de la rétroaction positive de GntR sur lui-même, et le phénotype sauvage n'est pas restauré.

La souche MFN1038 présente une activité lécithinase équivalente voire supérieure à celle du sauvage, ce qui montre que l'expression du gène *p/CC* est effective dans cette construction.

D'autre part, les mutants MFN1037 et MFN1038 présentent des phénotypes différents de la souche sauvage : alors que MFN1032 présente clairement une variation phénotypique (colonie en « fleur ») (voir partie III), MFN1037 et MFN1038 semblent phénotypiquement stables.

3.3.3 Activité hémolytique de MFN1032 et de ses mutants *p/CC* en fonction de la température de croissance

L'activité hémolytique des mutants a été déterminée à différentes températures de croissance et comparée à celle obtenue pour la souche sauvage MFN1032.

Le pouvoir hémolytique de la souche MFN1036, qui surexprime *p/CC*, est 3 fois supérieur à celui de MFN1032 lorsque les bactéries sont incubées à 28°C (**Tableau 19**). L'activité hémolytique est également supérieure à 17°C (**Tableau 19**). La phospholipase C PlcC est donc bien impliquée dans l'activité hémolytique de la souche MFN1032.

Le pouvoir hémolytique de la souche *p/CC* déficiente MFN1037 est pratiquement nul (**Tableau 19**). Complémentée en *trans* par le pMF36 (souche MFN1038), l'activité hémolytique n'est pas restaurée (**Tableau 19**). La perte de l'activité hémolytique ne peut être due à un effet polaire occasionné par l'insertion chromosomique du plasmide, étant donné qu'aucun gène n'est en opéron avec *p/CC*.

L'implication du régulateur GntR a été envisagée en se basant sur l'hypothèse que GntR contrôle l'expression de *p/CC*, l'expression d'une ou plusieurs autres hémolysines et sa propre expression. D'après les résultats obtenus, différents cas peuvent être envisagés, en fonction des interactions positives ou négatives entre le couple PlcC/GntR et GntR/hémolysine.

L'hypothèse choisie est que PlcC réprime l'expression de GntR (créant ainsi une boucle de rétroaction négative) et que GntR réprime l'expression d'une hémolysine (**Figure 46**). Ainsi, lorsque PlcC est sur-exprimée, comme chez

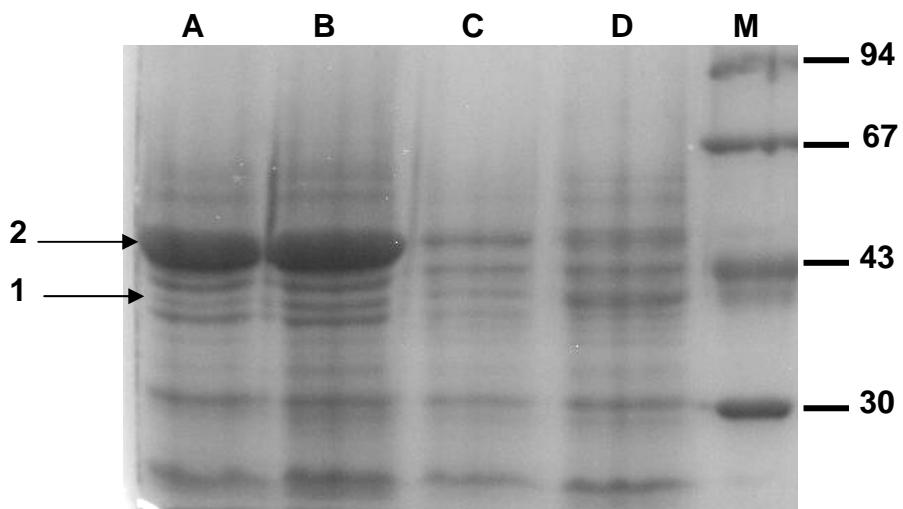


Figure 47: Profil électrophorétique SDS-PAGE des surnageants de culture de MFN1032 et de ses mutants *plcC*. Les souches ont été cultivées à 17°C en milieu LB sur 15 G. Les surnageants de cultures ont été filtrés et concentrés sur Amicon ultra-15. 40 µg de protéines ont été déposés sur un gel de polyacrylamide à 10% et les protéines ont été révélées par une coloration au bleu de Coomassie. A: MFN1032, B: MFN1036; C: MFN1037; D: MFN1038; M: marqueur de masse moléculaire. 1: PlcC; 2: flagelline.

MFN1036, l'expression du régulateur GntR diminue et la répression de l'hémolysine est levée, ce qui aboutit à une augmentation du pouvoir hémolytique de la souche.

Chez MFN1037, l'absence de PlcC permet l'expression de GntR, qui s'auto-entretient. L'expression de l'hémolysine est réprimée et la souche ne présente plus d'activité hémolytique. Chez MFN1038, la surexpression de PlcC ne suffit pas à diminuer suffisamment la quantité de GntR, qui s'est accumulé et qui exerce toujours son rôle de répresseur sur l'hémolysine. Dans ce cas, l'activité hémolytique n'est pas restaurée.

Ce facteur hémolytique serait indispensable à l'activité hémolytique de la souche.

3.3.4 Analyse SDS-PAGE des différents mutants

L'analyse électrophorétique des surnageants des différents mutants cultivés à 17°C montre clairement deux profils distincts. Les profils retrouvés pour la souche sauvage MFN1032 et le mutant de surexpression MFN1036 sont relativement identiques. La surexpression de PlcC par MFN1036 est caractérisée par une intensité de bande plus importante vers 42 kDa (**Figure 47**, flèche 1).

Une protéine d'environ 50 kDa est fortement produite par MFN1032 et MFN1036 (**Figure 47**, flèche 2) et absente chez MFN1037 et MFN1038. Après transfert des protéines sur une membrane PVDF, la protéine d'intérêt a été soumise à une dégradation d'Edman et à un séquençage N-terminal. Le motif obtenu (ALTNVNIAS) a été comparé aux banques de données et a permis l'identification de la protéine en tant que flagelline.

Il semble que la perturbation de la région *p/CC* agisse sur la présence de flagelline dans le surnageant de MFN1032.

3.3.5 Comparaison de la mobilité

La flagelline est une des protéines constitutives du flagelle bactérien. Sécrétées à travers le corps flagellaire dans le milieu extracellulaire, les flagellines

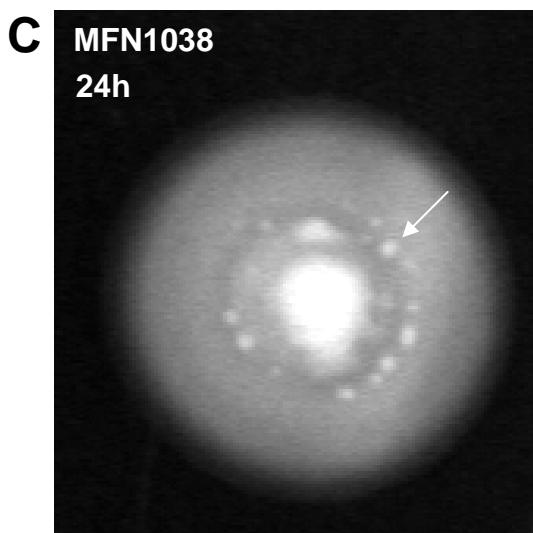
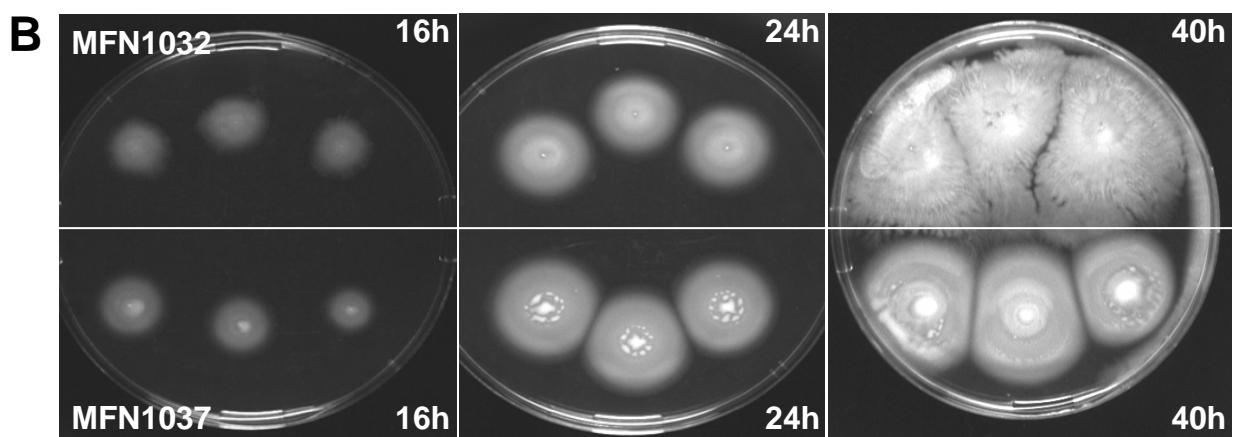
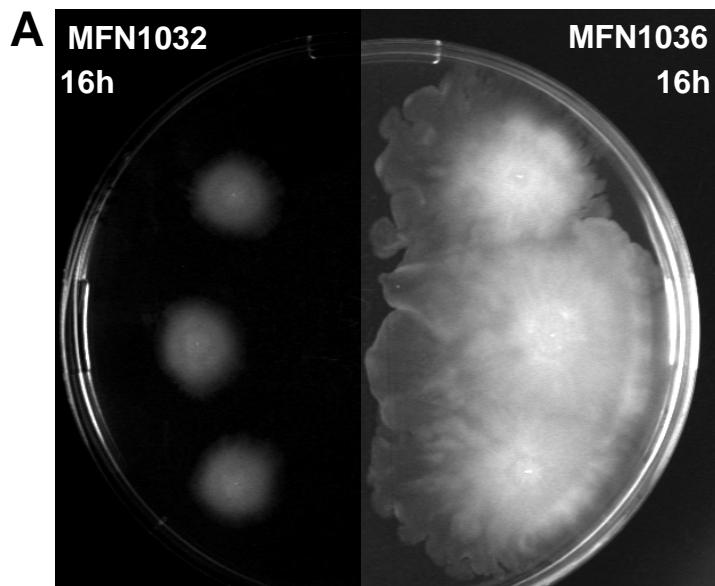


Figure 48: Mobilité de type swimming de MFN1032 et de ses mutants *plicC*. Le swimming a été réalisé sur milieu LBG à 0,3 %. Le dépôt des bactéries se fait au cure-dent. Les boîtes sont incubées pendant 40h à 28°C, et l'observation est effectuée après 16h, 24h et 40h de croissance (le temps est indiqué sur chacune des photos).

s'assemblent pour former le filament. Les flagelles sont impliqués dans différents processus bactériens, leur premier rôle étant la mobilité bactérienne. Deux types de mobilités imputées en partie aux flagelles sont retrouvés chez les bactéries possédant des flagelles:

- le swimming ou « la nage » correspond à un déplacement de la bactérie en milieu liquide ou semi-liquide.
- le swarming ou « essaimage » est une alternative à la nage, observée lorsque les bactéries sont cultivées sur un milieu solide.

3.3.5.1 Mobilité de type swimming

La mobilité de type swimming a été déterminée pour MFN1032 et les différents mutants *plcC*. Les mobilités observées sont différentes en fonction de la souche concernée.

MFN1032 montre une croissance circulaire assez homogène alors que MFN1036 présente, dans les mêmes conditions de croissance, un envahissement rapide de la boîte de Pétri (**Figure 48, A**).

Bien que le pourcentage d'agar des géloses ait été choisi de manière à observer la nage, on constate que MFN1036 fait de l'essaimage. Chez *P. fluorescens* tout comme chez *P. aeruginosa*, le swarming est directement corrélé à la production de biosurfactants. Sur la gélose sur laquelle est cultivée MFN1036, on observe un halo transparent qui entoure la zone de croissance bactérienne. Ce halo est également retrouvé pour MFN1032, mais dans une moindre mesure. Il s'agit très certainement des biosurfactants sécrétés par les souches.

La souche MFN1037 se déplace de façon quantitativement similaire à la souche sauvage. Cependant, en surface et particulièrement après 16h d'incubation à 28°C, on peut observer la formation de « colonies » sur le halo de croissance (**Figure 48, B**). Ces colonies sont formées à distance égale de la piqûre initiale de la gélose et disparaissent après 40h d'incubation. Le même phénotype est retrouvé pour la souche MFN1038 (**Figure 48, C**). Pour les deux souches MFN1037 et

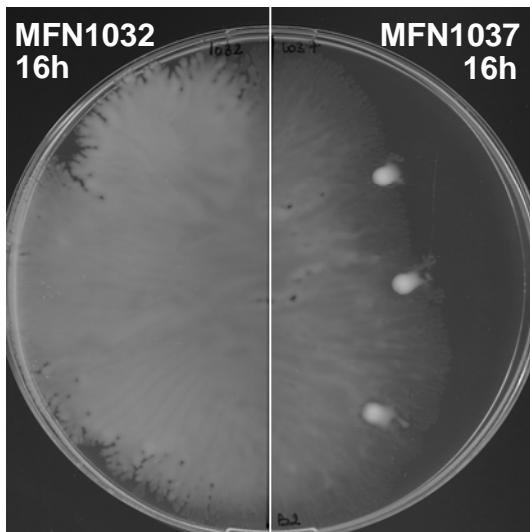


Figure 49: Mobilité de type swarming de MFN1032 et du mutant *plicC* MFN1037. Le swarming a été réalisé sur milieu LBG à 0,6%, en ensemencant 5 µL de suspension bactérienne à la surface de la gélose. Les boîtes sont incubées pendant 16h à 28°C.

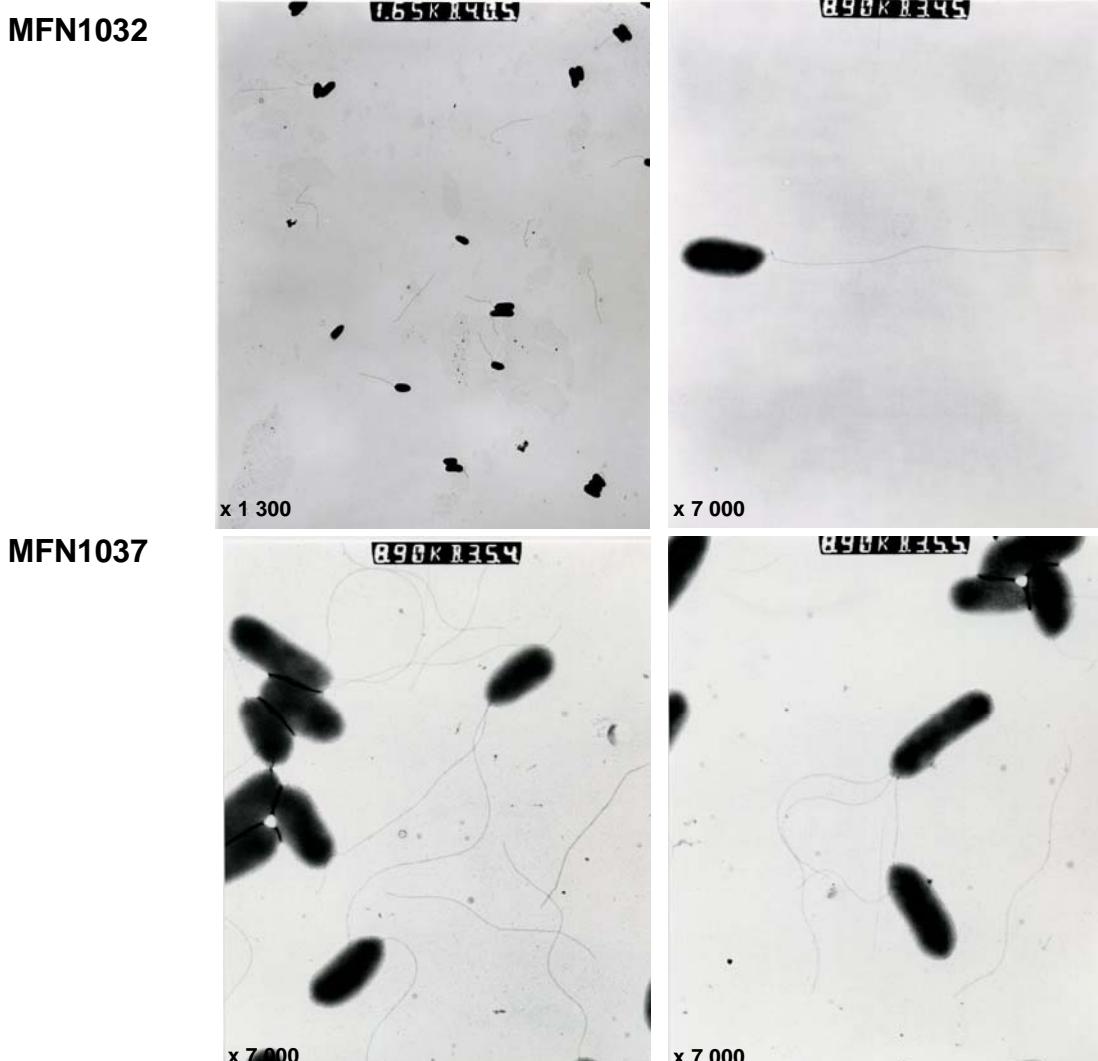


Figure 50: Visualisation des flagelles de MFN1032 et MFN1037 au MET. Les bactéries ont été cultivées en milieu LB à 28°C jusqu'en phase stationnaire de croissance. Les cellules sont ensuite colorées par une coloration négative à l'acide phosphotungstique. Le grossissement est indiqué sur chaque photo.

MFN1038, aucun halo transparent n'est retrouvé autour de la croissance bactérienne, suggérant que les souches ne produisent pas de biosurfactants.

3.3.5.2 Mobilité de type swarming

Lorsqu'on réalise l'essaimage sur le milieu LB gélosé à 0,6%, la souche MFN1032 présente des halos de croissance concentriques caractéristiques (**Figure 49**) tandis que la souche MFN1037 est non mobile. Après 40h de croissance à 28°C, alors que la souche MFN1032 a envahi la boîte de Pétri, MFN1037 forme une simple colonie aux contours bien réguliers.

La perte de la mobilité de type swarming chez le mutant *p/cC* MFN1037 est soit due à l'absence de flagelles fonctionnels, soit à l'absence de production de biosurfactants.

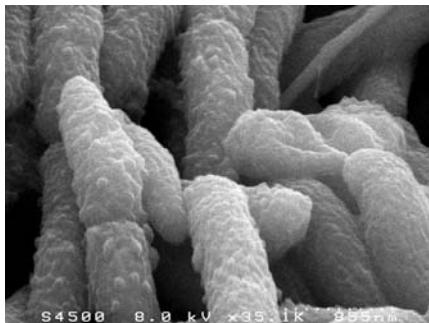
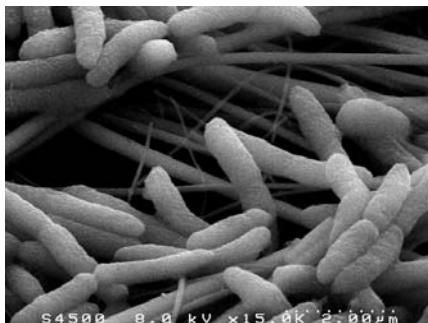
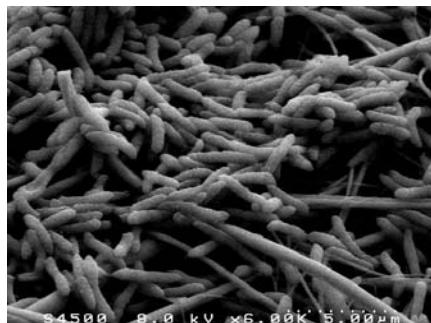
3.3.6 Visualisation des flagelles bactériens de MFN1032 et de son mutant *plcC* déficient

La diminution de la quantité de flagelline retrouvée dans le surnageant du mutant MFN1037 peut s'expliquer, soit par la diminution de la production et/ou la sécrétion de la protéine par la bactérie, soit par la présence de flagelles plus solides et donc moins sujets à une rupture mécanique responsable de la présence de flagelline dans le surnageant.

L'observation des flagelles par microscopie électronique à transmission (MET) montre que la souche MFN1032 présente un seul flagelle polaire (**Figure 50**). Cette configuration est habituellement retrouvée chez *P. aeruginosa*, plutôt que chez *P. fluorescens*. La souche MFN1037 présente, quant à elle, 1 à 3 flagelles polaires. Par conséquent, l'absence de flagelline dans le surnageant de culture de MFN1037 n'est pas due à l'absence de sécrétion de flagelline mais plutôt à la présence de flagelles plus solides. L'ancrage de la flagelline au sein du filament est peut être stabilisé.

La présence de flagelline dans le surnageant de la souche sauvage MFN1032 pourrait être due à une mauvaise incorporation de la flagelline dans le filament, d'où la présence de flagelles cassés comme on peut l'observer autour des corps bactériens de MFN1032.

MFN1032



MFN1037

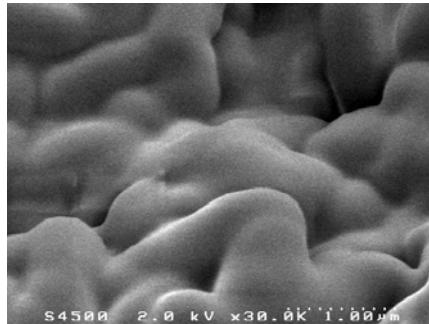
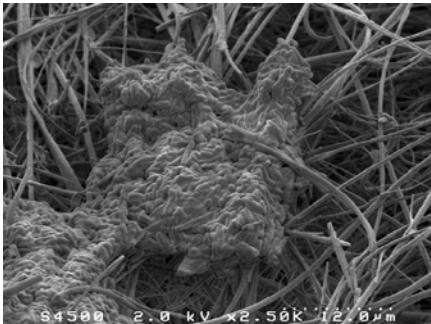


Figure 51 : Visualisation de MFN1032 et MFN1037 au MEB. L'observation des bactéries a été réalisée sur des cellules en phase exponentielle de croissance en milieu LB et à 28°C.

Tableau 20: Production des biosurfactants CLPs chez MFN1032 et les mutants *plcC*.

Souches	Viscosinamide	Viscosinamide'	α
MFN1032	+	+	+
MFN1037	-	-	-
MFN1038	-	-	-

L'absence de mobilité de type swarming chez MFN1037 n'est donc pas due à l'absence de flagelles mais probablement à une baisse de production de biosurfactants.

Sur les grilles d'observations, les cellules de MFN1037 sont plus nombreuses que celles de MFN1032, et forment des agrégats, bien que les échantillons aient été préparés de la même façon. Cette constatation suggère que les deux souches possèdent des propriétés physico-chimiques de surface différentes.

Au cours de l'observation des bactéries au microscope électronique à balayage (MEB), réalisée en collaboration avec le laboratoire INRA de Massy, nous avons constaté que les cellules MFN1037 présentent des différences de morphologie cellulaire par rapport à la souche MFN1032.

La souche MFN1032 est répartie de façon homogène sur le filtre et la surface cellulaire présente de petits bourgeonnements (**Figure 51**). MFN1037 présente des caractéristiques complètement différentes, avec des amas cellulaires recouverts d'une substance « grasse » (**Figure 51**).

L'étude des propriétés de surface des deux souches, en utilisant la technique de MATS (Hemery *et al.*, 2007), est actuellement en cours.

3.3.7 Comparaison de la production de biosurfactants par MFN1032 et son mutant *p/lcC* déficient

La production de biosurfactant par les souches MFN1037 et MFN1038 a été recherchée par l'analyse des surnageants de culture en chromatographie liquide à haute pression couplée à la spectrométrie de masse. Les spectres obtenus montrent qu'à 28°C, aucune des deux souches ne produit de viscosinamide et viscosinamide', ou le composé α retrouvés dans le surnageant de MFN1032 (**Tableau 20**).

La perte de la mobilité de type swarming est donc due à l'absence de production des CLP, dont la production semble être intimement liée à PlcC.

CONCLUSION PARTIE II

La souche MFN1032, une souche de *P. fluorescens* bv I, a été le seul contaminant retrouvé dans un compartiment normalement stérile d'un patient hospitalisé atteint d'une infection pulmonaire. MFN1032 est capable de pousser à 37°C dans les conditions de laboratoire et, contrairement à certaines souches issues de l'environnement, elle présente une activité membranolytique importante vis-à-vis des hématies de mouton. Ce travail avait pour objectif de déterminer les facteurs qui pouvaient être impliqués dans cette activité.

L'étude de l'activité hémolytique a montré que l'hémolyse de MFN1032 était régulée par la température de croissance, avec un optimum aux basses températures, ce qui est plutôt en accord avec la nature psychrotrophe de la souche. Toutefois, ce profil de régulation ne remet pas forcément en question son pouvoir pathogène *in vivo*. En effet, il est décrit que certains facteurs, dont le rôle dans la virulence de la bactérie a été démontré, ne sont produits à 37°C que dans certaines conditions de culture (pH, osmolarité etc..) (Schmiel *et al.*, 2000).

Une bactérie peut produire différents types d'hémolysines, et il n'est pas rare de constater que la lyse résulte de l'action synergique d'au moins deux facteurs. Les différents résultats obtenus lors de ce travail de thèse suggèrent que c'est le cas pour la souche MFN1032.

L'implication d'une phospholipase C dans l'activité hémolytique de la souche MFN1032 a été rapidement supposée, puis démontrée grâce à la caractérisation moléculaire d'une phospholipase C (PlcC) et l'obtention de mutants.

La comparaison du gène *plcC* aux banques de données a permis de démontrer que MFN1032 produit une phospholipase C, qui semble appartenir à une nouvelle classe de PLCs retrouvées chez l'ensemble des *P. fluorescens* dont le génome est séquencé. PlcC est identique à 98% à une phospholipase C produite par une souche de *P. fluorescens* décrite par Preuss *et al.*. La caractérisation biochimique de la PLC décrite par Preuss *et al.* suggère que la protéine possède des propriétés distinctes des métallophospholipases à zinc produites par les bactéries à Gram-positif et du groupe des PC-PLCs produites par certaines bactéries à Gram-négatif. Bien que la caractérisation biochimique de la phospholipase C de MFN1032 n'ait pas été réalisée, l'extrapolation est acceptable, compte tenu de la forte identité

entre les deux protéines. Preuss *et al.* n'avaient pas recherché le pouvoir hémolytique de l'enzyme purifiée. L'obtention de mutants *p/cC* chez MFN1032 a permis d'apprécier le rôle de l'enzyme dans l'activité hémolytique.

La surexpression de la phospholipase PlcC chez MFN1032 (souche MFN1036) est accompagnée d'une augmentation du pouvoir hémolytique de la souche. Il est difficile de déterminer si cette augmentation est directement due à l'activité de l'enzyme elle-même (PLC hémolytique) ou indirectement par la surproduction d'autres facteurs impliqués dans l'hémolyse. En effet, nous avons pu constater que la surexpression de PlcC est corrélée à une augmentation de la production de biosurfactants. Les différents résultats obtenus suggèrent que les biosurfactants sont impliqués dans l'activité hémolytique de la souche, ce qui justifierait que ces deux facteurs soient co-régulés. Chez *Proteus mirabilis*, une augmentation de la synthèse d'uréase, de protéase et d'hémolysine extracellulaire est constatée lors de l'essaimage (Fraser *et al.*, 2002). De la même façon, nous avons pu constater que la surexpression de PlcC chez MFN1036 a pour conséquence une mobilité de type swarming plus importante, due à l'augmentation de la production des CLP.

Au contraire, le mutant MFN1037 *p/cC* déficient n'est plus hémolytique, ne produit pas de biosurfactant et n'essaime pas, bien qu'il possède des flagelles. Ceci renforce l'hypothèse d'une interaction entre la production de biosurfactants et la PlcC, et de leur implication dans l'hémolyse.

La complémentation en *trans* de ce mutant par le gène *p/cC* (souche MFN1038) ne permet de rétablir ni l'activité hémolytique, ni la production de biosurfactants.

La perturbation de la région génique *p/cC* par insertion du plasmide pourrait être responsable de la perte du pouvoir hémolytique de la souche. L'analyse des régions amont et aval des phospholipases C homologues à PlcC chez les deux souches de *P. fluorescens* Pf0-1 et Pf-5 montre, qu'en fonction de la souche, les gènes appartiennent à un opéron, respectivement constitué d'un ou deux gènes qui codent des protéines putatives de fonction inconnue. L'étude de la région aval de la PLC identifiée et séquencée par Preuss *et al.*, et celle de la région aval de PlcC chez MFN1032 montrent que les gènes « *p/c* » sont suivis d'un gène spécifiant une protéine régulatrice, dont l'orientation est antisens. Par conséquent, l'insertion du

plasmide n'aurait dû occasionner aucune perturbation sur l'expression d'autres gènes que *p/IC*.

La clé se situe probablement au niveau du régulateur transcriptionnel GntR, dont le gène est situé en aval de *p/IC*. La présence d'un site de liaison consensus sur la région promotrice de *p/IC* suggère que la protéine GntR régule l'expression de la phospholipase C. GntR pourrait réguler également l'expression d'autres gènes que *p/IC*, ce qui formerait « un régulon GntR ». Une des hypothèses envisageables serait que GntR contrôlerait la production des biosurfactants chez MFN1032, comme cela est supposé pour le régulateur YcxD, qui fait partie de la famille des GntR et qui régulerait l'opéron surfactine chez *B. subtilis* (Rigali et al., 2002).

Différents modèles peuvent être envisagés et, actuellement, nous n'avons pas assez de données pour déterminer les interactions réelles qui existent entre les différents acteurs du système. Toutefois, d'un point de vue dynamique, l'hypothèse d'une régulation négative de PlcC sur GntR et de GntR sur les biosurfactants permet d'expliquer le phénotype des différents mutants *p/IC* obtenus.

Dans ce cas précis, ceci expliquerait à la fois pourquoi une surexpression de PlcC provoque une augmentation de la synthèse des biosurfactants (en inhibant la répression de GntR sur leur expression) et pourquoi une perte du gène *p/IC* aboutit à un phénotype non producteur de tensio-actifs (surexpression de GntR).

Dans le cas du mutant complémenté MFN1038, la surexpression effective de PlcC ne suffit pas à restaurer le phénotype. Il est possible que la quantité de régulateur soit devenue trop importante et que le système s'auto-entretienne.

Cette hypothèse pourra être vérifiée en introduisant en *trans* chez MFN1032 le régulateur GntR sur un plasmide inductible et en étudiant le phénotype obtenu. Cette souche, en effet, devrait être non productrice de biosurfactants.

Il est difficile d'établir le lien exact entre la perte du gène *p/IC* et l'augmentation du nombre de flagelles chez la souche MFN1037. Il s'agit peut être d'un effet pléiotrope de la mutation. Chez *P. aeruginosa*, qui présente comme MFN1032 un seul flagelle polaire, le nombre de flagelles est régulé par FleN. Un mutant *fleN*-déficient présente un phénotype multi-flagellé, avec la présence de 3 à 6 flagelles polaires. FleN augmenterait l'activité du régulateur transcriptionnel FleQ, qui agit sur près de 6 opérons impliqués dans la biosynthèse des flagelles (Dasgupta et

al., 2000). Il est possible qu'un tel gène intervienne dans l'augmentation du nombre de flagelles chez MFN1032, et le lien avec *p/IC* sera à déterminer.

D'une manière générale, le flagelle intervient dans la sécrétion de protéines extracellulaires, et notamment dans celle de facteurs de virulence (Young et al., 1999). Différentes études ont montré qu'il existait une relation étroite entre le régulon flagellaire et des phospholipases.

Les phospholipases PLA₍₁₎ produites par *Y. enterocolitica* et *S. liquefasciens* sont sécrétées directement par le corps flagellaire dans le milieu extracellulaire, au même titre que la flagelline (Givskov et al., 1995; Young et al., 1999). L'expression de ces phospholipases est elle-même régulée par le facteur sigma FliA, qui régule l'expression des gènes de classe III du régulon flagellaire. Dans le cas de *Y. enterocolitica*, l'impact éventuel d'une mutation de *ypA* sur le régulon flagellaire a été recherché et n'a montré aucun effet particulier.

Chez *B. thuringiensis*, l'expression de la phospholipase C PC-PLC ne dépend pas du régulon flagellaire, mais l'absence de corps flagellaire diminue la quantité de protéine sécrétée dans le milieu extracellulaire, suggérant que la PC-PLC utilise le flagelle comme voie de sécrétion (Ghelardi et al., 2002).

Chez *Xenorhabdus nematophila*, il apparaît que ni l'expression, ni la sécrétion de la lécithinase ne soit affectée par une mutation dans l'opéron *flhDC*. Cependant, il semblerait qu'une surexpression de *flhDC* diminue l'activité lécithinase (Givaudan et Lanois, 2000).

La phospholipase C PlcC produite par MFN1032 ne présente aucun motif de signal de sécrétion qui permettrait de déterminer la voie de sécrétion de la protéine. La possibilité que PlcC soit sécrétée par le flagelle est envisageable et va donner lieu à des investigations supplémentaires.

Au cours de l'étude de l'activité hémolytique de la souche MFN1032, nous avons observé des variations importantes d'activité. Des variants phénotypiques apparaissent au cours des repiquages de MFN1032 sur certains milieux de culture, et ces variants sont affectés, entre autre, dans l'activité hémolytique.

La partie III est donc consacrée à la caractérisation de ces variants.

Résultats - Discussion

Partie III : variation phénotypique de la
souche MFN1032

A-

Culture	1	2
% de Lyse	25	100

B-

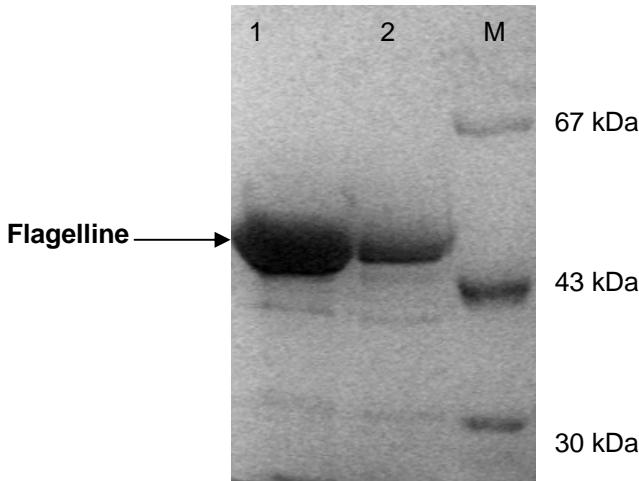


Figure 52: Activité hémolytique (A) et Profils électrophorétiques SDS-PAGE (B) de surnageants de culture de la souche MFN1032. Les cultures 1 et 2 sont réalisées à 17°C et en milieu LB, à partir de la même pré-culture et dans les mêmes conditions de croissance. (A) Les surnageants sont mis en contact pendant 2h à 37°C avec 600 µL d'hématies à 2%. (B) Les surnageants sont concentrés sur filtre Amicon ultra-15. 15 µL sont déposés sur un gel de polyacrylamide à 10%. Après migration, le gel est coloré au nitrate d'argent. 1: culture 1; 2: culture 2; M: marqueur de masse moléculaire.

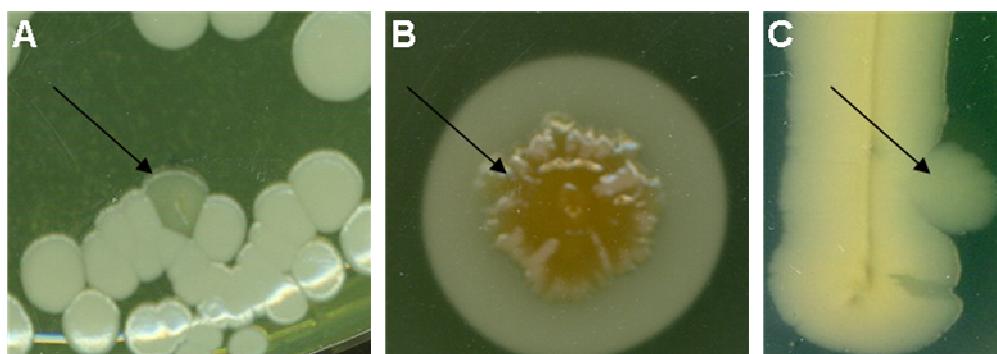


Figure 53: Variation phénotypique de la souche MFN1032 cultivée sur milieu KB (A, C) et sur gélose à l'œuf (B).

1 Mise en évidence de variation de phénotype chez la souche MFN1032

Des variants phénotypiques sont apparus au cours des différentes expériences réalisées dans le cadre de l'étude de l'activité hémolytique de la souche MFN1032. L'activité hémolytique de la souche semble directement concernée par ce mécanisme puisque d'importantes variations d'activité ont été retrouvées, particulièrement lorsque la souche était cultivée à 17°C.

Deux cultures réalisées dans les mêmes conditions et à partir de la même pré-culture peuvent présenter des activités hémolytiques complètement différentes (**Figure 52, A**). L'analyse SDS-PAGE des surnageants de chacune des cultures montre également des différences au niveau des profils électrophorétiques, notamment au niveau de la production de la protéine d'environ 50 kDa identifiée comme étant une flagelline (**Figure 52, B**).

En culture sur milieu solide, l'émergence de variants semble être favorisée lorsque la souche est cultivée sur le milieu King B ou sur gélose à l'œuf (**Figure 53**).

Sur milieu King B, la souche MFN1032 donne normalement des colonies blanches, opaques et fluorescentes. Trois phénotypes différents ont été recensés sur ce milieu. Deux variants sont affectés dans la production du sidérophore pyoverdine (souche déficiente **Pyo⁻** ou hyper-productrice **Pyo⁺⁺**), et d'autres variants présentent des colonies translucides avec une fluorescence différente.

2 Détermination des fréquences d'apparition et de réversion des variants

Les variations phénotypiques peuvent être la conséquence d'une mutation ou d'un changement de phase. Le changement de phase se réfère à la présence de deux phénotypes **réversibles**, dans lesquels l'expression de gènes est réprimée (phase OFF) ou non (phase ON). Ainsi, l'évènement responsable du changement de phénotype peut être déterminé en regardant la fréquence d'apparition des variants,

Tableau 21: Détermination des fréquences d'apparition des variants phénotypiques de la souche MFN1032 après 72h de culture en milieu liquide KB sous agitation à 28°C ou 37°C.

Température d'incubation	28°C	37°C
Nombre de colonies comptables	1218	1433
Nombres de variants	4	98
Temps de génération (en h)	1	5
Fréquence par génération	4.10^{-5}	4.10^{-3}

plus élevée dans les cas de changement de phase que dans un cas de mutation, et par la présence ou non d'une réversion du phénotype.

Les fréquences d'apparition et de réversion des variants ont été déterminées selon le protocole utilisé pour l'étude de variation de phase de souches de *P. fluorescens* issues de la rhizosphère (van den Broek *et al.*, 2003).

2.1 Fréquence d'apparition

Après 72h de culture dans 20 mL de milieu KB à 28°C et sous agitation, les bactéries sont dénombrées par étalement de dilutions sur milieu King B. Le calcul du taux d'apparition des variants s'effectue en rapportant le nombre de variants au nombre total de colonies et par génération bactérienne. Entre 1000 et 1500 colonies ont été dénombrées sur les boîtes comptables.

A 28°C, la fréquence d'apparition de variants de la souche MFN1032 est de 4.10^{-5} par génération (**Tableau 21**). La température de croissance influe directement sur la fréquence de variation car le taux de variation devient 100 fois plus important (4.10^{-3} par génération) lorsque la souche est cultivée à 37°C (**Tableau 21**). Ces fréquences sont dans le même ordre de grandeur que celles retrouvées dans les cas de variation de phase, c'est-à-dire forte et supérieure au taux de mutation.

Seuls des variants formant des colonies translucides ont été dénombrés. Aucun des variants Pyo⁻ et Pyo⁺⁺ n'apparaît dans les conditions testées. Il est possible que la fréquence d'apparition et/ou de réversion de ces variants soit beaucoup plus grande, rendant le phénomène plus difficilement observable. L'influence des conditions de culture est également importante. Il a été montré que des conditions particulières de culture, et notamment des situations de stress, augmentent considérablement le nombre de variants.

8 variants formant des colonies translucides sur King B ont été repiqués à partir de l'ensemble des boîtes (comptables et non comptables).

2.2 Réversion des variants

Pour qualifier une variation phénotypique de variation de phase, le phénotype doit être réversible. Les fréquences de réversion ont été déterminées pour l'ensemble des variants obtenus.

Après 72h de culture en milieu King B, aucune réversion n'est retrouvée pour le variant Pyo⁻. La fréquence de réversion du variant qui surproduisait la pyoverdine Pyo⁺⁺ n'a pu être déterminée. Ce variant a totalement réverté durant la congélation de la souche et n'a plus été retrouvé par la suite. Les études de variation de phase montrent que certains phénotypes sont très instables du fait de fréquences de switch importantes.

Les variants formant des colonies translucides ne révertent pas après 72h d'incubation à 28°C mais évoluent vers un phénotype Pyo⁻, alors qu'aucun variant Pyo⁻ n'apparaît après 72h de culture de la souche « sauvage » MFN1032.

De nouveaux phénotypes ont également émergé, avec l'apparition de variants présentant des colonies en forme d'œufs frits. Il est possible qu'une première variation augmente la fréquence d'apparition d'un autre phénotype.

D'après Van der Woude *et al.*, les fréquences retrouvées pour les variations de phase sont comprises entre 1 cellule pour 100 par génération et 1 cellule pour 10 000 par génération. Bien que la réversion ne soit pas observée pour l'ensemble des variants étudiés **dans les conditions testées**, l'hypothèse d'un changement de phase reste possible.

3 Analyse phénotypique des différents variants de la souche MFN1032

La variation phénotypique permet d'améliorer la capacité d'adaptation des bactéries aux différentes niches écologiques. Il a été montré que dans le cas de souches de la rhizosphère, l'obtention de sous populations permet d'augmenter la capacité de colonisation des racines (Chancey *et al.*, 2002; Sanchez-Contreras *et al.*,

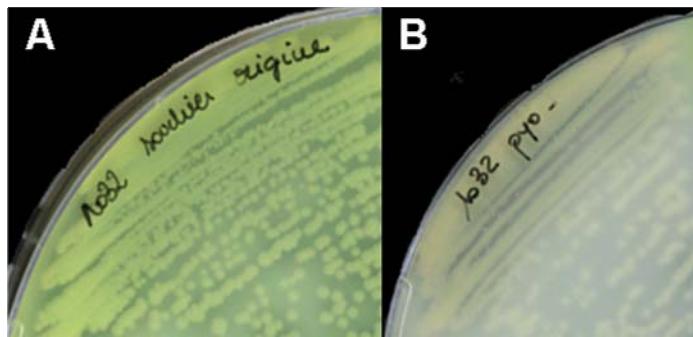


Figure 54: Activité protéase sur gélose au lait après 48h de croissance à 28°C. (A) MFN1032 ; (B) souche Pyo- . L'activité protéase est mise en évidence par l'éclaircissement de la gélose au niveau de la croissance bactérienne. La gélose permet également de visualiser la production de pyoverdine par la bactérie qui donne une coloration fluorescente jaune-vert à la gélose.

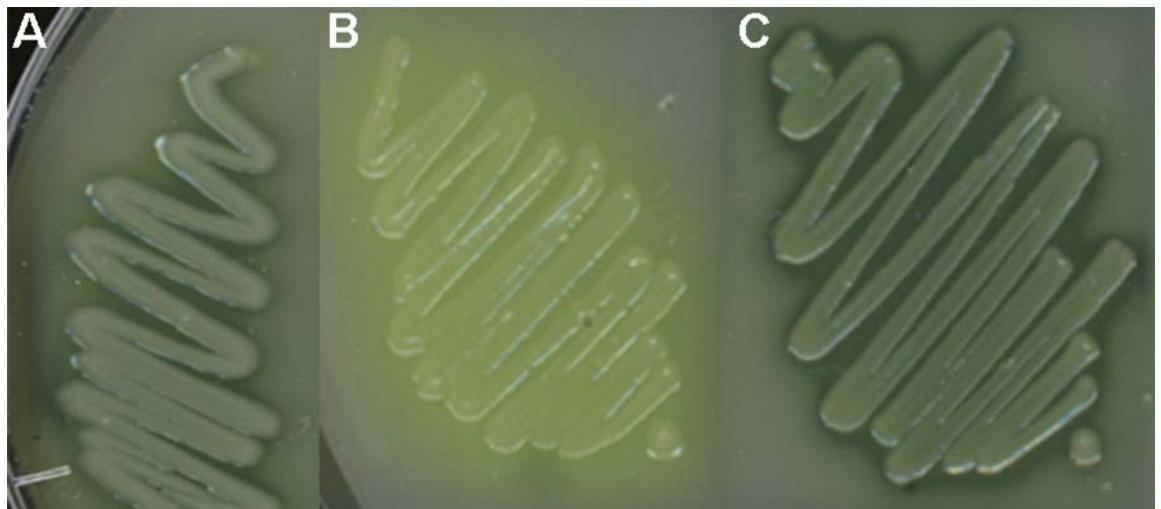


Figure 55: Activité protéase sur gélose au lait après 48h de croissance à 28°C. (A) MFN1032 ; (B) variant V1, V2 ou V5 ; (C) variant V3, V4, V6 ou V7. L'activité protéase est mise en évidence par l'éclaircissement de la gélose au niveau de la croissance bactérienne. La production de pyoverdine par la bactérie se traduit par une coloration jaune-vert fluorescente de la colonie.



Figure 56: Production de pyoverdine par la souche MFN1032 (A) et les variants V1, V2 ou V5 (B) sur gélose King B. 1- observation des boîtes de Pétri dans le visible ; 2- observation des boîtes de Pétri sous lampe UV (365 nm).

2002). Chez les bactéries pathogènes, ce mécanisme permet soit d'échapper au système immunitaire (avec la variation antigénique par exemple), soit d'améliorer la colonisation (lorsque la variation de phase affecte les structures impliquées dans l'adhésion par exemple).

Afin d'apprécier l'intérêt des variants dans la capacité d'adaptation et/ou le pouvoir pathogène de MFN1032, différentes propriétés ont été recherchées chez les variants puis comparées à celles de la souche « sauvage ».

3.1 Comparaison des activités extracellulaires

Au total, 10 variants ont été étudiés et comparés à la souche MFN1032 :

- 8 variants formant des colonies translucides sur King B, numérotés V1 à V8
- la souche Pyo⁻
- la souche Pyo⁺⁺ (une partie seulement des résultats a pu être obtenue étant donné que la souche a rapidement réverté)

3.1.1 Activités lécithinase et protéase

3.1.1.1 Activité protéase sur gélose au lait

Le variant Pyo⁻ présente une activité protéolytique diminuée par rapport à la souche sauvage (**Figure 54**).

Bien que les variants V1 à V8 présentent le même phénotype sur le milieu King B, les phénotypes diffèrent sur gélose au lait. Les variants V1, V2 et V5 sont protéase⁻ (**Figure 55**). La production de pyoverdine semble plus importante que celle retrouvée pour la souche sauvage. Cependant, sur le milieu King B, les variants apparaissent moins fluorescents que la souche sauvage (**Figure 56**). Les variants V3, V4, V6 et V7 sont clairement protéase⁺ (**Figure 55**).

Le variant V8 présente quant à lui des caractères très variables, suggérant que la souche est instable.

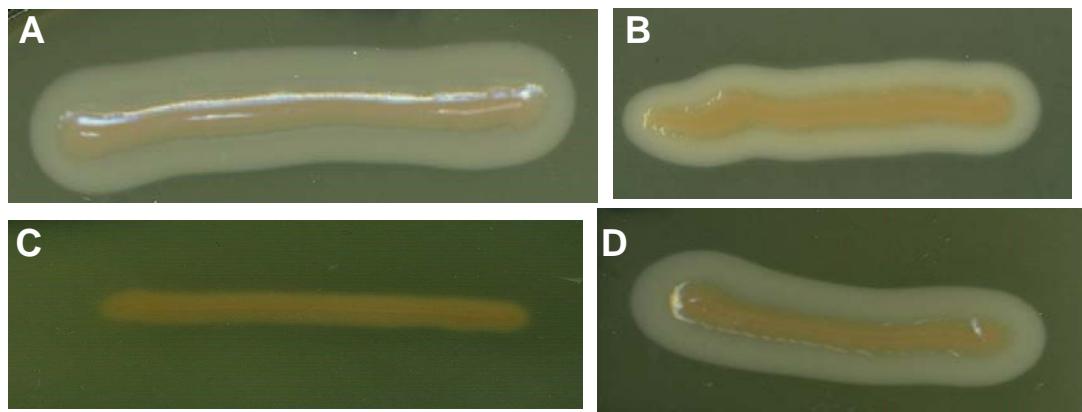


Figure 57: Activité lécithinase sur gélose à l'œuf des variants (A) MFN1032 , (B) Pyo-, (C) V1, V2 et V5 et (D) V3, V4, V6 et V7 après 48h d'incubation à 28°C. La gélose est ensemencée par strie centrale. L'activité lécithinase se traduit par l'apparition d'un précipité opaque autour de la strie de croissance.

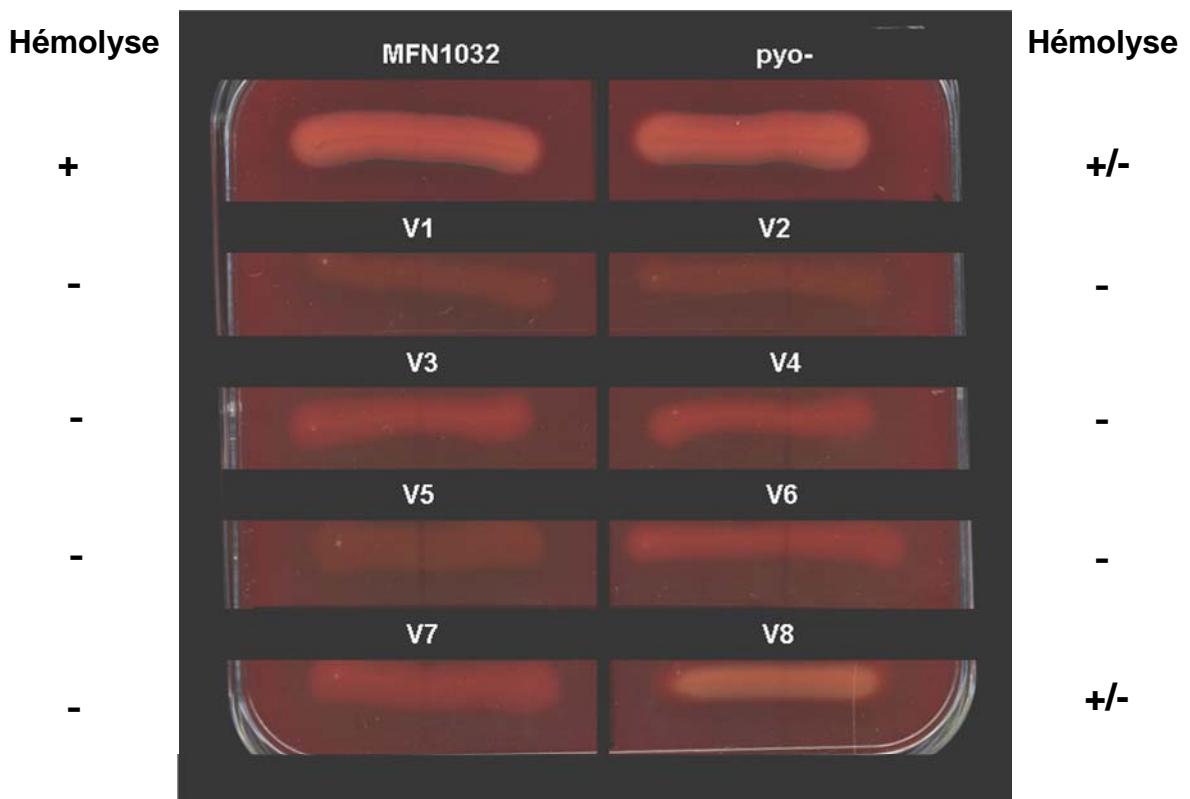


Figure 58: Activité hémolytique globale de la souche MFN1032 et de ses variants après 48h d'incubation à 28°C sur gélose au sang. L'activité hémolytique se traduit par un éclaircissement de la gélose autour de la croissance bactérienne. +: hémolyse; -: absence d'hémolyse; +/-: hémolyse partielle.

3.1.1.2 Activité lécithinase sur gélose à l'œuf

Lorsque l'on recherche l'activité lécithinase, on retrouve les mêmes résultats que ceux obtenus pour la production de protéase (**Figure 57**):

- la souche Pyo- présente une activité réduite par rapport à la souche sauvage
- les variants V1, V2 et V5 sont lécithinase ⁻
- les variants V3, V4, V6 et V7 sont lécithinase ⁺

Parmi les 8 variants qui présentaient le même phénotype sur milieu King B, on retrouve donc deux types de variants (**Tableau 22**). Par commodité, on nommera par la suite V1, V2 et V5 les variants du groupe 1 et V3, V4, V6 et V7 les variants du groupe 2.

Tableau 22: Regroupement des variants formant des colonies translucides sur King B en fonction des activités extracellulaires.

	Groupe 1	Groupe 2
Variants présentant un phénotype translucide sur milieu King B	V1, V2 et V5	V3, V4, V6 et V7
Activités extracellulaires (protéase et lécithinase)	-	+

L'activité lécithinase du variant V8 est variable, comme cela avait été observé pour l'activité protéolytique.

3.1.2 Activité hémolytique

3.1.2.1 Activité globale sur gélose au sang

L'activité hémolytique globale des souches a été appréciée après 48h de croissance sur gélose au sang à 28°C (**Figure 58**).

Tableau 23: Comparaison de l'activité hémolytique sécrétée dans le surnageant de culture de la souche MFN1032 et de ses variants Pyo- et Pyo++. Les cultures sont réalisées en milieu LB et incubées à 8, 17 ou 28°C. L'activité est déterminée sur les surnageants de culture âgées de 15 G. L'activité est exprimée en % de lyse après 2h d'incubation à 37°C des surnageants avec les hématies de mouton (n≥3).

Température de croissance (en °C)	8	17	28
Souche	% de lyse		
MFN1032	98 ± 1	83 ± 17	26 ± 3
Pyo-	62 ± 1	49 ± 16	11 ± 1
Pyo++	93 ± 11	100 ± 2	55 ± 4

Tableau 24: Activité hémolytique sécrétée des variants V1 à V8 cultivés à 17°C. Les cultures sont réalisées en milieu LB et l'activité est déterminée sur les surnageants de culture âgées de 15 G après 2h d'incubation à 37°C avec les hématies de mouton.

Variants	(groupe)	% de Lyse
MFN1032		83 ± 17
V1	(1)	11
V2	(1)	10
V3	(2)	10
V4	(2)	10
V5	(1)	9
V6	(2)	15
V7	(2)	13
V8		12

La souche Pyo⁻ présente une activité hémolytique réduite par rapport à la souche sauvage MFN1032.

Aucun des variants V1 à V7 n'est hémolytique et le variant V8 présente une activité hémolytique partielle et variable.

3.1.2.2 Influence de la température de croissance sur l'activité hémolytique sécrétée des souches Pyo- et Pyo++

Le dosage de l'activité hémolytique sécrétée a été réalisé sur les surnageants de culture des souches Pyo⁻ et Pyo⁺⁺, cultivées à des températures de croissance comprises entre 8 et 28°C. Le pouvoir hémolytique des deux souches a été comparé à celui de la souche MFN1032 obtenu pour les mêmes températures de croissance.

La souche Pyo⁻ est deux fois moins hémolytique que la souche MFN1032 à 17°C et à 28°C (**Tableau 23**). L'activité est réduite de 40% à 8°C.

La souche Pyo⁺⁺ présente une cytotoxicité au moins équivalente à celle du sauvage à 8°C et 17°C, et deux fois supérieure à celle-ci à 28°C (**Tableau 23**).

3.1.2.3 Influence de la température de croissance sur l'activité hémolytique sécrétée des variants V1 à V8

Les variants V1 à V8 n'ont aucune activité hémolytique sécrétée à 28°C. A 17°C, l'hémolyse est faible (**Tableau 24**). Contrairement aux activités protéase et lécithinase, on n'observe pas de différences d'activité entre les deux groupes de variants 1 et 2. Un facteur essentiel à l'hémolyse n'est produit chez aucun des variants. L'activité résiduelle est donc due à un facteur dont la production n'est pas concernée par des changements de phase.

Il semble qu'il existe donc des variants dont la production de l'activité hémolytique est quasi nulle (V1 à V8) ou réduite (Pyo⁻), et un variant pour laquelle l'activité est plus importante (Pyo⁺⁺). Etant donné que la surproduction de telles activités représente un coût énergétique élevé pour la cellule, il semble logique que

Tableau 25: Production de biosurfactant par la souche MFN1032 et les variants phénotypiques.

		viscosinamide	Viscosinamide'	α	Molécule inconnue
Massé moléculaire (Da)		1125,8	1125,8	1111,8	942,7
Tr (min)		47,1	45,4	43,7	33,5
MFN1032	28°C	+	+	+	-
	17°C	+	+	+	-
Pyo-	28°C	+	+	+	+
	17°C	+	-	-	-
V1	28°C	-	-	-	+
(Groupe 1)	17°C	-	-	-	+
V6	28°C	nd	nd	nd	nd
(Groupe 2)	17°C	-	-	-	+
V8	28°C	nd	nd	nd	nd
	17°C	-	-	-	+

La production de biosurfactant a été recherchée par analyse HPLC-MS des surnageants de cultures obtenus à 28°C ou 17°C, en milieu LB après 15 G. nd: non déterminé.

le variant Pyo^{++} soit instable, et émerge uniquement dans des conditions particulières.

L'existence de telles sous-populations est retrouvée chez les *P. fluorescens* issues de la rhizosphère (van den Broek *et al.*, 2005a). Ces bactéries présentent des variants dont l'expression des gènes soumis au changement de phase est soit atténuée ou éteinte, soit accrue pour certains facteurs (notamment ceux impliqués dans la capacité de colonisation des racines).

3.1.3 Production de biosurfactants

L'analyse des surnageants par HPLC-MS a été réalisée sur les surnageants de culture des variants Pyo^- , V1 (qui représente les variants du groupe 1), V6 (qui représente les variants du groupe 2) et V8.

3.1.3.1 *Production de biosurfactants par la souche Pyo^-*

L'analyse des surnageants par HPLC-MS montre qu'à 28°C et en milieu LB, la souche Pyo^- produit le composé α , la viscosinamide et la viscosinamide '. A 17°C, seule la viscosinamide est retrouvée (**Tableau 25**).

Le spectre révèle la présence d'une molécule de faible masse moléculaire (942 Da, $\text{Tr}=33,5$ min). Cette molécule n'est retrouvée qu'à l'état de traces dans le surnageant de MFN1032, quelle que soit la température de croissance 28°C ou 17°C. Pour le moment, les banques de données de spectrométrie de masse ne permettent pas d'identifier cette molécule.

3.1.3.2 *Production de biosurfactants par les variants V1, V6 et V8*

Ni le composé α , ni les viscosinamides ne sont retrouvés dans les surnageants de culture des variants V1, V6 et V8 à 17°C. Le spectre révèle uniquement la présence de la molécule de faible masse moléculaire (**Tableau 25**).

L'absence d'activité hémolytique résulte probablement de l'absence de production de biosurfactants pour l'ensemble des variants V1 à V8.

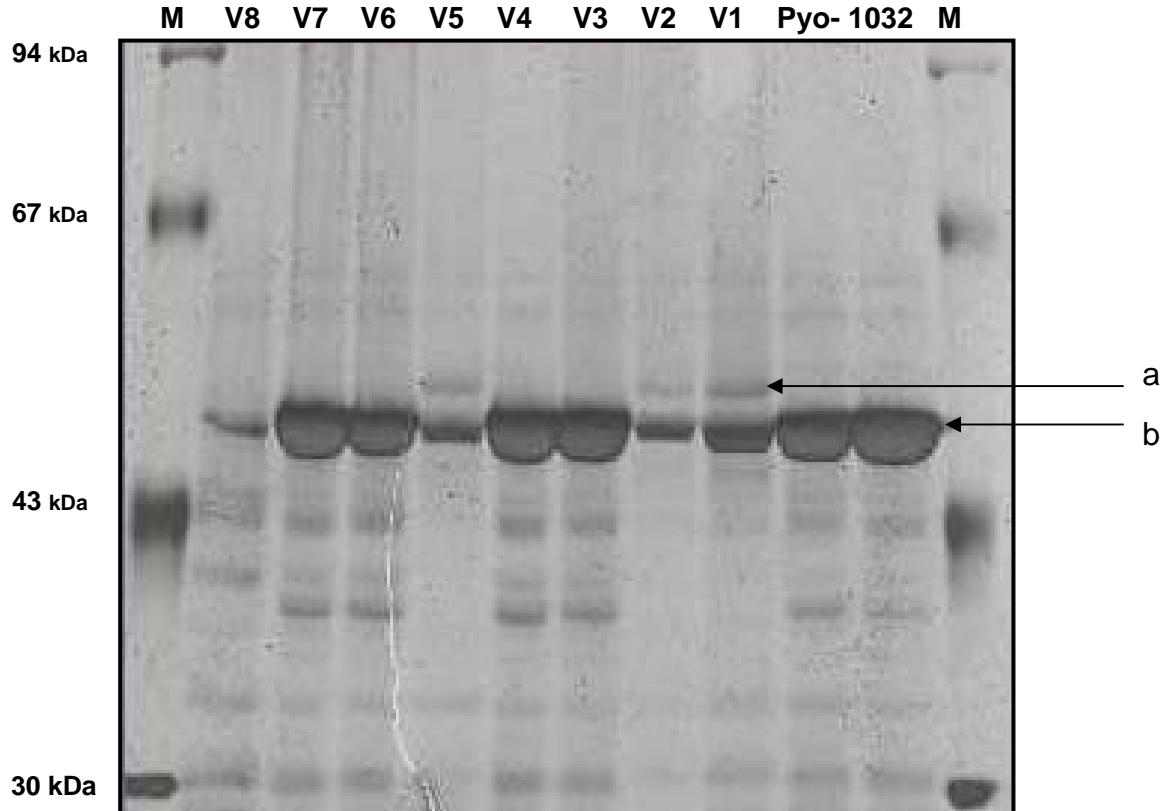


Figure 59: Analyse électrophorétique SDS-PAGE des surnageants de cultures de la souche MFN1032 et de ses variants cultivés à 17°C. Les bactéries sont cultivées en milieu LB et à 17°C sous agitation. Les surnageants de cultures âgées de 15 G sont concentrés sur filtre Amicon ultra-15. Les protéines sont dosées par un dosage de Bradford. 40 µg de protéines sont déposées sur un gel de polyacrylamide 10%. Après migration, les protéines sont révélées par une coloration au nitrate d'argent. **M** : Marqueur de poids moléculaire. **a** : protéine de 55 kDa ; **b** : flagelline.

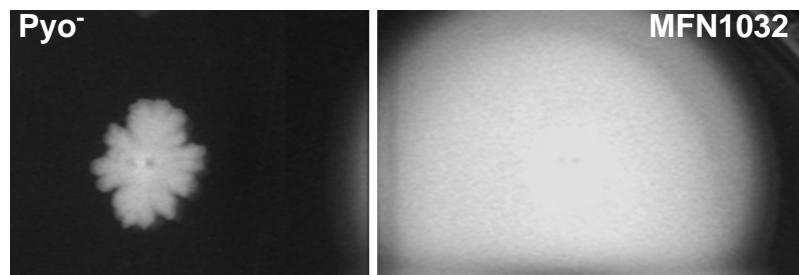


Figure 60: Mobilité de type swimming de la souche Pyo- et de la souche MFN1032 cultivée à 28°C. La mobilité est réalisée en milieu LB gélosé à 0,3%. Les souches sont incubées 40h à 28°C (n=3).

3.2 Profil SDS-PAGE des différents variants

L'analyse électrophorétique des surnageants de culture des variants a été réalisée. A 17°C, Pyo⁻ et les variants du groupe 2 présentent le même profil électrophorétique que la souche MFN1032 (**Figure 59**).

La majorité des protéines extracellulaires sécrétées par MFN1032 sont absentes des surnageants des variants du groupe 1, la quantité de flagelline (**Figure 59**, flèche b) est largement réduite mais une protéine d'environ 55 kDa est retrouvée uniquement chez ces variants (**Figure 59**, flèche a).

Le variant V8 présente un profil intermédiaire, avec une quantité de flagelline très faible.

3.3 Comparaison de la mobilité

Afin de déterminer si la diminution de la quantité de flagelline retrouvée dans les surnageants de culture a une incidence sur la mobilité des bactéries, nous avons comparé les mobilités de type swimming et swarming des variants par rapport à la souche sauvage.

3.3.1 Swimming

Le variant Pyo- ne présente pas de mobilité de type swimming (**Figure 60**). La souche forme des colonies en « chou-fleur » qui se développent peu.

Le variant Pyo⁺⁺ présente une mobilité significativement plus importante que la souche sauvage (**Figure 61**) et forme des colonies en chou-fleur dès 16h d'incubation selon les boîtes observées. Après 40h de croissance, un tiers des boîtes présentent un envahissement complet par la souche (swarming). Ceci suggère que la souche produit probablement plus de biosurfactant que la souche sauvage.

Les variants du groupe 1, pour lesquels on retrouvait peu de flagelline dans les surnageants de culture, sont légèrement moins mobiles que la souche MFN1032 (**Figure 61**). Toutefois, cette différence est également retrouvée pour un des variants qui présentait un profil SDS-PAGE identique à la souche sauvage (V3). Les variants V4, V6 et V7 « nagent à la même vitesse » que le sauvage.

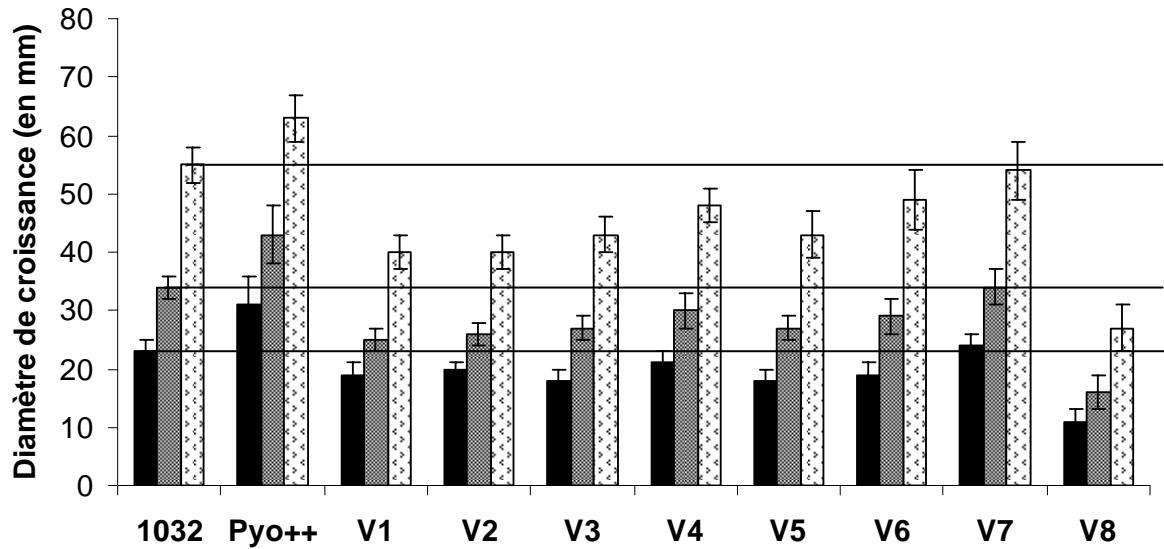


Figure 61: Mobilité de type de swimming de la souche MFN1032 et de ses variants à 28°C. La mobilité est réalisée en milieu gélosé à 0,3%, et les diamètres des halos de croissance sont mesurés à 16h (■), 24h (▨) et 40h (▨) de croissance. (n≥3).

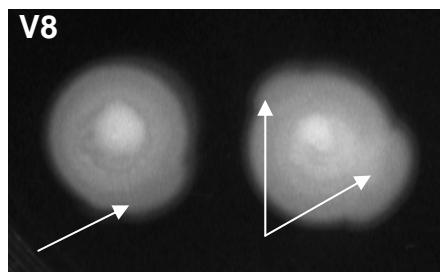


Figure 62: Colonies du variant V8 en condition de type swimming (LBG 0,3%) après 40h de culture à 28°C. Les flèches indiquent les halos émergents de la zone de croissance principale.

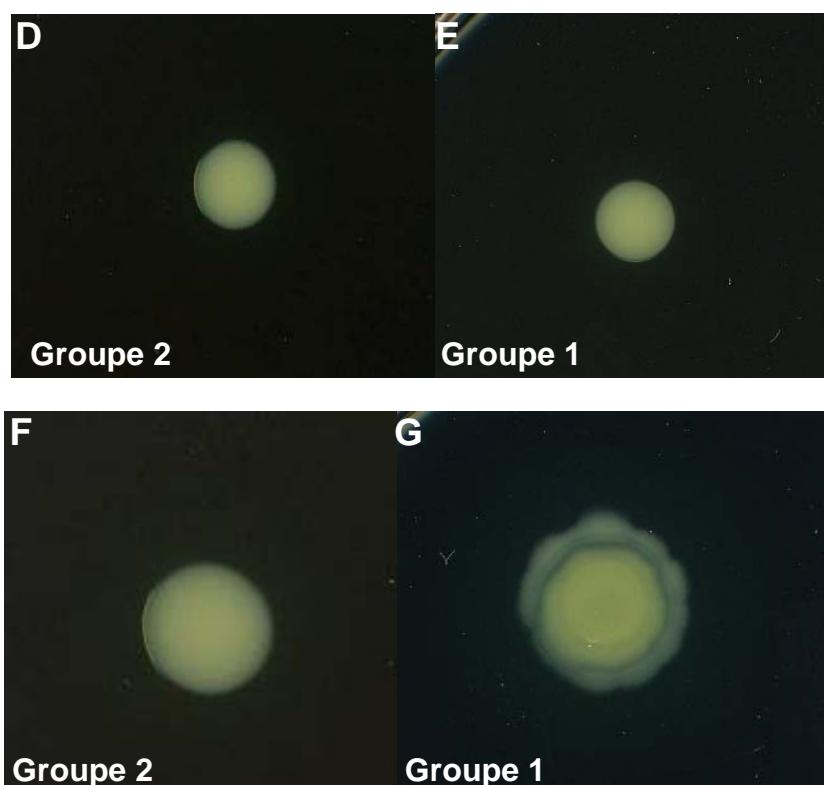
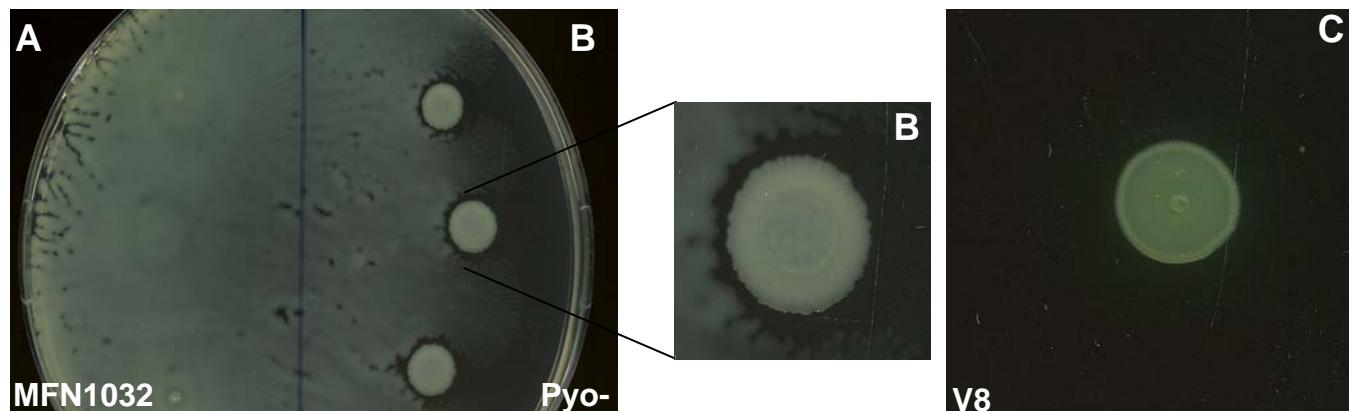


Figure 63: Mobilité de type swarming des différents variants. Le swarming a été réalisé sur milieu LBG à 0,6% en ensemencant 5 μ L de suspension bactérienne à la surface de la gélose. Les boîtes sont incubées pendant 40h à 28°C, et l'observation est effectuée après 16h (A,B,C), 24h (D,E) et 40h (F,G) de croissance.

Seul le variant V8 présente une mobilité fortement réduite. Sur la gélose, on observe l'émergence de halos à partir de la zone de croissance principale (**Figure 62**). Ces halos suggèrent l'existence de sous-populations, qui se déplacent à des vitesses différentes dans la colonie. Ceci confirme l'instabilité de ce variant.

La souche Pyo⁺⁺ semble correspondre à la majorité des variants de phase II de *P. fluorescens* de la rhizosphère décrits dans la littérature. Avec une mobilité accrue et une activité hémolytique plus importante que la souche sauvage, ce variant possède de nombreux atouts pour optimiser la colonisation de l'hôte.

La diminution de flagelline, principalement constatée pour les variants du groupe 1, ne semble pas avoir de répercussion sur la mobilité de type swimming des souches.

Le variant Pyo⁻, qui présentait un profil SDS-PAGE identique à MFN1032, a perdu la capacité de la nage. Les colonies en « chou-fleur » sont caractéristiques d'une mobilité de type swarming. Cette mobilité est induite par des facteurs inhibant la rotation des flagelles (telle que l'augmentation de la viscosité du milieu) et par la présence de signaux extracellulaires. Il est possible que la rotation des flagelles soit déficiente chez la souche Pyo⁻.

3.3.2 Swarming

Sur un milieu LB gélosé à 0,6%, la souche MFN1032 envahit la boîte de Pétri dès 16h de culture à 28°C (**Figure 63, A**). La souche Pyo⁻ présente des halos de croissance concentriques, mais apparaît peu mobile par rapport à la souche sauvage (**Figure 63, B**). Les variants V1 à V7 forment une colonie sur la boîte de Pétri, mais n'essaient pas après 16 ou 24h de culture à 28°C (**Figure 63, D et E**). Le variant V8 présente un phénotype particulier dès 16h de culture: la colonie est verte (production importante du sidérophore), et on observe des halos concentriques réguliers (**Figure 63, C**).

Après 40h de culture, les variants du groupe 2 ne sont toujours pas mobiles (**Figure 63, F**). Le phénotype des variants du groupe 1 se modifie et présente un aspect similaire à celui du variant V8 (**Figure 63, G**), puisqu'on observe une

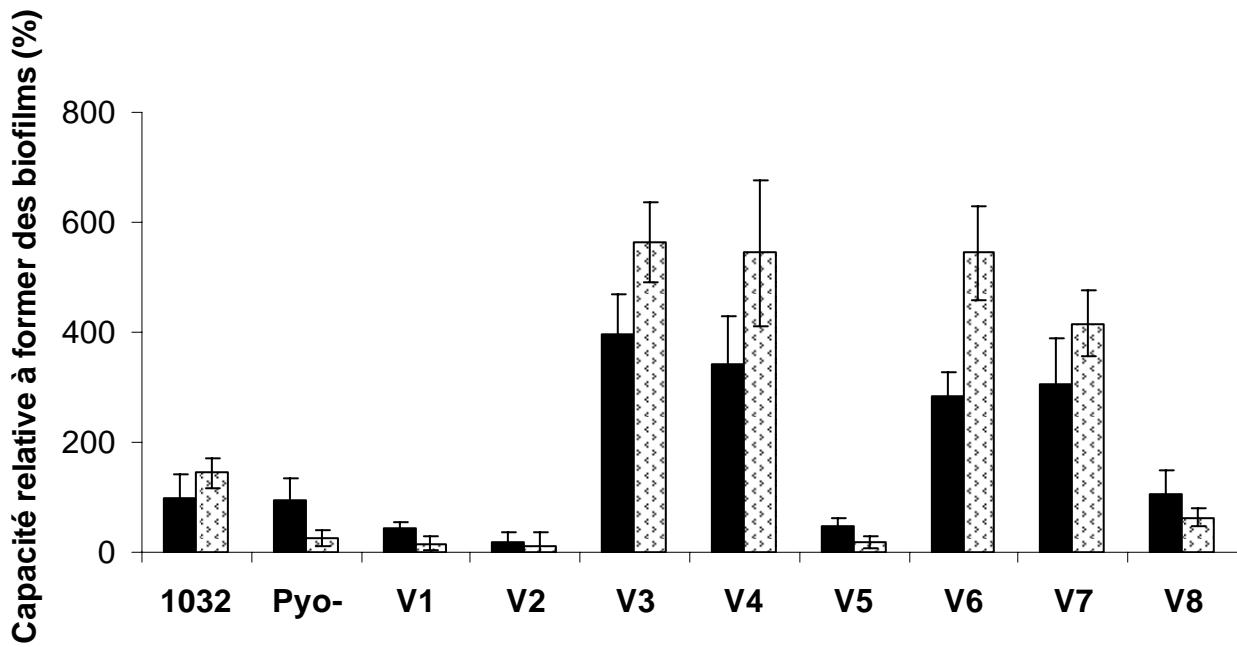


Figure 64: Comparaison de la capacité à former des biofilms de la souche MFN1032 et de ses variants. La formation des biofilms a été évaluée après 24h de croissance en microplaqué à 28°C (■) ou 37°C (▨), en milieu LB non renouvelé. Les bactéries adhérentes sont colorées au cristal violet puis lysées au SDS et l'absorbance à 595 nm est mesurée. La capacité à former des biofilms de MFN1032 à 28°C est utilisée comme référence pour déterminer la capacité relative des différents variants incubés à 28°C ou 37°C.

production importante de pyoverdine. Les conditions de cultures permettant d'induire le swarming semblent provoquer la réversion des variants du groupe 1.

La perte de la capacité à essaimer est probablement due à l'absence de sécrétion de biosurfactants par l'ensemble des variants.

3.4 Capacité à former des biofilms par les variants

L'adhésion des bactéries est une étape clef dans la virulence bactérienne. Elle est aussi la première étape de formation des biofilms, et fait intervenir différentes structures exposées à la surface bactérienne, dont les flagelles. La capacité à former des biofilms a été recherchée pour l'ensemble des variants et comparée à celle de la souche MFN1032 selon une technique en microplaqué inspirée de O'Toole *et al.*

La souche MFN1032 est capable de réaliser des biofilms lorsqu'elle est cultivée à 28 ou 37°C (**Figure 64**).

La souche Pyo⁻ et le variant V8 se comportent comme MFN1032 lorsque la microplaqué est incubée à 28°C (93% et 106% respectivement par rapport à MFN1032). Cultivées à 37°C, les deux souches perdent une grande partie de leur capacité à former des biofilms (25% de biofilms pour Pyo⁻ et 62% pour V8 par rapport à MFN1032 à 28°C).

Les variants du groupe 1 forment peu ou pas de biofilms lorsqu'ils sont respectivement incubés à 28°C et 37°C (en moyenne 36% et 15% respectivement).

Les variants du groupe 2 forment des biofilms plus importants que la souche MFN1032, quelle que soit la température d'incubation. Leur capacité à former des biofilms est significativement plus importante à 37°C (517% en moyenne) qu'à 28°C (360% en moyenne).

Les variants incapables de réaliser l'essaimage sont les variants qui présentent la capacité d'adhésion la plus grande. Il pourrait s'agir d'une régulation commune, comme chez *P. aeruginosa*, où la capacité d'adhésion et le swarming sont inversement régulés (Caiazza *et al.*, 2007). Avec l'émergence de ces variants « hyper-adhérents », la souche MFN1032 acquiert une capacité de colonisation plus

MFN1032



Pyo-

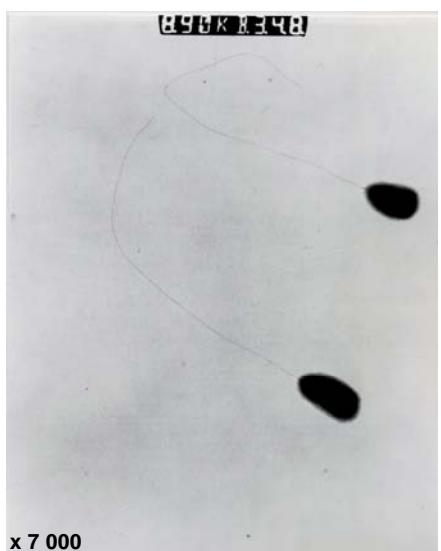


Figure 65: Visualisation des flagelles de MFN1032 et Pyo- au MET. Les bactéries ont été cultivées en milieu LB à 28°C jusqu'en phase stationnaire de croissance. Les cellules sont ensuite colorées par une coloration négative à l'acide phosphotungstique. Le grossissement est indiqué sur chaque photo.

Groupe 1



Groupe 2

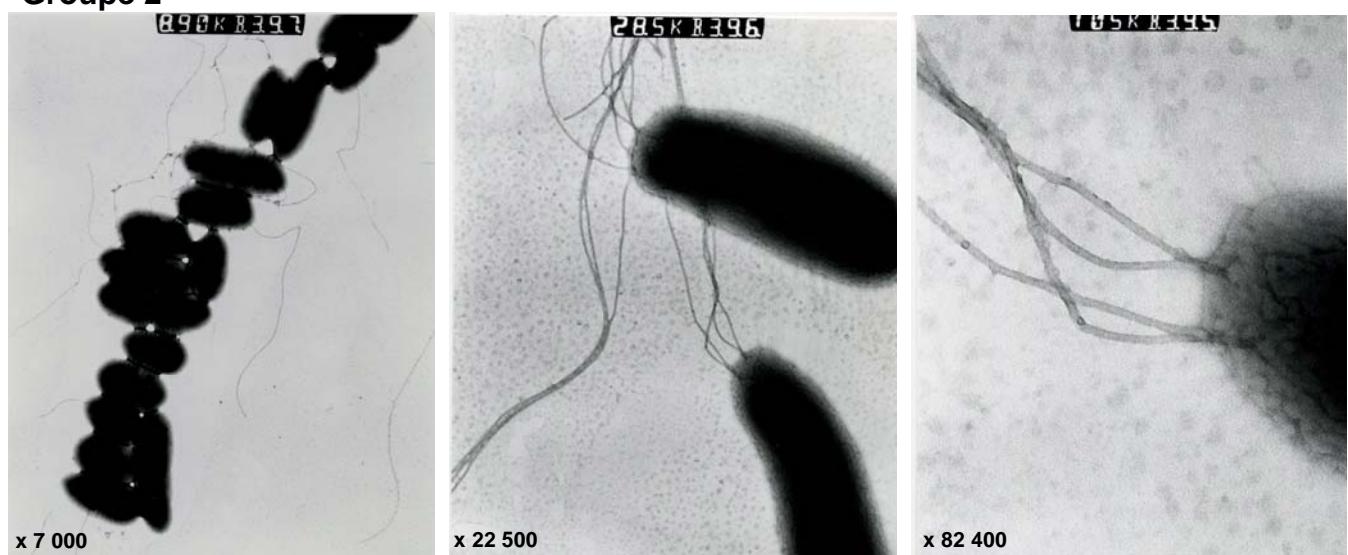


Figure 65 (suite): Visualisation des flagelles des variants du groupe 1 (V1) et des variants du groupe 2 (V3) au MET. Le grossissement est indiqué sur chaque photo.

importante. Cette variation de phénotype augmente par conséquent son potentiel de virulence.

3.5 Visualisation des flagelles bactériens

L'observation des flagelles bactériens en microscopie électronique à transmission a permis de constater que les variants qui forment le plus de biofilms sont ceux qui possèdent le plus de flagelles polaires (**Figure 65**).

Le variant Pyo⁻ présente un seul flagelle polaire comme la souche sauvage MFN1032. Les cellules peuvent former des agrégats, ce qui n'était pas le cas de MFN1032 puisqu'on observait une répartition homogène sur les grilles.

Les variants du groupe 1 présentent également un seul flagelle polaire. Les flagelles sont tous détachés de la cellule bactérienne, suggérant qu'ils sont très fragiles (**Figure 65**). Le nombre de cellules par grille est faible par rapport à la souche sauvage, et les cellules présentent une forme plus allongée, bien que la quantité de cellules initiales et que le traitement des échantillons aient été les mêmes pour toutes les souches.

Les variants du groupe 2 possèdent 1 à 4 flagelles polaires. Les cellules forment des amas cellulaires et sont plus nombreux sur les grilles (**Figure 65**).

Les propriétés de surface des différents variants et de MFN1032 semblent donc différentes. Les différences de capacité à former des biofilms résultent à la fois de l'augmentation du nombre de flagelles et des propriétés physico-chimiques des surfaces cellulaires, qui interviennent directement dans l'adhésion bactérienne (Hemery *et al.*, 2007).

4 Effets des produits des gènes *gacA* et *gacS* sur les variants

De nombreux travaux démontrent l'implication du système à deux composantes GacA/GacS dans les variations phénotypiques. Cela a notamment été démontré

chez des souches de *P. fluorescens* issues de la rhizosphère pour lesquelles la complémentation en *trans* du gène *gacA* et/ ou du gène *gacS* restaure le phénotype de la souche.

4.1 Complémentation des variants en *trans* par les gènes *gacA* ou *gacS*

La complémentation des variants a été réalisée par incorporation chez MFN1032 des plasmides pMP5565 et pMP6562 qui portent respectivement les gènes *gacA* et *gacS* de souches de *P. fluorescens*. Ces plasmides nous ont été donnés par le Pr. Lugtenberg de l’Institut de Biologie de Leiden.

L’effet de la complémentation sur le phénotype a été évalué par la restauration de l’activité hémolytique sur gélose au sang.

Les variants du groupe 1 montrent une restauration phénotypique avec les plasmides portant les gènes *gacA* (V1) ou *gacS* (V2 et V5) (**Figure 66**). Sur gélose à l’œuf et au lait, les variants complémentés retrouvent le phénotype sauvage (**Figure 66, B et C**). La variation de phénotype pour les variants du groupe 1 résulte d’une mutation dans l’un des gènes *gac*.

Le variant V8, proche des variants du groupe 1, est stabilisé par une complémentation par *gacS*.

L’introduction de ces plasmides chez les variants du groupe 2 et chez la souche Pyo⁻ n’a aucun effet sur le phénotype (**Figure 67**). Le changement de phénotype retrouvé chez ces variants n’implique pas directement une mutation dans les gènes *gacA* et/ou *gacS*.

4.2 Influence d’une surexpression de GacA ou de GacS sur la fréquence d’apparition des variants

L’objectif de ce travail était de déterminer si la régulation du système GacA/GacS pouvait influer sur la fréquence d’apparition des variants chez la souche MFN1032. Il est en effet établi qu’une « mutation » dans les gènes *gacA* ou *gacS* provoque des variations phénotypiques, mais l’effet de la surexpression des gènes *gacA* ou *gacS* sur l’apparition de variants n’a pas été recherché.

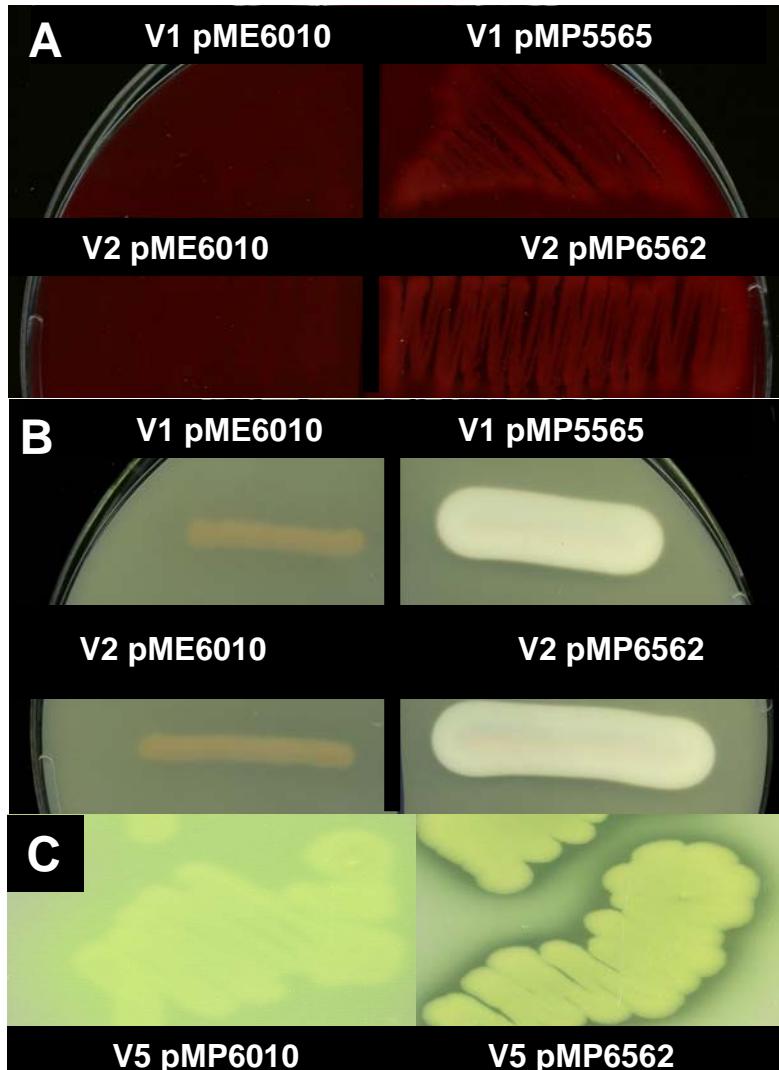


Figure 66: Complémentation en *trans* des variants du groupe 1 par les gènes *gacA* ou *gacS*, portés respectivement par les plasmides pMP5565 et pMP6562.

Un contrôle a été systématiquement réalisé par l'introduction du plasmide sans insert, le pME6010. Les variants complémentés sont ensemencés sur différentes géloses, incubées 48h à 28°C.

(A) Restauration de l'activité hémolytique (sur gélose au sang) et (B) de l'activité lécithinase (sur gélose à l'œuf) des variant V1 et V2 par les gènes *gacA* et *gacS*, respectivement.

(C) Restauration de l'activité protéase du variant V5 par le gène *gacS* (sur gélose au lait).

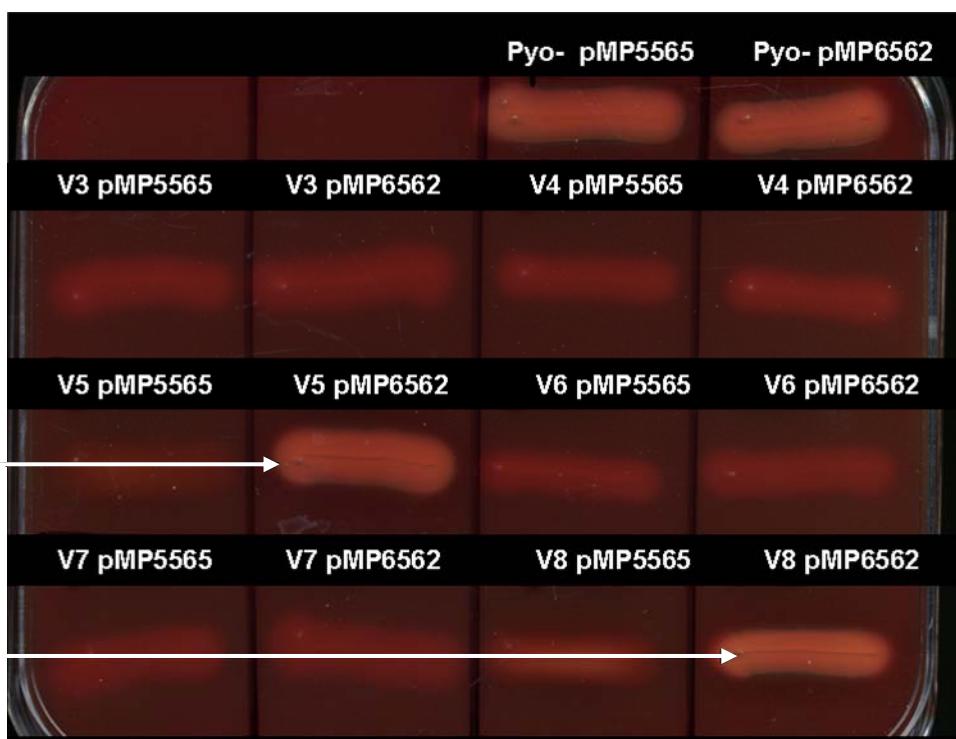


Figure 67: Effet de la complémentation en *trans* par les gènes *gacA* ou *gacS* sur l'activité hémolytique des variants de MFN1032.

Les gènes *gacA* et *gacS* sont portés par les plasmides pMP5565 et pMP6562, respectivement.

Les variants complémentés sont ensemencés sur gélose au sang et les boîtes sont incubées 48h à 28°C.

Les flèches indiquent la présence d'une restauration phénotypique.

Les plasmides pMP5565 et pMP6562, portant respectivement les gènes *gacA* et *gacS*, ont été introduits par électroporation chez la souche MFN1032.

Après 72h de culture à 28°C en milieu King B et sous agitation, la numération bactérienne révèle une fréquence d'apparition de variants de 1.10^{-5} par génération chez les souches surexprimant *gacA* ou *gacS*, soit 4 fois moins que la souche MFN1032 (**Tableau 26**).

Sur les 9 variants étudiés (V1 à V8 et Pyo⁻), seuls 4 ont pu être complémentés en *trans* par les gènes *gacA* ou *gacS*. La proportion des variants directement affectés dans les gènes *gac* est donc d'environ 45% (il s'agit bien entendu d'une estimation qui permet de comprendre le raisonnement).

Parmi les variants obtenus à partir de souche MFN1032 portant les plasmides pMP5565 ou pMP6562, seuls les variants qui ne peuvent être complémentés par *gac* sont, théoriquement, observables (soit 55% du nombre total de variants habituellement dénombrés pour la souche sauvage).

Le nombre de variants dénombrés est 4 fois inférieur (soit 25%) chez la souche MFN1032Gac⁺ par rapport à la souche sauvage. Si la surexpression des gènes *gac* n'avait aucun effet sur l'émergence des variants du groupe 2, nous aurions dû obtenir un nombre de variants environ deux fois supérieur à celui observé.

Les résultats obtenus suggèrent donc qu'une surexpression des gènes *gacA* ou *gacS* diminue l'apparition de variant phénotypique qui ne peuvent être complémentés en *trans* par le système Gac, autrement dit qui ne sont pas directement mutés au niveau des gènes *gac*.

Tableau 26: Fréquences d'apparition des variants phénotypiques de la souche MFN1032 complémentée en *trans* par les gènes *gacA* ou *gacS* portés par les plasmides respectifs pMP5565 et pMP6562. Les fréquences sont déterminées après 72h de culture en milieu liquide KB sous agitation à 28°C

Souche	MFN1032	MFN1032 <i>gacA</i>⁺ ou <i>gacS</i>⁺
Fréquence par génération	4.10^{-5}	1.10^{-5}

Tableau 27: Synthèse des caractères phénotypiques recherchés chez MFN1032 et chez les différents variants

Activités	pyoverdine ^a	Lécithinase ^b	Protéase ^b	AH	BS	Flag	Swimming LBG 0,3%	Swarming LBG 0,6%	Biofilm	Complémentation par gacA ou gacS
Souche/ Variants										
1032	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Groupe 1	+/-	-	-	-	-	+/-	R	-	-	+
Groupe 2	+	+	+	-	-	+	+	-	++	-
V8	+/-	+/-	variable	-	-	-	R	-	-	Partielle
Pyo ⁺⁺	++	+	nd	++	nd	+	++/ CF	++	nd	nd
Pyo ⁻	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	CF	-	+	-

AH: activité hémolytique

BS: biosurfactants

Flagelline: présence d'une quantité importante de flagelline dans le surnageant

R: réduit

CF: colonie de type « chou-fleur »

nd: non déterminé

a: la production de pyoverdine est visualisée sur le milieu KB
b: les activités lécithinase et protéase sont respectivement recherchées sur gélose à l'œuf et au lait

CONCLUSION PARTIE III

La souche MFN1032 présente spontanément des variants phénotypiques, en particulier lorsque la bactérie est cultivée sur le milieu King B ou sur gélose à l'œuf. Afin de déterminer si l'émergence de tels variants représente un avantage pour la colonisation de l'hôte par cette souche hospitalière, une analyse phénotypique de quatre classes de variants a été entreprise. Le **tableau 27** reprend l'ensemble des caractères phénotypiques recherchés des différents variants et de MFN1032.

Les deux variants affectés dans la production de pyoverdine, Pyo⁻ et Pyo⁺⁺, sont apparus spontanément au cours d'un repiquage de MFN1032.

Le variant Pyo⁻ présente des déficiences au niveau de la production des activités extracellulaires (protéase et lécithinase) et des biosurfactants. L'analyse des surnageants de culture par HPLC-MS permet de déterminer la quantité de biosurfactants produite par la souche. Des investigations supplémentaires sont encore nécessaires pour déterminer avec certitude le taux de réduction de la production des CLP par Pyo⁻ par rapport à MFN1032. Bien que l'ensemble des CLP caractérisés chez MFN1032 soit retrouvé dans le surnageant de la souche Pyo⁻, les résultats préliminaires suggèrent que la quantité de CLP est plus faible.

La perte d'activité hémolytique du variant Pyo⁻, d'environ 50% par rapport à la souche sauvage MFN1032, résulte très certainement de la baisse globale des différents facteurs plutôt que de la perte d'un seul facteur.

Pyo⁻ ne présente aucune mobilité relative aux flagelles (swimming et swarming), alors que la production des flagelles ne semble pas être perturbée chez cette souche, comme on a pu l'observer en microscopie. Une perte de motricité des flagelles pourrait expliquer ce phénotype. Il est établi que les flagelles interviennent dans les premières étapes de formation des biofilms chez *Pseudomonas* (O'Toole et Kolter, 1998b). Le variant Pyo⁻ est capable de former des biofilms de façon équivalente à MFN1032, mais uniquement lorsque la souche est incubée à 28°C. A 37°C, Pyo⁻ ne forme plus de biofilms. Il a été montré que la production de pyoverdine pouvait intervenir dans la formation des biofilms chez *P. aeruginosa* (Banin et al., 2005). Il paraît peu probable ici que l'absence de biofilms soit due à l'absence de

production de pyoverdine, car la souche sauvage MFN1032 ne produit pas le pigment à cette température de croissance dans les conditions testées.

Les pyoverdines représentent le premier système d'acquisition du fer chez les *Pseudomonas* fluorescents. Leur production est indispensable à la croissance bactérienne dans les milieux carencés en fer. La pyoverdine intervenant également dans la virulence des bactéries, l'absence de production de pyoverdine par le variant Pyo⁻ semble ne pas représenter un avantage pour la colonisation de la souche MFN1032. Des comportements similaires sont pourtant observés chez des souches de *P. aeruginosa* isolées de patients atteints de mucoviscidose. Plus d'un quart des souches isolées des poumons de ces patients sont incapables de synthétiser la pyoverdine (Visca *et al.*, 2007). Les souches cliniques, notamment celles isolées de patients atteints de la mucoviscidose, présentent un phénotype hypervariable. Ce phénotype, souvent occasionné par une mutation dans les gènes codant les systèmes de réparation de l'ADN, comme *mutS*, peut avoir pour conséquence une augmentation des mutations au niveau des gènes de synthèse de la pyoverdine, *pvd*, mais aussi d'autres gènes. Il est possible que ce soit le cas pour la souche Pyo⁻, dont le phénotype semble résulter soit d'une mutation pléiotropique, soit de plusieurs mutations. La complémentation en *trans* par les gènes *gacA* et/ou *gacS* ne restaure pas le phénotype initial de la souche. Comme cela a déjà été décrit chez les *P. fluorescens*, il est possible que ce variant résulte d'une perturbation du système *mutS* ayant engendré des mutations dans différents gènes, autres que *gac*.

Du fait de la réversion de la souche, le phénotype du variant Pyo⁺⁺ n'a pu être que partiellement étudié. Les conditions d'apparition de la souche n'ont pas pu être recréées, et le variant n'a par la suite jamais été retrouvé. D'après les phénotypes étudiés, nous avons pu constater que la souche présentait un potentiel de virulence plus important que la souche sauvage. L'activité hémolytique est plus importante, et la souche est plus mobile que MFN1032. Il aurait été intéressant d'observer la souche Pyo⁺⁺ au microscope électronique afin de vérifier si cette mobilité était due à la présence de flagelles plus nombreux et/ou plus longs. L'envahissement de type swarming observé dès 16h de croissance suggère que la souche produit une quantité de biosurfactants plus importante. Les propriétés phénotypiques observées ressemblent à celles décrites pour des variants de *P. fluorescens* de la rhizosphère. Le variant F de la souche F113 présente une surproduction de pyoverdine et une

mobilité accrue due à la présence de flagelles plus longs (Sanchez-Contreras *et al.*, 2002). Une différence est retrouvée au niveau de la production des activités extracellulaires, bien qu'il soit difficile de conclure étant donné que seule l'activité lécithinase a été recherchée pour le variant Pyo⁺⁺. Cette souche présenterait donc un atout important pour la colonisation de MFN1032.

Les variants formant des colonies translucides ont été isolés lors de l'étude des fréquences d'apparition des variants. L'analyse phénotypique a révélé que ces variants se divisaient en deux classes bien distinctes, alors qu'ils présentaient le même phénotype au premier abord.

Les variants du groupe 1 sont totalement dépourvus d'activités extracellulaires, ne produisent pas de biosurfactants et sont non hémolytiques. Une complémentation en *trans* de ces variants par les gènes *gacA* ou *gacS* restaure le phénotype sauvage de la souche. L'accumulation de mutations spontanées dans les gènes *gac* provoque des variations phénotypiques chez les *Pseudomonas* sp.. Van den Broek *et al.* ont montré que le système de réparation de l'ADN, MutS, était directement impliqué, ainsi que le facteur sigma RpoS. RpoS régulerait négativement le gène *mutS*. En phase stationnaire de croissance ou en conditions de stress, la production de RpoS augmente, ce qui réprime le gène *mutS* et augmente ainsi le taux de mutation de la bactérie, notamment au niveau des gènes *gac*. Muté, le système Gac n'exerce plus son activité de régulateur transcriptionnel au niveau de *rpoS* et le gène *mutS* n'est plus réprimé, ce qui diminue considérablement le nombre de mutations et équilibre le système.

Le système à deux composantes Gac régule un nombre important de processus physiologiques chez les *Pseudomonas*. Chez *P. aeruginosa*, GacA intervient dans la formation des biofilms par un mécanisme indépendant des flagelles (Parkins *et al.*, 2001). Ceci pourrait expliquer l'absence de formation de biofilms par les variants du groupe 1, qui en plus, présentent des flagelles plus fragiles, ce qui peut modifier l'adhésion de la souche. Chez les bactéries PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), un système Gac fonctionnel est nécessaire à la colonisation et la protection effective des plantes. Cependant, plusieurs auteurs décrivent que ces variants permettent d'augmenter la compétitivité globale de la population, notamment lors de l'étape de colonisation ou pour l'établissement dans une nouvelle niche écologique. En effet, les variants Gac présentent des cinétiques

de croissance avantageuses par rapport à la souche sauvage, avec une diminution du temps de génération et de la phase exponentielle de croissance, ce qui permettrait de relancer la croissance plus facilement dans un nouvel environnement.

L'émergence de variants mutés dans les gènes *gacA* et/ou *gacS* chez la souche MFN1032 a ainsi pu lui permettre d'optimiser la colonisation de nouvelles niches écologiques.

Les variants du groupe 2, qui ne peuvent être complémentés en *trans* par les gènes *gacA* ou *gacS*, sont également dépourvus de toute activité hémolytique. La production des autres activités extracellulaires n'est pas perturbée, mais ces variants ne sécrètent pas de biosurfactants, ce qui explique certainement le manque d'activité hémolytique et l'absence de mobilité de type swarming. Ce sont des bactéries hyperflagellées, qui ont une capacité à former des biofilms jusqu'à 5 fois supérieurs à la souche sauvage, plus particulièrement lorsque les bactéries sont cultivées à 37°C. Cette capacité peut représenter un avantage considérable dans le processus infectieux de la souche MFN1032. Cette souche a, en effet, initialement été isolée de poumons d'un patient atteint d'une affection pulmonaire. Chez *P. aeruginosa*, des variants hyperadhérents, présentant une cytotoxicité accrue, sont régulièrement retrouvés au niveau des patients atteints de mucoviscidose (von Gotz *et al.*, 2004). Ces Small Colony Variants (SCVs) ont un rôle central dans la pathogénie de *P. aeruginosa* au niveau des poumons, car le mode de développement en biofilms favorise la persistance de la bactérie dans l'organisme.

Bien que ce phénotype ne soit pas complémenté par l'introduction en *trans* des gènes *gac*, il semblerait que le système soit impliqué dans l'émergence de ces variants. En effet, la surexpression de *gacA* ou *gacS* de la souche sauvage MFN1032 diminue considérablement le taux de variation. Davies *et al.* (Davies *et al.*, 2007) ont récemment mis en évidence qu'une mutation dans le gène *gacS* chez des souches de *P. aeruginosa* favorise l'émergence de SCVs stables en conditions de croissance en biofilms. La réversion de ces variants ne peut être observée que lorsque le gène *gacS* est intact, bien que la complémentation en *trans* par le gène *gacS* ne restaure pas le phénotype. La fréquence d'apparition de ces variants augmente en fonction des conditions environnementales, notamment en présence d'antibiotiques.

La variation phénotypique observée chez MFN1032 peut donc représenter un avantage considérable pour la colonisation de cette bactérie dans de nouveaux environnements, tels que le milieu hospitalier. Ce mécanisme, qui résulte théoriquement de mutations « aléatoires », semble correspondre à un réseau de régulation complexe.

Conclusions générales et perspectives

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

L'espèce *Pseudomonas fluorescens* est habituellement considérée comme non pathogène. Les techniques d'identification de routine utilisées dans le milieu hospitalier, et le fait de considérer *P. aeruginosa* comme seule espèce pathogène du genre, ont sans doute masqué l'émergence de cette bactérie dans les infections nosocomiales. Toutefois, le potentiel infectieux des *P. fluorescens* est de plus en plus confirmé par des études *in vitro* et par le nombre de cas d'infections déclarées imputées à cette bactérie. L'étude du potentiel infectieux de la souche MFN1032 a montré que cette bactérie présentait de nombreux traits en commun avec le pathogène opportuniste et modèle du genre, *P. aeruginosa*.

L'étude de la cytotoxicité de la souche MFN1032 sera prochainement évaluée par des approches *in vivo* sur différents modèles. Dans un premier temps, des tests seront réalisés sur le nématode *Caenorhabditis elegans*, un modèle particulièrement intéressant pour évaluer le potentiel de virulence des bactéries pathogènes (Lavigne *et al.*, 2006). L'équipe de Microbiologie cellulaire du LMDF met actuellement cette technique au point au sein du laboratoire. Des approches sur modèle animal sont également envisagées, notamment par la réalisation d'infections chroniques et aiguës des poumons chez la souris, compte tenu de l'origine de la souche. L'implication de la phospholipase C PlcC sera également directement évaluée *in vivo* à partir du mutant *plcC*. Le potentiel infectieux des différents variants phénotypiques sera déterminé et des essais de co-infection permettront d'établir si les variants optimisent la capacité de colonisation de la souche, comme c'est le cas pour les souches de la rhizosphère.

L'étude de l'activité hémolytique de la souche MFN1032 montre que différents facteurs sont impliqués. A l'heure actuelle, nous pensons que cette activité résulte de l'action synergique de la phospholipase C PlcC, que nous avons caractérisée, et des biosurfactants, identifiés comme étant des CLP. En effet, le regroupement des différents résultats obtenus à la fois avec les mutants *plcC* et les variants phénotypiques de la souche MFN1032, montre que les souches qui ne produisent pas de biosurfactant sont systématiquement non hémolytiques. La purification des

biosurfactants produits par la souche est actuellement en cours et permettra de vérifier cette hypothèse.

La phospholipase C PlcC produite par MFN1032 appartient à une classe distincte de celles des PLCs actuellement répertoriées. Les futures investigations vont principalement se focaliser sur la détermination de la voie de sécrétion de l'enzyme et sur sa régulation, l'objectif étant de déterminer le lien éventuel avec le régulon flagellaire.

L'implication de la phospholipase C dans l'activité hémolytique a été démontrée mais semble aller au-delà d'une action enzymatique. Il semblerait que la phospholipase C agisse sur la régulation d'autres facteurs impliqués dans l'hémolyse (comme les biosurfactants), et/ou participe au mécanisme impliqué dans la variation de phénotype, à laquelle l'activité hémolytique est sujette. En effet, le mutant *p/cC* MFN1037 présente un phénotype très proche de celui observé pour les variants du groupe 2. L'absence de production de biosurfactants, la perte de l'activité hémolytique, la présence de plusieurs flagelles polaires et l'absence de mobilité de type swarming sont des phénotypes communs. Suite à cette observation, nous avons décidé de tester la capacité à former des biofilms de la souche MFN1037. Le mutant *p/cC* déficient forme des biofilms jusqu'à 5 fois supérieurs à la souche sauvage MFN1032, comme cela avait été montré pour les variants du groupe 2. La question est donc de savoir si la perte du gène *p/cC* peut faire basculer la souche vers un phénotype « hyperadhérent », ou si l'introduction du plasmide suicide pME3087, portant le gène *p/cC* tronqué en 3', a pu provoquer une perturbation de la région concernée, ce qui pourrait créer un biais dans l'interprétation des résultats. Un nouveau mutant *p/cC* va donc être construit, par insertion d'une cassette de résistance à la kanamycine et double recombinaison homologue, pour minimiser la perturbation occasionnée. Cependant, l'hypothèse selon laquelle le phénotype observé est directement corrélé à la perte du gène *p/cC* est cohérente.

Si l'on reprend le modèle proposé pour expliquer le changement de phénotype de MFN1037 occasionné par l'extinction du gène *p/cC*, et qu'on l'applique pour les variants du groupe 2, cela suggère que l'expression de PlcC a été, au moins de façon transitoire, diminuée ou suspendue. Cependant, il doit exister un niveau de

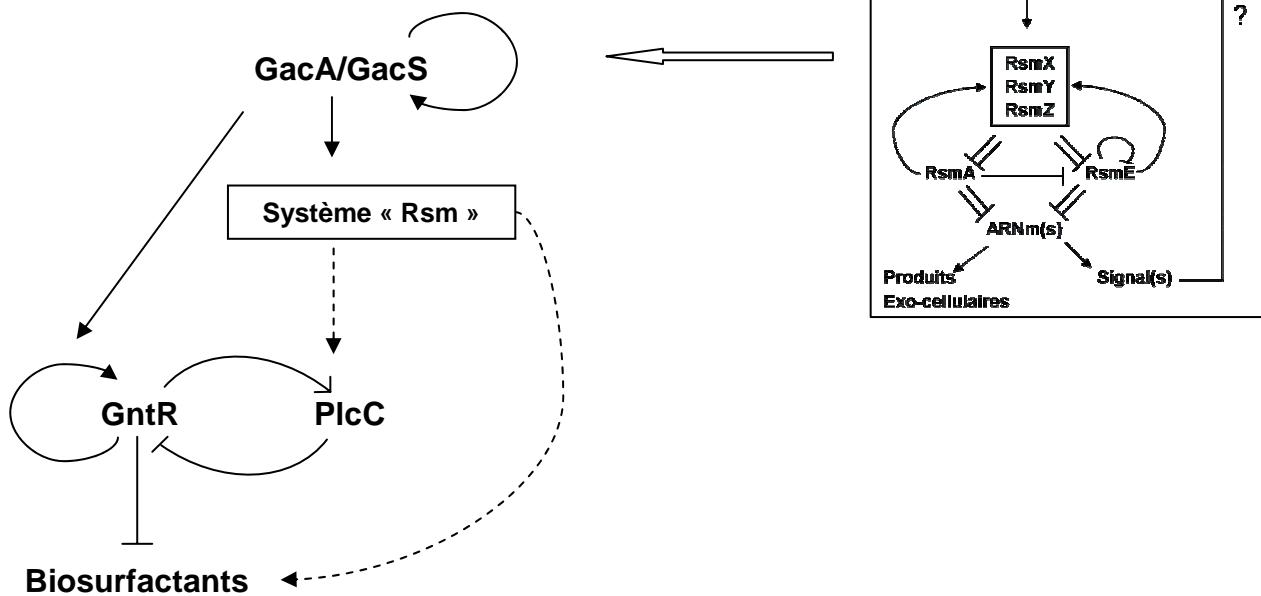


Figure 68 : Modèle du réseau de régulation impliqué dans la variation de phénotype chez MFN1032.

→ effet positif

—| effet négatif

---→ régulation traductionnelle

contrôle supplémentaire, étant donné que les variants du groupe 1, dont la mutation dans l'un des gènes *gac* est responsable de l'absence de production de PlcC, ne basculent pas vers un phénotype « hyperadhérent ».

Une des explications possibles est que le système GacA/GacS contrôle positivement le régulateur GntR (**Figure 68**). Ainsi, la double régulation de GntR par GacA/GacS permet d'équilibrer finement le système.

Dans une cellule Gac⁻, la situation serait alors la suivante:

- PlcC n'est plus produite et n'exerce plus son contrôle négatif sur GntR
- La boucle GntR ne s'entretient plus
- L'expression des biosurfactants n'est plus réprimée par GntR, mais il n'y a plus de régulation traductionnelle réalisée par les ARN RsmX, RsmY et RsmZ, donc pas de production de surfactants.

Bien que le phénotype des variants du groupe 2 ne soit pas restauré en *trans* par les gènes *gac*, les résultats montrent que le système GacA/GacS intervient dans l'émergence de ces variants.

Pour expliquer la situation retrouvée chez les variants du groupe 2, il est nécessaire d'introduire une notion de « seuil » pour le modèle. Dans les mécanismes de régulation épigénétique, un déséquilibre de facteurs « clés » du réseau régulation peut aboutir au basculement d'un état stable à l'autre (multistationnarité) (Guespin-Michel *et al.*, 2003). Ce déséquilibre ne signifie pas que le régulateur n'est plus fonctionnel ou absent, mais que, selon la quantité du régulateur, son influence sur le réseau de régulation est différente.

La présence d'au moins une boucle de rétroaction positive dans un réseau d'un processus biologique est cependant un pré-requis à la présence de deux états stables, et donc à un phénomène épigénétique. Deux boucles de rétroaction positive et négative ont été envisagées pour le régulateur transcriptionnel GntR et le couple GntR/PlcC, respectivement. De plus Haas *et al.* ont montré qu'il existait « un signal », issu de la cascade de régulation Gac/Rsm, qui activait le système Gac, créant ainsi une boucle de rétroaction positive sur GacA/GacS (**Figure 68**).

Dans le cas où ce signal ne remonte pas jusqu'au système GacA/GacS, on peut donc imaginer que l'ensemble de la cascade est perturbé par une diminution de l'activité de Gac.

Van den Broek *et al.* ont montré que les mutations spontanées retrouvées au niveau des gènes *gac* sont réversibles et qu'il est possible, voire courant, d'observer en culture la présence des deux types de cellules phase I / phase II. On peut donc facilement imaginer que le signal permettant d'activer la cascade Gac/Rsm qui n'est pas produit par les cellules *Gac*⁻, se retrouve dilué dans le surnageant de culture. Ainsi, le message est faiblement perçu par le système Gac fonctionnel des cellules de phase I, et en retour le système Gac est moins activé.

Enfin, il faut également prendre en considération que l'ensemble des gènes qui se trouvent sous le contrôle du système GacA/GacS est différemment affecté par la variation du seuil de Gac dans la cellule et qu'il peut exister des interactions plus ou moins fortes dans le réseau.

En prenant en compte ces différentes notions et l'ensemble des résultats obtenus, nous avons formulé une hypothèse quant à l'émergence des variants du groupe 2. L'apparition de variants du groupe 1 en culture provoque la diminution du signal qui entretient la boucle Gac/Rsm. Le seuil de GacA/GacS (fonctionnel) diminue, ce qui affecte la synthèse des exo-enzymes, dont PlcC, mais pas l'expression de GntR qui est moins sensible à la variation du système. La diminution de PlcC provoque une accumulation de GntR, qui réprime l'expression des biosurfactants et modifie l'expression des autres gènes potentiellement sous son contrôle.

Si tel est le cas, l'apport du « signal » dans le surnageant de culture des variants du groupe 2 pourrait faire rebasculer le système. Des investigations supplémentaires vont donc être réalisées dans ce sens.

Actuellement, aucun résultat ne permet de déterminer si l'augmentation du nombre de flagelles et le phénotype hyperadhérent sont liés au régulateur GntR ou à une répercussion de la baisse du seuil de GacA/GacS. La surexpression en *trans* de GntR chez MFN1032 pourra nous aider à répondre à cette question et valider le rôle de GntR sur la production de biosurfactants.

Les mutations spontanées retrouvées au niveau des gènes codant le système Gac permettraient donc de générer différentes classes de variants. Ceci peut expliquer l'émergence de nouveaux phénotypes apparus lors de l'étude des fréquences de réversion des variants du groupe 1, dont la caractérisation est en

cours. Ces résultats sont tout à fait en accord avec les travaux reportés par Davies *et al.* en 2007, qui ont mis en évidence que les SCVs de *P. aeruginosa* émergeaient préférentiellement des souches dont le gène *gacS* était muté.

Ce travail de thèse a été le premier à porter sur l'étude d'une souche *P. fluorescens* hospitalière, et offre de nombreuses perspectives. L'étude de l'activité hémolytique et celle des variations de phénotype vont être poursuivies, et notre équipe s'attache également à la caractérisation d'un SSTT potentiel chez MFN1032, qui présente une activité hémolytique associée aux cellules.

Références bibliographiques

A

- Achouak, W., Conrod, S., Cohen, V., and Heulin, T.** (2004) Phenotypic variation of *Pseudomonas brassicacearum* as a plant root-colonization strategy. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 872-879.
- Aderem, A., and Ulevitch, R.J.** (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**: 782-787.
- Allison, D.G., Ruiz, B., SanJose, C., Jaspe, A., and Gilbert, P.** (1998) Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol Lett* **167**: 179-184.
- Alouf, J.** (2000a) Les toxines bactériennes membranolytiques. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **15**: 104-110.
- Alouf, J.E.** (2000b) Bacterial protein toxins. An overview. *Methods Mol Biol* **145**: 1-26.
- Alouf, J.E.** (2003) Molecular features of the cytolytic pore-forming bacterial protein toxins. *Folia Microbiol (Praha)* **48**: 5-16.
- Amtmann, E.** (1996) The antiviral, antitumoural xanthate D609 is a competitive inhibitor of phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *Drugs Exp Clin Res* **22**: 287-294.
- Andersen, J.B., Koch, B., Nielsen, T.H., Sorensen, D., Hansen, M., Nybroe, O., Christoffersen, C., Sorensen, J., Molin, S., and Givskov, M.** (2003) Surface motility in *Pseudomonas* sp. DSS73 is required for efficient biological containment of the root-pathogenic microfungi *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Microbiology* **149**: 37-46.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J.Y., Wakabayashi, H., and Oyaizu, H.** (2000) Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 4**: 1563-1589.
- Aragon, V., Rossier, O., and Cianciotto, N.P.** (2002) *Legionella pneumophila* genes that encode lipase and phospholipase C activities. *Microbiology* **148**: 2223-2231.

B

- Ba-Thein, W., Lyristis, M., Ohtani, K., Nisbet, I.T., Hayashi, H., Rood, J.I., and Shimizu, T.** (1996) The virR/virS locus regulates the transcription of genes encoding extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* **178**: 2514-2520.
- Baine, W.B.** (1988) A phospholipase C from the Dallas 1E strain of *Legionella pneumophila* serogroup 5: purification and characterization of conditions for optimal activity with an artificial substrate. *J Gen Microbiol* **134**: 489-498.
- Banin, E., Vasil, M.L., and Greenberg, E.P.** (2005) Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11076-11081.
- Banu, S., Ohtani, K., Yaguchi, H., Swe, T., Cole, S.T., Hayashi, H., and Shimizu, T.** (2000) Identification of novel VirR/VirS-regulated genes in *Clostridium perfringens*. *Mol Microbiol* **35**: 854-864.
- Barbieri, J.T., and Sun, J.** (2004) *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **152**: 79-92.
- Barker, A.P., Vasil, A.I., Filloux, A., Ball, G., Wilderman, P.J., and Vasil, M.L.** (2004) A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Mol Microbiol* **53**: 1089-1098.

- Bayliss, C.D., van de Ven, T., and Moxon, E.R.** (2002) Mutations in poll but not mutSLH destabilize *Haemophilus influenzae* tetranucleotide repeats. *Embo J* **21**: 1465-1476.
- Bernstein, D.I., Lummus, Z.L., Santilli, G., Siskosky, J., and Bernstein, I.L.** (1995) Machine operator's lung. A hypersensitivity pneumonitis disorder associated with exposure to metalworking fluid aerosols. *Chest* **108**: 636-641.
- Berthelot, P., Grattard, F., Mallaval, F.O., Ros, A., Lucht, F., and Pozzetto, B.** (2005) [Epidemiology of nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia*]. *Pathol Biol (Paris)* **53**: 341-348.
- Bjedov, I., Tenaillyon, O., Gerard, B., Souza, V., Denamur, E., Radman, M., Taddei, F., and Matic, I.** (2003) Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Science* **300**: 1404-1409.
- Bodilis, J., Calbrix, R., Guerillon, J., Merieau, A., Pawlak, B., Orange, N., and Baray, S.** (2004) Phylogenetic relationships between environmental and clinical isolates of *Pseudomonas fluorescens* and related species deduced from 16S rRNA gene and OprF protein sequences. *Syst Appl Microbiol* **27**: 93-108.
- Bosseray, A., and Micoud, M.**, (eds) (2000) *Infections nosocomiales*.
- Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X., and Gardan, L.** (2000) The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* **20**: 51-63.
- Bouillaut, L., Ramarao, N., Buisson, C., Gilois, N., Gohar, M., Lereclus, D., and Nielsen-Leroux, C.** (2005) FlhA influences *Bacillus thuringiensis* PlcR-regulated gene transcription, protein production, and virulence. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8903-8910.
- Bull, C.T., Duffy, B., Voisard, C., Defago, G., Keel, C., and Haas, D.** (2001) Characterization of spontaneous gacS and gacA regulatory mutants of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHAO. *Antonie Van Leeuwenhoek* **79**: 327-336.
- Burgos, F., Torres, A., Gonzalez, J., Puig de la Bellacasa, J., Rodriguez-Roisin, R., and Roca, J.** (1996) Bacterial colonization as a potential source of nosocomial respiratory infections in two types of spirometer. *Eur. Respir. J* **9**: 2612-2617.
- Burini, J.F., Gugi, B., Merieau, A., and Guespin-Michel, J.F.** (1994) Lipase and acidic phosphatase from the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*: two enzymes whose synthesis is regulated by the growth temperature. *FEMS Microbiol Lett* **122**: 13-18.

C

- Caballero, A.R., Moreau, J.M., Engel, L.S., Marquart, M.E., Hill, J.M., and O'Callaghan, R.J.** (2001) *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases. *Anal Biochem* **290**: 330-337.
- Caiazza, N.C., Merritt, J.H., Brothers, K.M., and O'Toole, G.A.** (2007) Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* **189**: 3603-3612.

- Caroff, M., Karibian, D., Cavaillon, J.M., and Haeffner-Cavaillon, N.** (2002) Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect* **4**: 915-926.
- Casadesus, J., and Low, D.** (2006) Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 830-856.
- Chancey, S.T., Wood, D.W., Pierson, E.A., and Pierson, L.S., 3rd** (2002) Survival of GacS/GacA mutants of the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3308-3314.
- Chicurel, M.** (2000) Bacterial biofilms and infections. Slimebusters. *Nature* **408**: 284-286.
- Cho, K.H., Kim, S.T., and Kim, Y.K.** (2007) Purification of a pore-forming peptide toxin, tolaasin, produced by *Pseudomonas tolaasii* 6264. *J Biochem Mol Biol* **40**: 113-118.
- Comolli, J.C., Hauser, A.R., Waite, L., Whitchurch, C.B., Mattick, J.S., and Engel, J.N.** (1999) *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity in vitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect Immun* **67**: 3625-3630.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P.** (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- Crevel, I., U, S., Carne, A., and Katan, M.** (1994) Purification and properties of zinc-metallophospholipase C from *Pseudomonas fluorescens*. *Eur J Biochem* **224**: 845-852.

D

- D'Argenio, D.A., Gallagher, L.A., Berg, C.A., and Manoil, C.** (2001) Drosophila as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Bacteriol* **183**: 1466-1471.
- Daboussi, F., Hamze, M., Singer, E., Geoffroy, V., Meyer, J.M., and Izard, D.** (2002) *Pseudomonas mosselii* sp. nov., a novel species isolated from clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 363-376.
- Dacheux, D., Attree, I., and Toussaint, B.** (2001) Expression of ExsA in *trans* confers type III secretion system-dependent cytotoxicity on noncytotoxic *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *Infect Immun* **69**: 538-542.
- Darby, C., Cosma, C.L., Thomas, J.H., and Manoil, C.** (1999) Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 15202-15207.
- Dasgupta, N., Arora, S.K., and Ramphal, R.** (2000) *fleN*, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**: 357-364.
- Davies, J.A., Harrison, J.J., Marques, L.L., Foglia, G.R., Stremick, C.A., Storey, D.G., Turner, R.J., Olson, M.E., and Ceri, H.** (2007) The GacS sensor kinase controls phenotypic reversion of small colony variants isolated from biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *FEMS Microbiol Ecol* **59**: 32-46.
- de Lima Pimenta, A., Di Martino, P., Le Bouder, E., Hulen, C., and Blight, M.A.** (2003) In vitro identification of two adherence factors required for in vivo virulence of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbes Infect* **5**: 1177-1187.
- De Souza, J.T., De Boer, M., De Waard, P., Van Beek, T.A., and Raaijmakers, J.M.** (2003a) Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic

- lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 7161-7172.
- de Souza, J.T., Mazzola, M., and Raaijmakers, J.M.** (2003b) Conservation of the response regulator gene *gacA* in *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol* **5**: 1328-1340.
- De Weger, L.A., van der Vlugt, C.I., Wijfjes, A.H., Bakker, P.A., Schippers, B., and Lugtenberg, B.** (1987) Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *J Bacteriol* **169**: 2769-2773.
- Dekkers, L.C., Phoelich, C.C., van der Fits, L., and Lugtenberg, B.J.** (1998) A site-specific recombinase is required for competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7051-7056.
- Deziel, E., Comeau, Y., and Villemur, R.** (2001) Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol* **183**: 1195-1204.
- Di Martino, P., Rebiere-Huet, J., and Hulen, C.** (2000) Effects of antibiotics on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* to A549 pneumocyte cells. *Chemotherapy* **46**: 129-134.
- Digat, B., and Gardan, L.** (1987) Caracterisation, variabilite et selection de souches benefiques de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*. *OEPP Bull* **17**: 559-568.
- Doi, O., and Nojima, S.** (1971) Phospholipase C from *Pseudomonas fluorescens*. *Biochim Biophys Acta* **248**: 234-244.
- Dubuis, C., and Haas, D.** (2007) Cross-species GacA-controlled induction of antibiosis in pseudomonads. *Appl Environ Microbiol* **73**: 650-654.
- Duffy, B.K., and Defago, G.** (2000) Controlling instability in *gacS-gacA* regulatory genes during inoculant production of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3142-3150.
- Durban, J., Villaverde, E., Monteoliva-Sanchez, M., and Ramos-Cormenzana, A.** (1996) Bacterial contamination of hydrophilic contact lens solutions marketed in Spain. *Optom. Vis. Sci.* **73**: 529-532.

E

- Emerson, J., Rosenfeld, M., McNamara, S., Ramsey, B., and Gibson, R.L.** (2002) *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **34**: 91-100.
- Enderle, P.J., and Farwell, M.A.** (1998) Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Biotechniques* **25**: 954-956, 958.

F

- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H., and Prince, A.** (1998) Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun* **66**: 43-51.
- Feuilloley, M.G., Mezghani-Abdelmoula, S., Picot, L., Lesouhaitier, O., Merieau, A., Guerillon, J., Boujedaini, N., Cazin, L., and Orange, N.** (2003) Involvement of *Pseudomonas* and related species in central nervous system infections *Recent Res. Devel. Microbiology* **7**: 55-71.

- Feuilloley, M.G.J., Chapalain, A., Rossignol, G., Lesouhaitier, O., Merieau, A., Geoffroy, V., Guerillon, J., Meyer, J.M., and Orange, N.** (2007) Comparative study of seven fluorescent pseudomonad clinical isolates. *Can J Microbiol* En révision.
- Filloux, A., and Vallet, I.** (2003) [Biofilm: set-up and organization of a bacterial community]. *Med Sci (Paris)* **19**: 77-83.
- Filopon, D., Merieau, A., Bernot, G., Comet, J.P., Leberre, R., Guery, B., Polack, B., and Guespin-Michel, J.** (2006) Epigenetic acquisition of inducibility of type III cytotoxicity in *P. aeruginosa*. *BMC Bioinformatics* **7**: 272.
- Fliegera, A., Gong, S., Faigle, M., and Neumeister, B.** (2000) Critical evaluation of p-nitrophenylphosphorylcholine (p-NPPC) as artificial substrate for the detection of phospholipase C*. *Enzyme Microb Technol* **26**: 451-458.
- Foulon, W., Naessens, A., Lauwers, S., Volckaert, M., Devroey, P., and Amy, J.** (1981) Pelvic inflammatory disease due to *Pseudomonas fluorescens* in a patient wearing an intrauterine device. *Lancet* **2**.
- Fraser, G.M., Claret, L., Furness, R., Gupta, S., and Hughes, C.** (2002) Swarming-coupled expression of the *Proteus mirabilis* hpmBA haemolysin operon. *Microbiology* **148**: 2191-2201.

G

- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Beecher, D.J., Gominet, M., Lereclus, D., Wong, A.C., and Senesi, S.** (2002) Requirement of flhA for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol* **184**: 6424-6433.
- Gilbert, R.J.** (2002) Pore-forming toxins. *Cell Mol Life Sci* **59**: 832-844.
- Ginard, M., Lalucat, J., Tummler, B., and Romling, U.** (1997) Genome organization of *Pseudomonas stutzeri* and resulting taxonomic and evolutionary considerations. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 132-143.
- Givaudan, A., Baghdiguian, S., Lanois, A., and Boemare, N.** (1995) Swarming and Swimming Changes Concomitant with Phase Variation in *Xenorhabdus nematophilus*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1408-1413.
- Givaudan, A., and Lanois, A.** (2000) flhDC, the flagellar master operon of *Xenorhabdus nematophilus*: requirement for motility, lipolysis, extracellular hemolysis, and full virulence in insects. *J Bacteriol* **182**: 107-115.
- Givskov, M., Eberl, L., Christiansen, G., Benedik, M.J., and Molin, S.** (1995) Induction of phospholipase- and flagellar synthesis in *Serratia liquefaciens* is controlled by expression of the flagellar master operon flhD. *Mol Microbiol* **15**: 445-454.
- Gohar, M., Okstad, O.A., Gilois, N., Sanchis, V., Kolsto, A.B., and Lereclus, D.** (2002) Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. *Proteomics* **2**: 784-791.
- Govan, J.R., Fyfe, J.A., and Jarman, T.R.** (1981) Isolation of alginate-producing mutants of *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas mendocina*. *J Gen Microbiol* **125**: 217-220.
- Govan, J.R., and Harris, G.S.** (1986) *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: unusual bacterial adaptation and pathogenesis. *Microbiol Sci* **3**: 302-308.

- Griffith, O.H., and Ryan, M.** (1999) Bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C: structure, function, and interaction with lipids. *Biochim Biophys Acta* **1441**: 237-254.
- Grundling, A., Gonzalez, M.D., and Higgins, D.E.** (2003) Requirement of the *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipase PC-PLC during infection of human epithelial cells. *J Bacteriol* **185**: 6295-6307.
- Guespin-Michel, J.F., Polack, B., and Mérieau, A.** (2003) Bacterial adaptation and epigenesis. *Recent research and Developments in Microbiology* **7**: 289-305.
- Gugi, B., Orange, N., Hellio, F., Burini, J.F., Guillou, C., Leriche, F., and Guespin-Michel, J.F.** (1991) Effect of growth temperature on several exported enzyme activities in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* **173**: 3814-3820.
- Guillou, C., and Guespin-Michel, J.F.** (1996) Evidence for two domains of growth temperature for the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens* MF0. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3319-3324.

H

- Haas, D., and Defago, G.** (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol* **3**: 307-319.
- Han, B., Pain, A., and Johnstone, K.** (1997) Spontaneous duplication of a 661 bp element within a two-component sensor regulator gene causes phenotypic switching in colonies of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of mushrooms. *Mol Microbiol* **25**: 211-218.
- Hayashi, T., Kamio, Y., and Terawaki, Y.** (1989) Purification and characterization of cytotoxin from the crude extract of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog* **6**: 103-112.
- Heeb, S., Itoh, Y., Nishijyo, T., Schnider, U., Keel, C., Wade, J., Walsh, U., O'Gara, F., and Haas, D.** (2000) Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 232-237.
- Heeb, S., Blumer, C., and Haas, D.** (2002) Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol* **184**: 1046-1056.
- Heeb, S., Kuehne, S.A., Bycroft, M., Crivii, S., Allen, M.D., Haas, D., Camara, M., and Williams, P.** (2006) Functional analysis of the post-transcriptional regulator RsmA reveals a novel RNA-binding site. *J Mol Biol* **355**: 1026-1036.
- Hejnár, P., Kolar, M., and Hajek, V.** (1998) Occurrence of gram-negative non-fermenting rods in hemocultures and their sensitivity to antimicrobial agents. *Bratisl Lek Listy* **99**: 573-578.
- Hemery, G., Chevalier, S., Bellon-Fontaine, M.N., Haras, D., and Orange, N.** (2007) Growth temperature and OprF porin affect cell surface physicochemical properties and adhesive capacities of *Pseudomonas fluorescens* MF37. *J Ind Microbiol Biotechnol* **34**: 49-54.
- Henderson, I.R., Owen, P., and Nataro, J.P.** (1999) Molecular switches—the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol Microbiol* **33**: 919-932.
- Hernday, A.D., Braaten, B.A., and Low, D.A.** (2003) The mechanism by which DNA adenine methylase and PapI activate the pap epigenetic switch. *Mol Cell* **12**: 947-957.

- Hernday, A.D., Braaten, B.A., Broitman-Maduro, G., Engelberts, P., and Low, D.A.** (2004) Regulation of the pap epigenetic switch by CpxAR: phosphorylated CpxR inhibits transition to the phase ON state by competition with Lrp. *Mol Cell* **16**: 537-547.
- Herz, J., Kowal, R.C., Ho, Y.K., Brown, M.S., and Goldstein, J.L.** (1990) Low density lipoprotein receptor-related protein mediates endocytosis of monoclonal antibodies in cultured cells and rabbit liver. *J Biol Chem* **265**: 21355-21362.
- Heumann, D., and Roger, T.** (2002) Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta* **323**: 59-72.
- Hinnebusch, B.J., Rudolph, A.E., Cherepanov, P., Dixon, J.E., Schwan, T.G., and Forsberg, A.** (2002) Role of *Yersinia* murine toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. *Science* **296**: 733-735.
- Hinsa, S.M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J.L., and O'Toole, G.A.** (2003) Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol Microbiol* **49**: 905-918.
- Hoiby, N., Krogh Johansen, H., Moser, C., Song, Z., Ciofu, O., and Kharazmi, A.** (2001) *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes Infect* **3**: 23-35.
- Holloway, B.W., Krishnapillai, V., and Morgan, A.F.** (1979) Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol. Rev.* **43**: 73-102.
- Hsueh, P., Teng, L., Pan, H., Chen, Y., Sun, C., Ho, S., and Luh, K.** (1998) Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bacteremia among oncology patients. *J. Clin. Microbiol* **36**: 2914-2917.
- Hueck, C.J.** (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433.
- Hughson, F.M.** (1997) Penetrating insights into pore formation. *Nat Struct Biol* **4**: 89-92.
- Husson, M., Hamze, M., Verhille, S., and Izard, D., (eds)** (2000) *Pseudomonas et Burkholderia*. Paris: ESKA.

- Istivan, T.S., and Coloe, P.J.** (2006) Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis. *Microbiology* **152**: 1263-1274.
- Ivanov, A., Titball, R.W., and Kostadinova, S.** (1996) Characterisation of a phospholipase C produced by *Pseudomonas fluorescens*. *New Microbiol* **19**: 113-121.

- Jepson, M., and Titball, R.** (2000) Structure and function of clostridial phospholipases C. *Microbes Infect* **2**: 1277-1284.
- Jolley, K.A., Appleby, L., Wright, J.C., Christodoulides, M., and Heckels, J.E.** (2001) Immunization with recombinant Opc outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*: influence of sequence variation and levels of expression on the bactericidal immune response against meningococci. *Infect Immun* **69**: 3809-3816.
- Jones, A.M., Boucher, P.E., Williams, C.L., Stibitz, S., and Cotter, P.A.** (2005) Role of BvgA phosphorylation and DNA binding affinity in control of Bvg-

mediated phenotypic phase transition in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol* **58**: 700-713.

K

- Kadurugamuwa, J.L., and Beveridge, T.J.** (1997) Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release. *J Antimicrob Chemother* **40**: 615-621.
- Karkhanis, Y.D., Zeltner, J.Y., Jackson, J.J., and Carlo, D.J.** (1978) A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. *Anal Biochem* **85**: 595-601.
- Kay, E., Dubuis, C., and Haas, D.** (2005) Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 17136-17141.
- Kersters, I., Huys, G., Van Duffel, H., Vancanneyt, M., Kersters, K., and Verstraete, W.** (1996) Survival potential of *Aeromonas hydrophila* in freshwaters and nutrient-poor waters in comparison with other bacteria. *J Appl Bacteriol* **80**: 266-276.
- Klausen, M., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S., and Tolker-Nielsen, T.** (2003) Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* **50**: 61-68.
- Koch, B., Nielsen, T.H., Sorensen, D., Andersen, J.B., Christensen, C., Molin, S., Givskov, M., Sorensen, J., and Nybroe, O.** (2002) Lipopeptide production in *Pseudomonas* sp. strain DSS73 is regulated by components of sugar beet seed exudate via the Gac two-component regulatory system. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4509-4516.
- Koka, R., and Weimer, B.C.** (2000) Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98. *J Appl Microbiol* **89**: 280-288.
- Komano, T.** (1999) Shufflons: multiple inversion systems and integrons. *Annu Rev Genet* **33**: 171-191.
- Konig, A., Corbacioglu, S., Ballmaier, M., and Welte, K.** (1997) Downregulation of c-kit expression in human endothelial cells by inflammatory stimuli. *Blood* **90**: 148-155.
- Krall, R., Schmidt, G., Aktories, K., and Barbieri, J.T.** (2000) *Pseudomonas aeruginosa* ExoT is a Rho GTPase-activating protein. *Infect Immun* **68**: 6066-6068.

L

- Laemmli, U.K., Molbert, E., Showe, M., and Kellenberger, E.** (1970) Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *J Mol Biol* **49**: 99-113.
- Lally, E.T., Hill, R.B., Kieba, I.R., and Korostoff, J.** (1999) The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol* **7**: 356-361.
- Lavigne, J.P., Blanc-Potard, A.B., Bourg, G., O'Callaghan, D., and Sotto, A.** (2006) [Caenorhabditis elegans: in vivo study model of bacterial virulence]. *Pathol Biol (Paris)* **54**: 439-446.
- Lerouge, I., and Vanderleyden, J.** (2002) O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 17-47.

- Liao, C.H., and McCallus, D.E.** (1998) Biochemical and genetic characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. *Appl Environ Microbiol* **64**: 914-921.
- Lutz, F., Mohr, M., Grimmig, M., Leidolf, R., and Linder, D.** (1993) *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin-binding protein in rabbit erythrocyte membranes. An oligomer of 28 kDa with similarity to transmembrane channel proteins. *Eur J Biochem* **217**: 1123-1128.
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., and Pier, G.B.** (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* **2**: 1051-1060.

M

- Mahajan-Miklos, S., Tan, M.W., Rahme, L.G., and Ausubel, F.M.** (1999) Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-Caenorhabditis elegans pathogenesis model. *Cell* **96**: 47-56.
- Martin, P., Sun, L., Hood, D.W., and Moxon, E.R.** (2004) Involvement of genes of genome maintenance in the regulation of phase variation frequencies in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology* **150**: 3001-3012.
- Martin, S.F., Follows, B.C., Hergenrother, P.J., and Franklin, C.L.** (2000) A novel class of zinc-binding inhibitors for the phosphatidylcholine-preferring phospholipase C from *Bacillus cereus*. *J Org Chem* **65**: 4509-4514.
- Martinez-Granero, F., Capdevila, S., Sanchez-Contreras, M., Martin, M., and Rivilla, R.** (2005) Two site-specific recombinases are implicated in phenotypic variation and competitive rhizosphere colonization in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology* **151**: 975-983.
- Martino, R., Martinez, C., Pericas, R., Salazar, R., Sola, C., Brunet, S., Sureda, A., and Domingo-Albos, A.** (1996) Bacteremia due to glucose non-fermenting gram-negative bacilli in patients with haematological neoplasias and solid tumors. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*: 1510-1515.
- Mazurier, S., Lemunier, M., Siblot, S., Mougel, C., and Lemanceau, P.** (2004) Distribution and diversity of type III secretion system-like genes in saprophytic and phytopathogenic fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiology Ecology* **49**: 455-467
- McLean, R., and Nickel, J.** (1991) Bacterial colonization behaviour: a new virulence strategy in urinary infections? *Med. Hypotheses* **36**: 269-272.
- Menestrina, G., Serra, M.D., and Prevost, G.** (2001) Mode of action of beta-barrel pore-forming toxins of the staphylococcal alpha-hemolysin family. *Toxicon* **39**: 1661-1672.
- Meyer, J.M., Geoffroy, V.A., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., Achouak, W., and Palleroni, N.J.** (2002) Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2745-2753.
- Meylheuc, T., Herry, J., and Bello-Fontaine, M.** (2001) Les biosurfactants, des biomolécules à forte potentialité d'application. *Sciences des Aliments* **21**: 591-649.
- Michelet, N., and Mahillon, J.** (2003) *Bacillus cereus*, opportuniste et pathogène. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **18**: 113-122.
- Mignot, T., Mock, M., Robichon, D., Landier, A., Lereclus, D., and Fouet, A.** (2001) The incompatibility between the PlcR- and AtxA-controlled regulons

- may have selected a nonsense mutation in *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol* **42**: 1189-1198.
- Monds, R.D., Newell, P.D., Gross, R.H., and O'Toole, G.A.** (2007) Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. *Mol Microbiol* **63**: 656-679.
- Mow, W.S., Landers, C.J., Steinhart, A.H., Feagan, B.G., Croitoru, K., Seidman, E., Greenberg, G.R., and Targan, S.R.** (2004) High-level serum antibodies to bacterial antigens are associated with antibiotic-induced clinical remission in Crohn's disease: a pilot study. *Dig Dis Sci* **49**: 1280-1286.
- Murty, M.G., Srinivas, G., and Sekar, V.** (1994) Production of a mosquitocidal exotoxin by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *J Invertebr Pathol* **64**: 68-70.

N

- Nakamura, R.M., Matsutani, M., and Barry, M.** (2003) Advances in clinical laboratory tests for inflammatory bowel disease. *Clin Chim Acta* **335**: 9-20.
- Namnyak, S., Hussain, S., Davalle, J., Roker, K., and Strickland, M.** (1999) Contaminated lithium heparin bottles as a source of pseudobacteraemia due to *Pseudomonas fluorescens*. *J. Hosp. Infect* **41**: 23-28.
- Nielsen, T.H., Christensen, C., Anthoni, U., and Sorensen, J.** (1999) Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. *J Appl Microbiol* **87**: 80-90.
- Nielsen, T.H., Thrane, C., Christensen, C., Anthoni, U., and Sorensen, J.** (2000) Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin - a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *J Appl Microbiol* **89**: 992-1001.

O

- O'Toole, G.A., and Kolter, R.** (1998a) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28**: 449-461.
- O'Toole, G.A., and Kolter, R.** (1998b) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**: 295-304.
- Ohnishi, M., Hayashi, T., Tomita, T., and Terawaki, Y.** (1994) Mechanism of the cytolytic action of *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin: oligomerization of the cytotoxin on target membranes. *FEBS Lett* **356**: 357-360.
- Osawa, K., Nakajima, M., Kataoka, N., Arakawa, S., and Kamidono, S.** (2002) Evaluation of antibacterial efficacy of drugs for urinary tract infections by genotyping based on pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *J Infect Chemother* **8**: 353-357.
- Ostroff, R.M., Vasil, A.I., and Vasil, M.L.** (1990) Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **172**: 5915-5923.

P

- Palleroni, N.J.** (1984) Family 1. *Pseudomonaceae*. In : *Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 1*.
- Parkins, M.D., Ceri, H., and Storey, D.G.** (2001) *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Mol Microbiol* **40**: 1215-1226.
- Pasargiklian, I., Lusco, G., Paizis, G., and Mascheroni, E.** (1996) Ticarcillin/clavulanic acid: determination of minimal inhibitory concentrations against bacterial strains isolated from patients in intensive care units. Comparison with other agents. *J. Chemother* **8**: 113-121.
- Perkins-Balding, D., Duval-Valentin, G., and Glasgow, A.C.** (1999) Excision of IS492 requires flanking target sequences and results in circle formation in *Pseudoalteromonas atlantica*. *J Bacteriol* **181**: 4937-4948.
- Persson, A., Molin, G., and Weibull, C.** (1990) Physiological and Morphological Changes Induced by Nutrient Limitation of *Pseudomonas fluorescens* 378 in Continuous Culture. *Appl Environ Microbiol* **56**: 686-692.
- Picot, L., Abdelmoula, S.M., Merieau, A., Leroux, P., Cazin, L., Orange, N., and Feuilloley, M.G.** (2001) *Pseudomonas fluorescens* as a potential pathogen: adherence to nerve cells. *Microbes Infect* **3**: 985-995.
- Picot, L., Chevalier, S., Mezghani-Abdelmoula, S., Merieau, A., Lesouhaitier, O., Leroux, P., Cazin, L., Orange, N., and Feuilloley, M.G.** (2003) Cytotoxic effects of the lipopolysaccharide from *Pseudomonas fluorescens* on neurons and glial cells. *Microb Pathog* **35**: 95-106.
- Picot, L., Mezghani-Abdelmoula, S., Chevalier, S., Merieau, A., Lesouhaitier, O., Guerillon, J., Cazin, L., Orange, N., and Feuilloley, M.G.** (2004) Regulation of the cytotoxic effects of *Pseudomonas fluorescens* by growth temperature. *Res Microbiol* **155**: 39-46.
- Pimenta, A.L., Di Martino, P., and Blight, M.A.** (2006) Positive correlation between in vivo and in vitro assays for the evaluation of *Pseudomonas* virulence. *Res Microbiol* **157**: 885-890.
- Pomerantsev, A.P., Kalnin, K.V., Osorio, M., and Leppla, S.H.** (2003) Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and sphingomyelinase activities in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Infect Immun* **71**: 6591-6606.
- Preuss, I., Kaiser, I., and Gehring, U.** (2001) Molecular characterization of a phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C. *Eur J Biochem* **268**: 5081-5091.
- Puckett, A., Davison, G., Entwistle, C.C., and Barbara, J.A.** (1992) Post transfusion septicaemia 1980-1989: importance of donor arm cleansing. *J Clin Pathol* **45**: 155-157.
- Pukatzki, S., Kessin, R.H., and Mekalanos, J.J.** (2002) The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3159-3164.

R

- Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfson, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., and Ausubel, F.M.** (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* **268**: 1899-1902.

- Rahme, L.G., Ausubel, F.M., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B.C., Lau, G.W., Mahajan-Miklos, S., Plotnikova, J., Tan, M.W., Tsongalis, J., Walendziewicz, C.L., and Tompkins, R.G.** (2000) Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8815-8821.
- Rainey, P.B.** (1991) Phenotypic variation of *Pseudomonas putida* and *P. tolaasii* affects attachment to *Agaricus bisporus* mycelium. *J Gen Microbiol* **137**: 2769-2779.
- Ramos, J.L.** (2004) *Pseudomonas*. Kluwer Academic Publisher, New-York.
- Rebiere-Huet, J., Guerillon, J., Pimenta, A.L., Di Martino, P., Orange, N., and Hulen, C.** (2002) Porins of *Pseudomonas fluorescens* MFO as fibronectin-binding proteins. *FEMS Microbiol Lett* **215**: 121-126.
- Regeard, C., Merieau, A., Leriche, F., and Guespin-Michel, J.F.** (1999) Genetic studies of a thermoregulated gene in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Res Microbiol* **150**: 447-456.
- Reichert, R.W., Das, N.D., and Zam, Z.S.** (1982) Adherence properties of *Pseudomonas* pili to epithelial cells of the human cornea. *Curr Eye Res* **2**: 289-293.
- Reisner, A., Hoiby, N., Tolker-Nielsen, T., and Molin, S.** (2005) Microbial pathogenesis and biofilm development. *Contrib Microbiol* **12**: 114-131.
- Rezzonico, F., Binder, C., Defago, G., and Moenne-Loccoz, Y.** (2005) The type III secretion system of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* KD targets the phytopathogenic Chromista *Pythium ultimum* and promotes cucumber protection. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 991-1001.
- Rigali, S., Derouaux, A., Giannotta, F., and Dusart, J.** (2002) Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *J Biol Chem* **277**: 12507-12515.
- Rodriguez Ramirez, J., Pena Quintana, P., Cabrera Galvan, J., and Gomez Diaz, J.** (1989) Colestasis intrahepatica severa en el curso de sepsis por *Pseudomonas fluorescens*. *Rev. Clin. Esp.* **185**: 106-107.
- Ron, E.Z., and Rosenberg, E.** (2001) Natural roles of biosurfactants. *Environ Microbiol* **3**: 229-236.
- Rossier, O., and Cianciotto, N.P.** (2005) The *Legionella pneumophila* tatB gene facilitates secretion of phospholipase C, growth under iron-limiting conditions, and intracellular infection. *Infect Immun* **73**: 2020-2032.
- Rowe, G.E., and Welch, R.A.** (1994) Assays of hemolytic toxins. *Methods Enzymol* **235**: 657-667.

S

- Sacherer, P., Defago, G., and Haas, D.** (1994) Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene gacA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiol Lett* **116**: 155-160.
- Sage, A.E., Vasil, A.I., and Vasil, M.L.** (1997a) Molecular characterization of mutants affected in the osmoprotectant-dependent induction of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol* **23**: 43-56.
- Sage, A.E., and Vasil, M.L.** (1997b) Osmoprotectant-dependent expression of plcH, encoding the hemolytic phospholipase C, is subject to novel catabolite

- repression control in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **179**: 4874-4881.
- Sanchez-Contreras, M., Martin, M., Villacieros, M., O'Gara, F., Bonilla, I., and Rivilla, R.** (2002) Phenotypic selection and phase variation occur during alfalfa root colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113. *J Bacteriol* **184**: 1587-1596.
- Sato, H., Feix, J.B., Hillard, C.J., and Frank, D.W.** (2005) Characterization of phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III cytotoxin, ExoU. *J Bacteriol* **187**: 1192-1195.
- Sawada, H., Kanaya, S., Tsuda, M., Suzuki, F., Azegami, K., and Saitou, N.** (2002) A phylogenomic study of the OCTase genes in *Pseudomonas syringae* pathovars: the horizontal transfer of the argK-tox cluster and the evolutionary history of OCTase genes on their genomes. *J Mol Evol* **54**: 437-457.
- Schmidt-Eisenlohr, H., Gast, A., and Baron, C.** (2003) Inactivation of gacS does not affect the competitiveness of *Pseudomonas chlororaphis* in the *Arabidopsis thaliana* rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1817-1826.
- Schmiel, D.H., and Miller, V.L.** (1999) Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes Infect* **1**: 1103-1112.
- Schmiel, D.H., Young, G.M., and Miller, V.L.** (2000) The *Yersinia enterocolitica* phospholipase gene yplA is part of the flagellar regulon. *J Bacteriol* **182**: 2314-2320.
- Schnider-Keel, U., Lejbolle, K.B., Baehler, E., Haas, D., and Keel, C.** (2001) The sigma factor AlgU (AlgT) controls exopolysaccharide production and tolerance towards desiccation and osmotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5683-5693.
- Schnider, U., Keel, C., Voisard, C., Defago, G., and Haas, D.** (1995) Tn5-directed cloning of pqq genes from *Pseudomonas fluorescens* CHA0: mutational inactivation of the genes results in overproduction of the antibiotic pyoluteorin. *Appl Environ Microbiol* **61**: 3856-3864.
- Scott, J., Boulton, F., Govan, J., Miles, R., Mc Clelland, D., and Prowse, C.** (1988) A fatal transfusion reaction associated with blood contaminated with *Pseudomonas fluorescens*. *Vox Sang* **54**: 201-204.
- Shimizu, T., Yaguchi, H., Ohtani, K., Banu, S., and Hayashi, H.** (2002) Clostridial VirR/VirS regulon involves a regulatory RNA molecule for expression of toxins. *Mol Microbiol* **43**: 257-265.
- Shortridge, V.D., Lazdunski, A., and Vasil, M.L.** (1992) Osmoprotectants and phosphate regulate expression of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **6**: 863-871.
- Simon, R., Priefer, U., and Pehle, A.** (1983) A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *biotechnology* **1**: 784-790.
- Slamti, L., Gohar, M., and Lereclus, D.** (2003) Expression de gènes de virulence chez *Bacillus cereus*, le regulon PlcR. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **18**: 123-128.
- Sliwinski-Korell, A., Engelhardt, H., Kampka, M., and Lutz, F.** (1999) Oligomerization and structural changes of the pore-forming *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin. *Eur J Biochem* **265**: 221-230.
- Smania, A.M., Segura, I., Pezza, R.J., Becerra, C., Albesa, I., and Argarana, C.E.** (2004) Emergence of phenotypic variants upon mismatch repair disruption in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **150**: 1327-1338.

- Smith, J., Ashurst-Smith, C., and Norton, R.** (2002) *Pseudomonas fluorescens* pseudobacteraemia: a cautionary lesson. *J Paediatr Child Health* **38**: 63-65.
- Soberon-Chavez, G., Lepine, F., and Deziel, E.** (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**: 718-725.
- Songer, J.G.** (1997) Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol* **5**: 156-161.
- Sorensen, D., Nielsen, T.H., Christophersen, C., Sorensen, J., and Gajhede, M.** (2001) Cyclic lipopeptide amphisin from *Pseudomonas* sp. strain DSS73. *Acta Crystallogr C* **57**: 1123-1124.
- Stallwood, B., Shears, J., Williams, P.A., and Hughes, K.A.** (2005) Low temperature bioremediation of oil-contaminated soil using biostimulation and bioaugmentation with a *Pseudomonas* sp. from maritime Antarctica. *J Appl Microbiol* **99**: 794-802.
- Stepaniak, L., Birkeland, S.-E., Sorhaug, T., and Vagias, G.** (1987) Isolation and partial characterization of heat stable proteinase, lipase and phospholipase C from *Pseudomonas fluorescens* P1. *Milchwissenschaft* **42**: 75-79.
- Stonehouse, M.J., Cota-Gomez, A., Parker, S.K., Martin, W.E., Hankin, J.A., Murphy, R.C., Chen, W., Lim, K.B., Hackett, M., Vasil, A.I., and Vasil, M.L.** (2002) A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C. *Mol Microbiol* **46**: 661-676.
- Sundin, C., Hallberg, B., and Forsberg, A.** (2004) ADP-ribosylation by exoenzyme T of *Pseudomonas aeruginosa* induces an irreversible effect on the host cell cytoskeleton in vivo. *FEMS Microbiol Lett* **234**: 87-91.

T

- Tampakaki, A.P., Fadouloglou, V.E., Gazi, A.D., Panopoulos, N.J., and Kokkinidis, M.** (2004) Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol* **6**: 805-816.
- Thangkhiew, I.** (1986) Successful treatment with ceftazidime of a *Pseudomonas fluorescens* chest infection in a myasthenic patient. *J Antimicrob Chemother* **18**: 428-429.
- Titball, R.W.** (1993) Bacterial phospholipases C. *Microbiol Rev* **57**: 347-366.
- Toussaint, B., Delic-Attree, I., and Vignais, P.M.** (1993) *Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the algD promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **196**: 416-421.
- Trent, M.S., Stead, C.M., Tran, A.X., and Hankins, J.V.** (2006) Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. *J Endotoxin Res* **12**: 205-223.

V

- Van Amersfoort, E.S., Van Berkel, T.J., and Kuiper, J.** (2003) Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* **16**: 379-414.
- van den Broek, D., Chin, A.W.T.F., Eijkemans, K., Mulders, I.H., Bloemberg, G.V., and Lugtenberg, B.J.** (2003) Biocontrol traits of *Pseudomonas* spp. are regulated by phase variation. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 1003-1012.
- van den Broek, D., Bloemberg, G.V., and Lugtenberg, B.** (2005a) The role of phenotypic variation in rhizosphere *Pseudomonas* bacteria. *Environ Microbiol* **7**: 1686-1697.

- van den Broek, D., Chin, A.W.T.F., Bloemberg, G.V., and Lugtenberg, B.J.** (2005b) Role of RpoS and MutS in phase variation of *Pseudomonas* sp. PCL1171. *Microbiology* **151**: 1403-1408.
- van den Broek, D., Chin, A.W.T.F., Bloemberg, G.V., and Lugtenberg, B.J.** (2005c) Molecular nature of spontaneous modifications in gacS which cause colony phase variation in *Pseudomonas* sp. strain PCL1171. *J Bacteriol* **187**: 593-600.
- van der Woude, M.W., and Baumler, A.J.** (2004) Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin Microbiol Rev* **17**: 581-611, table of contents.
- Vance, R.E., Rietsch, A., and Mekalanos, J.J.** (2005) Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vivo. *Infect Immun* **73**: 1706-1713.
- Visca, P., Imperi, F., and Lamont, I.L.** (2007) Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol* **15**: 22-30.
- von Gotz, F., Haussler, S., Jordan, D., Saravanamuthu, S.S., Wehmhoner, D., Strussmann, A., Lauber, J., Attree, I., Buer, J., Tummler, B., and Steinmetz, I.** (2004) Expression analysis of a highly adherent and cytotoxic small colony variant of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a lung of a patient with cystic fibrosis. *J Bacteriol* **186**: 3837-3847.
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M.L., Lazdunski, A., Wu, L.F., and Filloux, A.** (2001) Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *Embo J* **20**: 6735-6741.

W

- Walsh, U.F., Morrissey, J.P., and O'Gara, F.** (2001) *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr Opin Biotechnol* **12**: 289-295.
- Wei, B., Huang, T., Dalwadi, H., Sutton, C.L., Bruckner, D., and Braun, J.** (2002) *Pseudomonas fluorescens* encodes the Crohn's disease-associated I2 sequence and T-cell superantigen. *Infect Immun* **70**: 6567-6575.
- Weiser, J.N., Goldberg, J.B., Pan, N., Wilson, L., and Virji, M.** (1998) The phosphorylcholine epitope undergoes phase variation on a 43-kilodalton protein in *Pseudomonas aeruginosa* and on pili of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **66**: 4263-4267.
- Wellisch, G., Cohen, E., Cahane, Z., and Horowitz, J.** (1984) Simple method for collagenase determination in 38 *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Clin Microbiol* **20**: 1020-1021.
- West, S.E., Schweizer, H.P., Dall, C., Sample, A.K., and Runyen-Janecky, L.J.** (1994) Construction of improved *Escherichia*-*Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **148**: 81-86.
- Whyte, A., Lafong, C., Malone, J., and Golda, B.** (1999) Contaminated lithium heparin bottles as a source of pseudobacteremia. *J Hosp Infect* **42**: 342-343.
- Wilderman, P.J., Vasil, A.I., Johnson, Z., and Vasil, M.L.** (2001) Genetic and biochemical analyses of a eukaryotic-like phospholipase D of *Pseudomonas aeruginosa* suggest horizontal acquisition and a role for persistence in a chronic pulmonary infection model. *Mol Microbiol* **39**: 291-303.

Y

- Yagci, A., Tuc, Y., and Soyletir, G.** (2002) Elastase and alkaline protease production by *Pseudomonas aeruginosa* strains: comparison of two procedures. *New Microbiol* **25**: 223-229.
- Yamamoto, M., Ina, Y., Takada, K., Noda, M., Morishita, M., Senda, Y., Torii, Y., Kakihara, H., Yoshikawa, K., and Sugiura, T.** (1991) Therapeutic efficacy of imipenem/cilastatin sodium on respiratory tract infections in lung cancer patients. *Jpn. J. Antibiot.* **44**: 388-397.
- Young, G.M., Schmiel, D.H., and Miller, V.L.** (1999) A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6456-6461.
- Yozwiak, M.L., and Songer, J.G.** (1993) Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. *Am J Vet Res* **54**: 392-397.

Z

- Zhang, M.Y., Lovgren, A., Low, M.G., and Landen, R.** (1993) Characterization of an avirulent pleiotropic mutant of the insect pathogen *Bacillus thuringiensis*: reduced expression of flagellin and phospholipases. *Infect Immun* **61**: 4947-4954.

Annexes

Research article

Open Access

Involvement of a phospholipase C in the hemolytic activity of a clinical strain of *Pseudomonas fluorescens*

Gaelle Rossignol, Annabelle Merieau*, Josette Guerillon, Wilfried Veron, Olivier Lesouhaitier, Marc GJ Feuilloley and Nicole Orange

Address: Laboratory of Cold Microbiology, UPRES EA 4312, University of Rouen, 55 rue Saint Germain, 27000 Evreux, France

Email: Gaelle Rossignol - gaelle.rossignol@univ-rouen.fr; Annabelle Merieau* - annabelle.merieau@univ-rouen.fr;

Josette Guerillon - josette.guerillon@univ-rouen.fr; Wilfried Veron - wilfried.veron@etu.univ-rouen.fr;

Olivier Lesouhaitier - olivier.lesouhait@univ-rouen.fr; Marc GJ Feuilloley - marc.feuilloley@univ-rouen.fr; Nicole Orange - nicole.orange@univ-rouen.fr

* Corresponding author

Published: 30 October 2008

BMC Microbiol 2008, 8:189 doi:10.1186/1471-2180-8-189

Received: 14 January 2008

Accepted: 30 October 2008

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/189>

© 2008 Rossignol et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: *Pseudomonas fluorescens* is a ubiquitous Gram-negative bacterium frequently encountered in hospitals as a contaminant of injectable material and surfaces. This psychrotrophic bacterium, commonly described as unable to grow at temperatures above 32°C, is now considered non pathogenic. We studied a recently identified clinical strain of *P. fluorescens* biovar I, MFN1032, which is considered to cause human lung infection and can grow at 37°C in laboratory conditions.

Results: We found that MFN1032 secreted extracellular factors with a lytic potential at least as high as that of MF37, a psychrotrophic strain of *P. fluorescens* and the mesophilic opportunistic pathogen, *Pseudomonas aeruginosa*. We demonstrated the direct, and indirect – through increases in biosurfactant release – involvement of a phospholipase C in the hemolytic activity of this bacterium. Sequence analysis assigned this phospholipase C to a new group of phospholipases C different from those produced by *P. aeruginosa*. We show that changes in *PlcC* production have pleiotropic effects and that *plcC* overexpression and *plcC* extinction increase MFN1032 toxicity and colonization, respectively.

Conclusion: This study provides the first demonstration that a PLC is involved in the secreted hemolytic activity of a clinical strain of *Pseudomonas fluorescens*. Moreover, this phospholipase C seems to belong to a complex biological network associated with the biosurfactant production.

Background

Pseudomonas fluorescens is a ubiquitous Gram-negative bacterium frequently encountered in the environment. Naturally resistant to a wide range of antibiotics and disinfectants, this bacterium is commonly found in hospitals as a contaminant of cleaning solutions and even injectable material [1]. This bacterium is characterized by its very large genome, containing a large number of regulatory

genes conferring a very high potential to adapt to environmental variation [2]. *P. fluorescens* is generally considered psychrotrophic species, but the presence of this bacterium in hospitals has long been demonstrated [3]. The broad clinical spectrum of this bacterium, which may colonize the airways [4], urinary tract [5] and blood [6] of immunocompromised patients and previously healthy patients, demonstrates that human body temperature is not neces-

sarily a barrier to the development of this microorganism. These findings strongly suggest that different strains have evolved to deal with this specific environment [7]. Previous investigations of the infectious potential of *P. fluorescens* have demonstrated that this bacterium can bind specifically to the cytoplasmic membrane of neurons and glial cells [8]. Attachment to the cytoplasmic membrane of the host cell is associated with the induction of apoptosis and necrosis [9]. LPS has clearly been implicated in cytotoxicity, but other factors released along with LPS during cytoadhesion also seem to be essential for the virulence of this bacterium [10]. The virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia* sp. have been studied in detail, but little is known about those of *P. fluorescens* [11,12]. *P. fluorescens* bacteria synthesize and release various extracellular enzymes, including a protease [13] and a lipase [14], which may be involved in virulence. They also produce phospholipase C (PLC) [15-19] – an enzyme produced by many bacterial pathogens and associated with various levels of virulence [20]. The pathophysiological role of secreted PLCs depends on bacterial species, extending from that of a major virulence factor to a minor metabolic factor involved in bacterial survival or dissemination only, without cytotoxic effects [21,22]. However, the effects of PLCs may be more subtle. PLC interferes with eukaryotic cellular signaling cascades and seems to be able to modulate the host immune response [21]. Several members of the *Pseudomonas* family produce PLCs [21], and the PLCs synthesized by *P. aeruginosa* have been studied in detail [23]. The virulence potential of the PLCs of this bacterium has often been associated with hemolytic activity [24]. Conversely, our knowledge about hemolysin production by *P. fluorescens* remains very limited. The PLCs identified in this species to

date have essentially been studied biochemically, without considering their infectious potential.

We studied a recently identified strain of *P. fluorescens* (MFN1032) [7] with mesophilic behavior and hemolytic activity, comparing the cytotoxicity of the factors secreted by this clinical strain with those secreted by the environmental *P. fluorescens* strain MF37. We also included the opportunistic pathogen *P. aeruginosa* in the study, as a reference. We identified a phospholipase C (PLC) from MFN1032 and compared its amino-acid sequence with those of the PLCs produced by other *P. fluorescens* species and other Gram-negative and Gram-positive bacteria. We then evaluated the involvement of PLC in the hemolytic activity of MFN1032, by constructing *plcC* mutants.

Results

Characterization of the MFN1032 strain

MFN1032 has been isolated from the sputum of a patient suffering from pneumonia. This bacterium has been characterized as *P. fluorescens* biovar I by polyphasic taxonomy, partial 16sRNA sequencing and siderotyping [7]. Culturability studies demonstrated that this strain was able to grow (Figure 1A) and formed biofilms on polystyrene at 37°C. As PAO1, this bacterium shown strong beta-hemolytic activity on sheep, horse or rabbit blood-agar plates (Figure 1B), whereas strain MF37 was non-hemolytic. MFN1032 also displayed lecithinase activity on egg-yolk agar plates (Figure 1C).

Cytotoxic effects of bacterial culture supernatants

We assessed the cytotoxicity of supernatants from *P. fluorescens* MFN1032, *P. fluorescens* MF37 and *P. aeruginosa* PAO1 in two experimental models: LDH release from rat

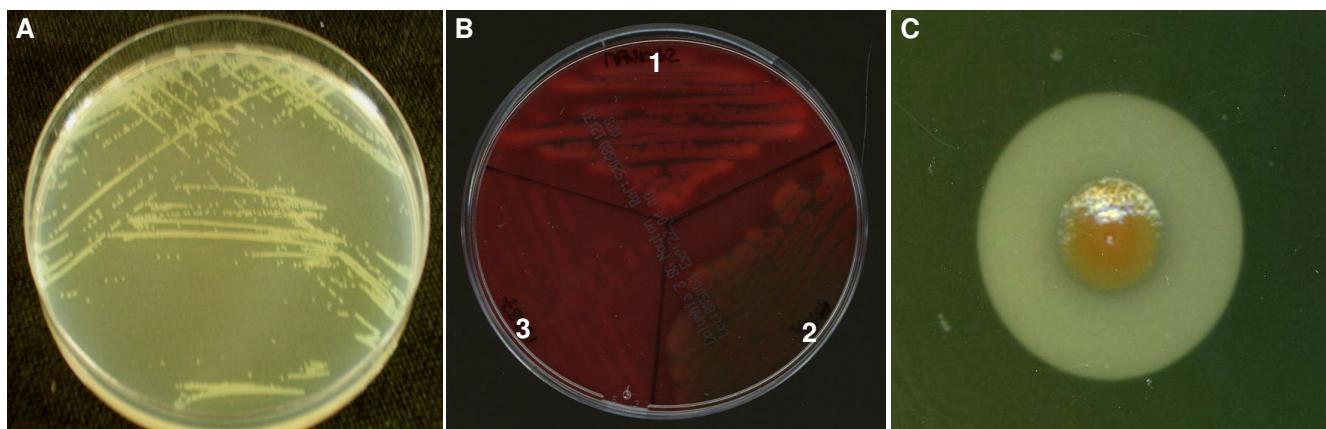


Figure 1

Growth and extracellular activities of MFN1032. **A-** Growth of MFN1032 on LB agar plates after 24 hours at 37°C. **B-** Secreted hemolytic activity of MFN1032 on sheep red blood agar plate after 48 hours of incubation at 28°C (1), and comparison with PAO1 (2) and MF37 (3). **C-** MFN1032 lecithinase activity on egg-yolk agar plate after 48 hours of incubation at 28°C.

glial cells and the hemolysis of sheep erythrocytes in a liquid assay.

We first investigated cytotoxicity in rat glial cells in primary culture, a model previously used to assess the cytotoxicity of *P. aeruginosa* and *P. fluorescens* [10]. Cell-free supernatants from stationary growth phase cultures were incubated overnight with primary cultures of rat glial cells. MFN1032 and MF37 supernatants were much more cytotoxic than those from the opportunistic pathogen PAO1 at all growth temperatures studied (Figure 2A). MFN1032 supernatants from bacteria grown at 17°C and 28°C were equally toxic (55% lysis), whereas those from bacteria grown at 8°C were less toxic (25% lysis). MF37 also displayed significantly higher levels of secreted cytotoxic activity against glial cells than PAO1 grown at 17°C or 28°C. This activity was clearly temperature-dependent, and was maximal at 17°C.

We monitored the levels of secreted hemolytic activity displayed by MFN1032 throughout bacterial growth. MFN1032 grown at 17°C displayed hemolytic activity only at the start of the stationary phase and similar profiles were observed at 8°C and 28°C. The kinetics of hemolysin production by PAO1 was investigated only at

37°C. Hemolytic activity appeared to be stable after 15 bacterial generations in culture, in all the cases. These conditions were therefore adopted in all subsequent studies. Major differences were observed in the hemolytic activities of supernatants from cultures of MFN1032, MF37 and PAO1 grown at 8, 17, 28 and 37°C (Figure 2B). Culture supernatants from MF37 grown at 8, 17 and 28°C were non hemolytic (no test was carried out at 37°C because this strain cannot grow at this temperature). Hemolysis levels for the clinical strain MFN1032 were maximal at growth temperatures of 8 and 17°C (100% and 83% lysis, respectively), and lower at 28°C (26% lysis). MFN1032 supernatants were non hemolytic if the bacteria were cultured at 37°C. MFN1032 and PAO1 supernatants had similar hemolytic potentials if the bacteria were grown at 17°C (90% hemolysis) or 28°C (25% hemolysis) (Figure 2B). The hemolytic activity of PAO1 supernatants was maximal at growth temperatures of 37°C (optimal growth rate) and 17°C. By contrast, the secreted hemolytic activity of the MFN1032 strain was not maximal at the optimal growth rate for this strain (30°C).

As the *P. fluorescens* clinical strain MFN1032 displayed hemolysis, we investigated the factors potentially involved in this hemolytic activity.

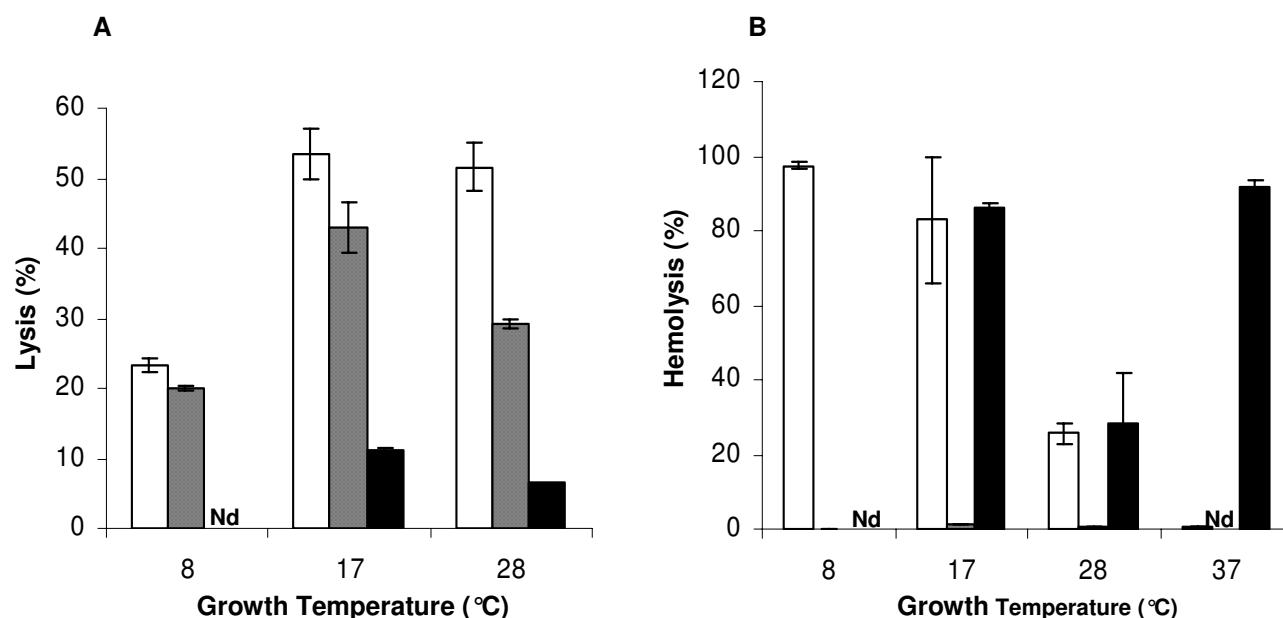


Figure 2
Effect of growth temperature on the cytotoxicity of MFN1032 (white square), MF37 (grey square), and PAO1 (black square). After 15 generations in LB medium, aliquots of cell-free supernatants were assayed for glial cell lysis (A) or hemolysis (B), as described in the materials and methods. For assays of glial cell cytotoxicity, supernatants were concentrated with an Amicon ultra-15 filter, and then resuspended in glial cell medium. Each experiment was performed at least three times in triplicate. Nd: not determined.

Measurement of protease activity, LPS and biosurfactant release and lecithinase activity in the supernatant

No protease activity or LPS release (KDO level) into the supernatants of MF37, MFN1032 and PAO1 cultured in LB medium at 28°C was detected (Table 1). We used egg yolk as a substrate for estimating PLC activity and biosurfactant release was assessed with the drop-collapse test. Both lecithinase activity and biosurfactant were detected in these three culture supernatants, although higher levels were observed for MFN1032 and PAO1 than for MF37 (Table 1).

Effect of D609 on the secreted hemolytic activity of MFN1032

We investigated the possible involvement of a secreted PLC in the hemolytic activity of MFN1032 using D609, which specifically inhibits certain PLCs [25]. Supernatants from MFN1032 were incubated at room temperature for 1 h with D609 at a final concentration of 1 mM, and their hemolytic activity was then assessed. Incubation with D609 decreased hemolytic activity by 68% (Table 2). Thus, a phospholipase C sensitive to D609 is clearly involved in the hemolytic activity of MFN1032. By contrast, D609 treatment did not decrease the hemolytic activity of PAO1 supernatants, consistent with previous results [26].

Structural characterization of the PLC from MFN1032

SDS-PAGE and zymograms were used to determine the apparent molecular mass of an enzyme with lecithinase activity. A single band with lecithinase activity was recovered from a silver-stained SDS-PAGE gel placed on an egg-yolk agar plate (Figure 3). This protein had a molecular mass of approximately 42 kDa. We designed PCR primers based on the gene encoding a PLC of similar molecular mass described by Preuss *et al.* and produced by an uncharacterized *P. fluorescens* strain [15]. A single fragment of 1.2 kb was obtained and cloned with the pMOS kit. This fragment was sequenced by Genome Express (France) and the sequence registered in the Genbank database (accession number: [DQ462712](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ462712)) named *plcC*. This sequence encodes a predicted PlcC protein of 385 residues, with a molecular mass of 42 kDa. These findings are consistent with SDS-PAGE and suggest that the protein is secreted without cleavage. *In silico* analysis indicated the absence of any known secretion signal sequence. No gene

Table 2: Effect of D609 on the secreted hemolytic activities of MFN1032 and PAO1

Strain	D609	% Hemolysis	
		-	+
MFN1032		92 ± 1	30 ± 3
PAO1		86 ± 1	85 ± 2

amplification was obtained if the same primers were used with MF37 and PAO1 (data not shown).

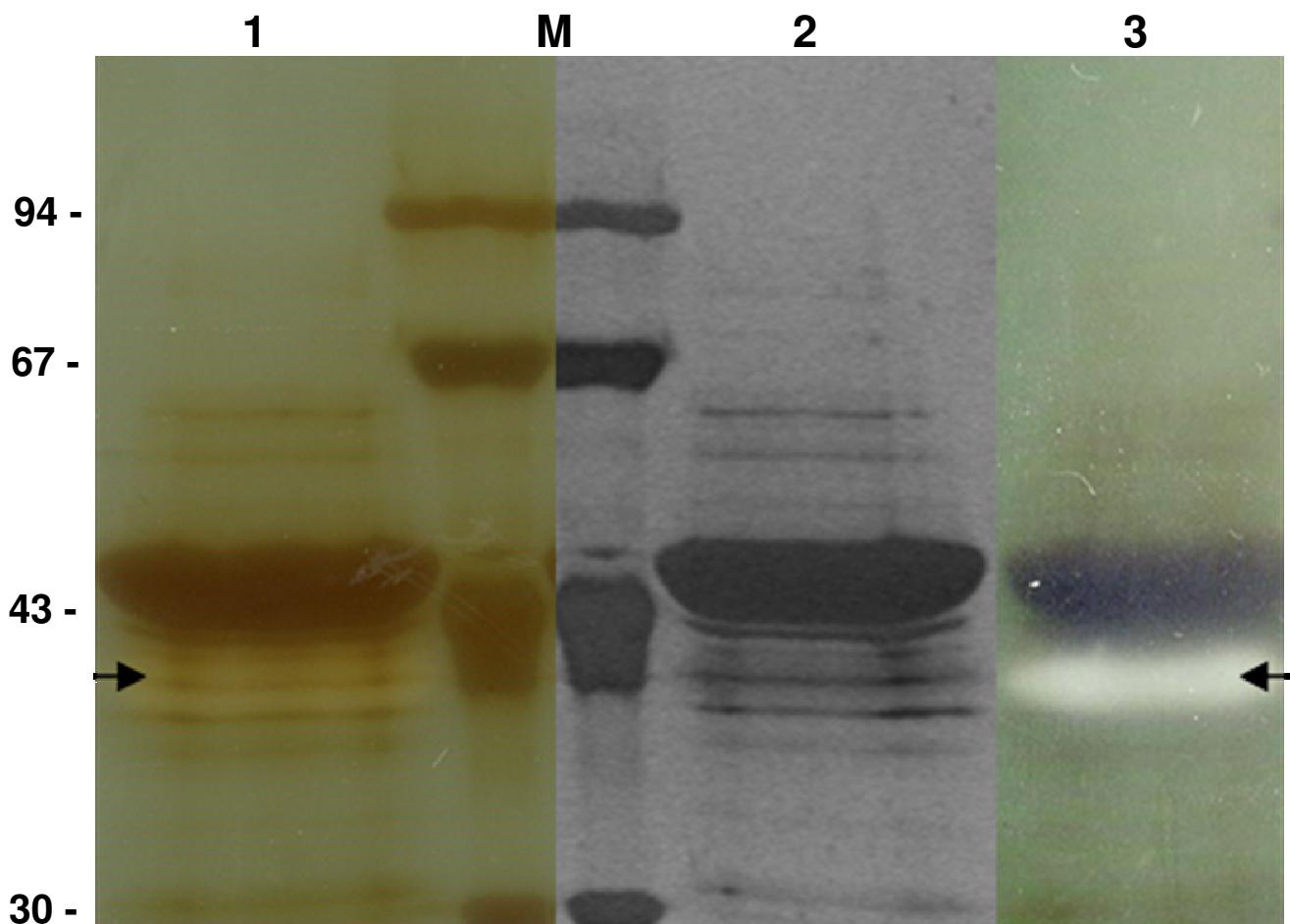
A search of the NCBI nucleotide and protein database showed that the PLC from MFN1032 (PlcC) was very similar to putative PLCs from other strains of *P. fluorescens* (Table 3). The molecular mass of this group of PLCs ranges from 42 kDa to 59 kDa. PlcC is clearly related to the PLC described by Preuss *et al.* (98% identity), which was produced by a *P. fluorescens* strain isolated as a contaminant of placental extract of unknown origin. These two PLCs are also very similar to a putative PLC encoded by the *P. fluorescens* SBW25 genome (92% identity), but are more distantly related to the putative PLCs identified for the Pf-5 strain – a rhizosphere strain of *P. fluorescens* (76% identity) – and Pf0-1 (65% identity). Sequence identity was also observed with putative PLCs from the entomopathogen *Pseudomonas entomophila* (68%) and from *Legionella pneumophila*, although the level of identity was lower (43%). No significant similarity was observed with the PLCs produced by *P. aeruginosa* (PlcH, PlcN and PlcB) or with the PC-PLC from *B. cereus* (Table 3).

Construction of MFN1032 *plcC* mutants

The MFN1036 strain, a clone of MFN1032 that overexpresses *plcC*, was obtained by electroporating MFN1032 with pUCP20, which carries the *plcC* gene and its promoter (1.5 kb). The expression of *plcC* from this plasmid was under the control of the constitutive *plac* promoter. We investigated the involvement of PlcC in hemolytic activity by culturing MFN1036 at 17°C and 28°C and assessing its hemolytic activity in liquid assays. MFN1036 was significantly more cytotoxic (74% lysis at 28°C) than the parental strain MFN1032 (26% lysis at 28°C) (Table 4). We used a *plcC*-deficient mutant, MFN1037, to determine whether PlcC contributed to the hemolytic activity of MFN1032. We detected no hemolysis with MFN1037 culture supernatants, regardless of growth temperature (Table 4). Complementation of the *plcC* mutation with pMF36 (strain MFN1038) did not restore the hemolytic phenotype of MFN1032 (Table 4), whereas it did result in levels of lecithin degradation on egg-yolk agar plates similar to those for the wild-type strain.

Table 1: Release of protease, LPS, lecithinase and biosurfactant into LB supernatants after growth at 28°C: (+: detection, -: no detection).

Strain	Protease	KDO	Lecithinase	BS
MFN1032	-	-	++	++
MF37	-	-	+	+
PAO1	-	-	++	++

**Figure 3**

Zymogram on egg-yolk agar of a silver-stained SDS-PAGE gel of MFN1032 supernatant. PLC activity was detected as an opaque band on the plate (arrow), the molecular mass of which was deduced. Concentrated MFN1032 supernatant was obtained following growth at 17°C in LB medium. **1:** Front of a silver-stained gel placed on an egg-yolk agar plate (zymogram); **2:** corresponding silver-stained gel; **3:** other side of the zymogram; **M:** molecular size markers.

SDS-PAGE analysis of total extracellular proteins followed by PlcC zymogram detection on egg-yolk agar plates showed that there was no PlcC in the supernatant of cultures of the *plcC*-deficient mutant MFN1037, as no lecithin degradation was observed (Figure 4, lane 2 and 5, arrow a). The mutant released smaller amounts of an approximately 50 kDa protein than did MFN1032 (arrow b). Analysis of the amino-acid sequence of the N-terminus of this protein (ALTVNTNIAS) suggested that it was a homolog of the flagellin protein FlcC produced by *P. aeruginosa* and *P. putida*. The *plcC*-complemented strain MFN1038 displayed wild-type levels of lecithin degradation in zymogram analysis and a partial restoration of flagellin levels (Figure 4, lanes 3 and 4, bands a and b respectively). MFN1036 had an electrophoretic profile identical to that of MFN1032, except for the 42 kDa pro-

tein previously identified as PlcC, which was produced in larger amounts by MFN1036 (data not shown).

Pleiotropic effects of *plcC* gene mutation

Flagellin levels in the supernatant of the *plcC*-deficient strain MFN1037 were low. We therefore investigated the motility of the MFN1032 and the *plcC* mutants. In swimming conditions (i.e. 0.3% agar, final concentration), MFN1036 completely invaded the plate over the course of a 16 h incubation at 28°C and displayed swarming motility, whereas MFN1032 displayed only swimming motility and diffused less (Figure 5B and 5A, respectively). This may be due to higher levels of biosurfactant release or production, than observed for the wild-type strain, as suggested by the translucent appearance of the halo on the plates. This hypothesis was confirmed by the drop-col-

Table 3: Comparison of the sequence of the MFN1032 PlcC with other PLC sequences

Strain	PLC (ID Protein number)	% Identity to PlcC	Amino-acid residues	MW (kDa)
P. fluorescens MFN1032	PlcC (GI 92090692)	-	385	42
P. fluorescens (Pf0-1)	- (GI 11611250)	98%	385	42
P. fluorescens SBV25	Putative	92%	383	42
P. fluorescens Pf5	Putative (GI 68342549)	76%	546	59
P. entomophila	Putative (GI 104780281)	68%	544	60
P. fluorescens Pf0-1	Putative (GI 77380231)	65%	437	48
L. pneumophila	PlcA (GI 52627367)	43%	423	48
P. aeruginosa	PlcH (GI 15596041)	NS	730	79
P. aeruginosa	PlcN (GI 9949449)	NS	692	78
P. aeruginosa	PlcB (GI 9945846)	NS	328	37
B. cereus	PC-PLC (GI 28414376)	NS	283	28,5

NS: not significant

lapse test (Table 5). The *plcC*-deficient mutant MFN1037 and the complemented strain MFN1038 (not shown) had swimming motility patterns similar to those of MFN1032 (Figure 5C), but did not produce biosurfactant on LB agar plates, as shown by the drop-collapse test (Table 5). In motility assays on LB plates containing 0.6% agar, MFN1037 and MFN1038 had no swarming motility and no movement was observed even after 40 h of growth at 28°C, whereas MFN1032 continued to be motile (Figure 5D and 5C, respectively).

The loss of biosurfactant production may be enough, in itself, to account for the loss of swarming motility of the *plcC*-deficient strain, but cannot account for the low levels of flagellin release. Electron microscopy analyses of MFN1032 and MFN1037 cells showed that the wild-type strain had a single polar flagellum whereas the *plcC*-deficient strain MFN1037 displayed a hyperflagellated phenotype, with most of the cells presenting three polar flagella (Figure 6A and 6B, respectively). No difference in flagel-

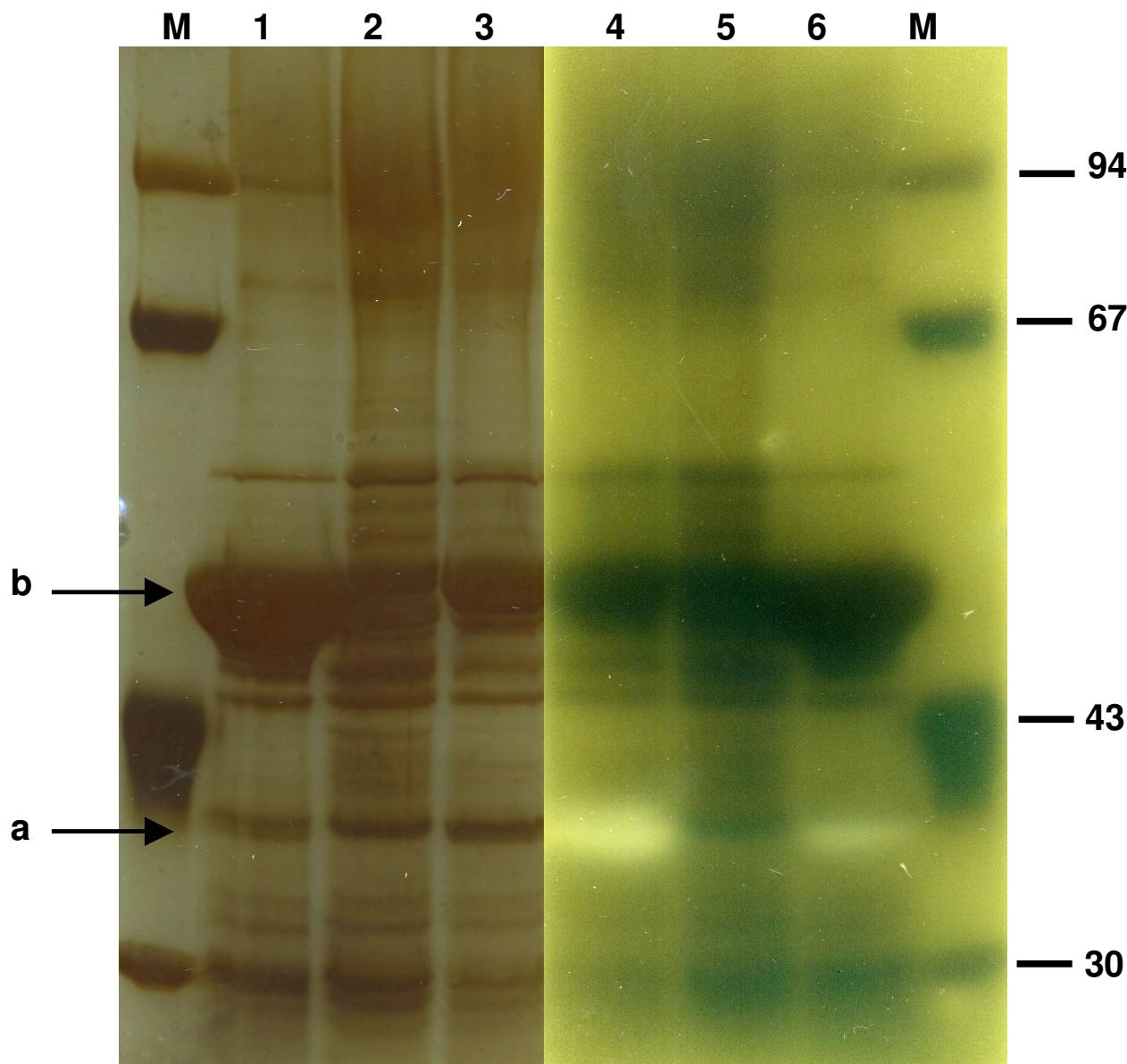
lum size was observed, but these differences in flagellation would probably affect the properties of the two strains. MFN1037 cells formed aggregates on the grid, whereas MFN1032 cells did not, despite having been prepared in the same conditions. Adhesion was evaluated by analyzing biofilm formation on polystyrene microarrays at 37°C. We found that MFN1037 had a greater capacity to form biofilms than the wild-type strain (255 ± 32% more adhesion than MFN1032 at 37°C; Figure 6C).

Analysis of the flanking regions of *plcC*

We investigated the genomic organization of the genes encoding PLCs in the genomes of *P. fluorescens* Pf0-1 and Pf5. We identified two genes of unknown function in the operon containing the *plc* gene in Pf0-1, and one in Pf5 (Figure 7). We found no other gene in an operon with *plcC* in MFN1032, confirming that the pleiotropic effects of *plcC* disruption could not be due to a polar mutation. No gene encoding a potential flagellin or belonging to the flagellar regulon were found in the surrounding region. A gene encoding a putative dihydropycolinate synthase was found in the 5' flanking region of *plcC*, in an antisense orientation. In the 3' region, a similar phenomenon was observed, except that the gene encoded a putative transcriptional regulator of the GntR family [27]. This regulator is probably involved in *plcC* expression because the consensus GntR binding site (T.GT-N(0-3)-AC.A), as identified by Rigali *et al.* [27], is present in the sequence immediately upstream from the *plcC* gene.

Table 4: Comparison of the secreted hemolytic activities of MFN1032 and the *plcC* mutants at various growth temperatures

Growth Temperature (°C)	8	17	28
Strain	% Lysis		
MFN1032	98 ± 1	83 ± 17	26 ± 3
MFN1036	Nd	100 ± 2	74 ± 13
MFN1037	2 ± 1	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.2
MFN1038	2 ± 1	0.4 ± 0.1	1 ± 0.2

**Figure 4**

SDS-PAGE of total extracellular proteins of MFN032 and the PlcC mutants MFN1037 and MFN1038. Supernatants of cultures at 17°C in LB medium were concentrated on an Amicon ultra-15 filter and subjected to SDS-PAGE in a 10% acrylamide gel. The gel was silver-stained (lanes 1 to 3) and placed against an egg-yolk agar plate (lanes 4 to 6) to reveal lecithinase activity (the opaque band on the plate). **1** and **6**: MFN032; **2** and **5**: MFN1037 (plcCdeficient MFN1032); **3** and **4**: MFN1038 (plcCcomplemented MFN1037). **M**- molecular size markers. **a**: PlcC; **b**: flagellin.

Discussion

P. fluorescens is generally considered to be non pathogenic, but its infectious potential has nonetheless been demonstrated. *In vitro* studies of environmental strains, including *P. fluorescens* MF37, have shown that this psychrotrophic bacterium has most of the features of an opportunistic pathogen [8]. *P. fluorescens* is a highly heterogeneous species, ranging from avirulent strains that can be used in

crop protection [28] to clinical strains involved in lung, urinary tract and blood infections. However, whereas the low virulence of industrial strains has been studied in detail, the factors involved in the virulence of clinical forms of *P. fluorescens*, including MFN1032, have not previously been investigated. Virulence results from the combined effects of direct contact between the bacterium and the target cell and the production of many soluble or

Table 5: Evaluation of biosurfactant release into culture supernatants by the drop-collapse test

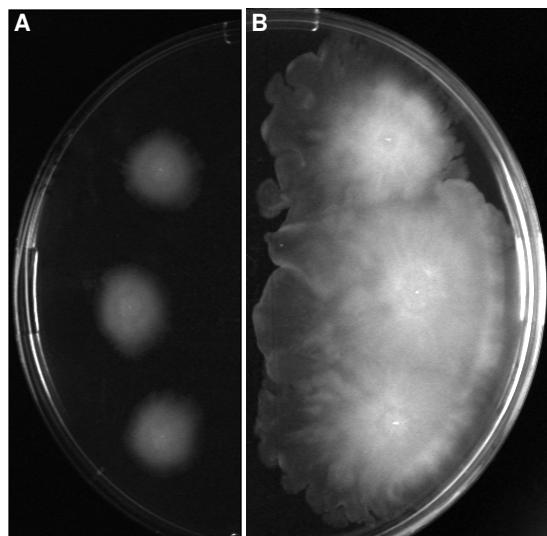
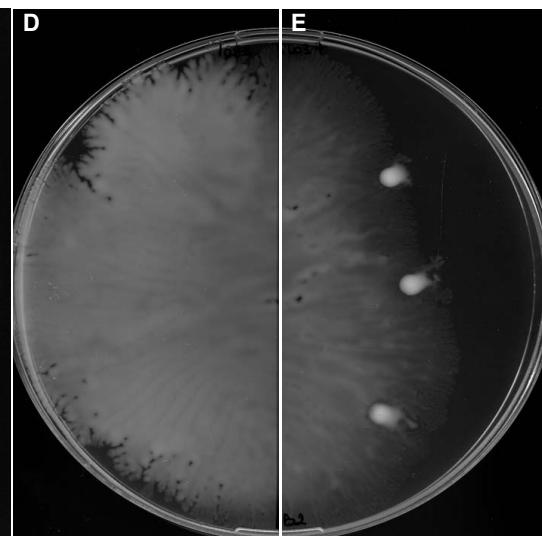
Strain	BS Production
MFN1032	++
MFN1036	+++
MFN1037	-
MFN1038	-

+: detection; -: no detection

secreted molecules and exotoxins acting at some distance from the microorganism. MFN1032 has been shown to be highly cytotoxic *in vitro* to eukaryotic cells, to which it binds [7]. We investigated the role of factors secreted by this bacterium in cytotoxicity. We therefore carried out experiments with supernatants and culture medium extracts only.

In addition to its ability to multiply at 37°C, which is itself unusual for a strain of *P. fluorescens*, MFN1032 generated molecules with high levels of hemolytic and cytotoxic activity, as observed in *in vitro* models. The hemolytic activity of MFN1032 supernatants was similar to that of *P. aeruginosa*, which is an opportunistic pathogen. By contrast, a typical psychrotrophic strain, MF37,

displayed no hemolytic activity under the same conditions. More surprisingly, MFN1032 supernatants were significantly more cytotoxic to rat glial cells than PAO1 supernatants, for bacteria grown at 17°C and 28°C. The secreted hemolytic and cytotoxic activities of *P. fluorescens* MFN1032 and *P. aeruginosa* PAO1 appeared to be temperature-dependent, as was *P. fluorescens* MF37 cytotoxicity. Surprisingly, the supernatant of MFN1032 grown at 37°C displayed no hemolysis. At first glance, this finding appears to contradict the hypothesis that hemolysis is a virulence factor. Low temperature induction likely reflects the evolutionary history of the factors involved in this activity and the function of those elements in non-infective conditions. In fact, it has been described that *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and non-clinical environments are genetically and functionally similar [29,30]. So evolution of virulence determinants in opportunistic pathogens is not necessarily linked to their interaction with the human host. Finally, invasin and the heat-stable enterotoxin Yst from *Y. enterocolitica* are also virulence factors produced preferentially at temperatures below 37°C *in vitro*. However, in conditions of slight acidity or high osmolarity, these virulence genes are expressed at 37°C *in vitro*. High-temperature repression may therefore be overcome by other conditions stimulating expression in the host.

LB 0.3% agar (swimming)**LB 0.6% agar (swarming)****Figure 5**

Motility assays for MFN1032, MFN1036 and MFN1037. The swimming motility of MFN1032 (A), MFN1036 (B) and MFN1037 (C) on 0.3% LB agar plates and the swarming motility of MFN1032 (D) and MFN1037 (E) on 0.6% LB agar plates after 16 h of incubation at 28°C. MFN1032 (wild type) and MFN1037 (plcG-deficient MFN1032) presented concentric halos on 0.3% agar, corresponding to swimming motility, whereas MFN1036 (plcG-overexpressing MFN1032) displayed a dendritic pattern indicative of swarming motility. The same pattern of MFN1037 motility was obtained with strain MFN1038 (data not shown).

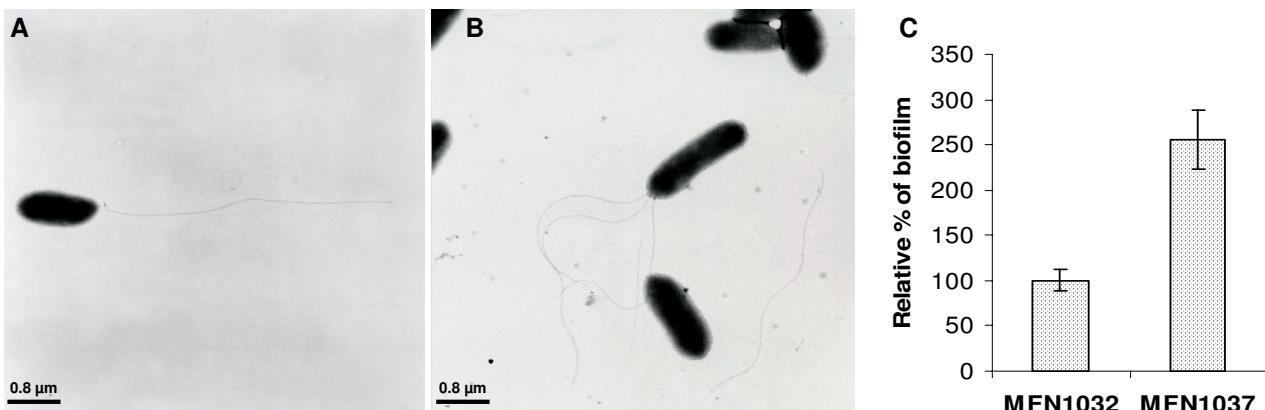


Figure 6
Transmission electron microscopy (TEM) of MFN1032 (A) and MFN1037 (B) cells. (C) Biofilm quantification of MFN1032 and MFN1037 after 24 h of growth at 37°C in a polystyrene microtiter plate. Biofilm formation was quantified as the percentage relative to that observed with MFN1032 grown at 37°C.

We found that neither protease nor LPS was responsible for the extracellular hemolytic activity of MFN1032. The absence of protease activity in these conditions was not surprising, as protease activity has been recovered from *P. aeruginosa* PAO1 only after at least 18 h of growth in LB medium and has never been observed with *P. fluorescens* MFO in this medium [13]. Many pathogens display secreted hemolytic activity, which may be due to toxins, biosurfactants, and/or enzymes (essentially PLCs) [31]. Various species of *Pseudomonas* have been reported to produce hemolytic and/or non hemolytic PLCs [16,21,32]. The observed degradation of lecithin by MF37 on plates or in supernatants is consistent with this bacterium producing a non hemolytic PLC other than PlcC, as no gene amplification was observed with *plcC* primers. By contrast, the PLC produced by MFN1032 is involved in the

hemolytic activity of this strain, as shown by the inhibitory effect of D609.

A protein with lecithinase activity was identified in MFN1032 supernatants by an egg-yolk agar plate zymogram method. This enzyme has a molecular mass of 42 kDa, as determined by SDS-PAGE. This apparent molecular mass is similar to that of previously described *P. fluorescens* PLC enzymes [15,16,18] and those of the putative PlcB [33] and PlcA produced by *P. aeruginosa* (Vasil *et al.*, data communicated at the *Pseudomonas* Congress, 2005). The PlcH and PlcN produced by *P. aeruginosa* have a higher molecular mass [23].

Analysis of the sequence of the *plcC* gene indicated considerable similarity between PlcC and putative PLCs identi-

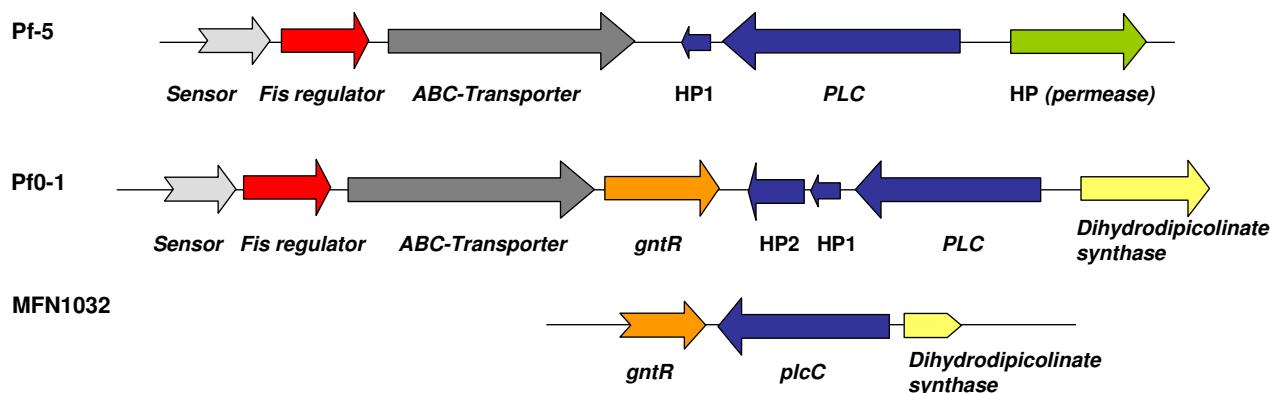


Figure 7
Genomic organization and flanking regions of the *plcC* gene from MFN1032 and the putative phospholipase C genes in *P. fluorescens* Pf0-1 and Pf5. HP: hypothetical protein

fied in various strains of *P. fluorescens* including, in particular, the PLC produced by a *P. fluorescens* isolated from placental extract [15] and the putative PLC from SBW25. This *plcC* gene was shorter than those predicted for Pf0-1 and Pf5, and the main difference between the protein encoded by this gene and Pf0-1 and Pf5 concerned the N-terminus of the protein. It is unclear whether *plc* genes are expressed in the other strains and it is possible that PLC production is not specific to adaptation to human infection but was acquired to survive in other environments.

No significant sequence similarity was found between the group of PLCs described here and the well characterized zinc-metallophospholipases C of Gram-positive bacteria. This group of PLCs is also only very distantly related to the enzymes described by Stonehouse *et al.*, including the PlcH and PlcN of *P. aeruginosa* [26]. The differences between these enzymes concern not only their sequences, but also their catalytic sites, as D609 has no effect on PlcH activity [26]. The PlcC from MFN1032 also appears to be different from PAO1 PlcB and PlcA [33]. Thus, although *P. fluorescens* and *P. aeruginosa* are generally thought to be closely related, they have different PLCs. Preuss *et al.* reported an elegant, detailed biochemical characterization of their PLC. Their data concerning iron requirement and D609 susceptibility suggested the existence of a new class of PLCs, to which MFN1032 PlcC might belong.

Neither PlcC nor the PLC studied by Preuss *et al.* has a signal peptide. These enzymes are therefore presumably secreted by an unknown mechanism, whereas most PLCs are secreted by the Tat or Sec pathways [33-35]. Several phospholipases have been reported to belong to the flagellar regulon [36] and to be secreted by the flagellar export apparatus [37,38], a type-three secretion system [39], or by the two-partner secretion (TPS) system [40]. For example, the transcription and secretion of YpIA, the phospholipase A₁ of *Yersinia enterocolitica*, are controlled by the flagellar regulon [37]. Warren *et al.* suggested that an amino-terminal secretion signal of about 20 amino acids is required for YpIA secretion, but did not identify a particular signal peptide motif [41]. Some PLCs have been shown to be regulated by the flagellar regulon, but no evidence has ever been published to suggest that PLCs may affect the expression of this regulon. There is no evidence to suggest that the PlcC of MFN1032 is secreted by the flagellar apparatus, but the lower levels of flagellin in the supernatant of the *plcC*-deficient mutant than in the supernatant of the control or complemented strain implies a close link between these two proteins. This hypothesis is supported by *in silico* analysis, which identified a cluster of orthologous groups (COG) corresponding to a flagellar hook motif in PlcC. It should be noted that the lower levels of flagellin do not indicate the lack of flag-

ella. The mutant displayed swimming motility and TEM observations of MFN1037 cells confirmed that flagella were present.

We constructed a *plcC*-overexpressing mutant of MFN1032, MFN1036, to investigate the involvement of PlcC in hemolytic activity and we found that a higher level of PlcC production by MFN1032 was associated with higher levels of hemolytic activity. The loss of hemolytic activity in the *plcC*-deficient strain MFN1037 confirmed the involvement of this enzyme in hemolysis. Hemolytic activity was not restored in the MFN1038 strain, which overexpressed *plcC*, and extinction of the *plcC* gene had also pleiotropic effects, particularly as concerns the release of biosurfactant and flagellin. This was not due to a polar mutation involving *plcC* gene interruption, as the *plcC* gene was not associated with any other gene in an operon in the MFN1032 genome. Linares *et al.* described that the presence of low antibiotics concentrations in the culture media may induce changes in bacterial physiology (biofilm, motility and cytotoxicity) [42]. Their data could explain the phenotype change of the *plcC* mutant MFN1037, but we were not in conditions used by these authors (i.e subinhibitory concentrations of antibiotics). We probably disturb a complex regulatory network in MFN1037, and this hypothesis is also supported by *plcC* overexpression in MFN1036 resulting in the overproduction of biosurfactants, increasing swarming mobility.

Such complex regulatory systems often involve positive and/or negative feedback loops [43]. GntR regulators have been reported to maintain their own expression [44], so a positive feedback loop regulating GntR levels may exist. As previously reported, a simple change affecting a key element of this kind of system might lead to epigenetic modification [45]. Epigenetic switches, corresponding to phenotype modifications, arise and may be transmitted from a cell to its progeny in the absence of genetic modifications. This type of regulation has been reported for the cytotoxicity associated with the T3SS (type-three secretion system) of *P. aeruginosa*. Transient expression of the ExsA transcriptional regulator in non inducible strains leads to the acquisition of a cytotoxic phenotype [46]. The artificial extinction of *plcC* in MFN1037 may have triggered such an epigenetic switch.

Conclusion

These findings demonstrate that some *P. fluorescens* strains have some of the key characteristics of opportunistic pathogens. We provide the first demonstration, to our knowledge, of the involvement of a PLC in the secreted hemolytic activity of a clinical strain of *P. fluorescens* (MFN1032). We found that MFN1032 secretes a phospholipase C homologous to a PLC from an uncharacterized *P. fluorescens* strain previously studied biochemically

by Preuss. This enzyme belongs to a new group unrelated to the PLCs produced by *P. aeruginosa* and seems to be produced by a wide range of *P. fluorescens* strains, although no homolog of the *plcC* gene was found in our model strain, MF37. Further studies including strains of different origins presenting hemolytic activity would clarify these observations. However, although PlcC is not specific to clinical isolates, this enzyme is a potential virulence factor as our data show that this enzyme is directly involved in the secreted hemolytic activity of MFN1032, as demonstrated by the inhibitory effect of D609. The direct involvement of PlcC in MFN1032 virulence could be further demonstrated or excluded by studying *in vivo* models.

Results obtained with the *plcC* mutants also suggest that this enzyme interferes with biosurfactant production, which might also account for the higher levels of hemolysis observed when *plcC* was overexpressed. The pleiotropic phenotype resulting from *plcC* mutation or overexpression suggests that PlcC is involved in a regulatory network. We are now investigating a possible role for the 3' flanking region of *plcC*, corresponding to the putative transcriptional regulator GntR, with the aim of determining the link between PlcC, GntR and biosurfactant production.

Methods

Bacterial strains and culture conditions

The MFN1032 strain was collected from a patient suffering from pulmonary tract infection (expectoration) at a hospital in *Haute Normandie*. This strain was the only bacterial contaminant in a normally sterile compartment and was considered to be the cause of the infection. MFN1032 was identified as a *P. fluorescens* biovar I strain [7]. PAO1 is a *P. aeruginosa* strain widely used in laboratory studies [47]. MF37 is a spontaneously rifampicin-resistant mutant of the MFO strain, a psychrotrophic strain of *P. fluorescens* isolated from unpasteurized milk extensively studied in our laboratory [48]. These bacteria were cultured in Luria Bertani medium (LB), at various temperatures between 8 and 37°C, with shaking at 180 rpm. When necessary, 500 µg/mL mezlocillin or 40 µg/mL tetracycline was added. Bacterial density was determined by measuring optical density at 580 nm (Spectronic 601 spectrophotometer).

Glial cell cytotoxicity assays

Cytotoxicity was assessed by quantifying lactate dehydrogenase (LDH) release into the medium by cells, as this release reflects levels of necrosis. Concentrated supernatants (10 µL/mL culture medium) from bacterial cultures at various temperatures were incubated overnight with rat glial cells (8×10^6 cells/mL) that had been cultured *in vitro* for 12 days. Controls included LB concentrated with Ami-

con Ultra-15 centrifugal filter units and incubated for the same period of time in culture medium for glial cells. The Cytotox 96® enzymatic assay (Promega, France) was used to quantify necrosis by measuring LDH release into the culture medium. The percentage total lysis was calculated as follows: $\% = [(X-B)/(T-B)] \times 100$, where B (baseline) is a control corresponding to LDH spontaneously produced by glial cells incubated with concentrated LB (10 µL/mL culture medium), T is a positive control (100%) corresponding to the amount of LDH detected in the culture medium after total lysis of the cell population by Triton X-100 (9% (v/v) in water) treatment and X is the amount of LDH detected in the culture medium of the sample tested. The assay was sensitive enough to measure LDH concentrations equivalent to the lysis of 1% of the cell population.

Hemolysis assays

The hemolytic potentials of bacterial culture supernatants were measured by a technique derived from that described by Dacheux *et al.* [49]. Briefly, sheep erythrocytes obtained from Eurobio (France) were washed three times in PBS (pH 7.2, 0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.17% Na₂HPO₄, 0.8% KH₂PO₄) and resuspended in RPMI-1640 medium (Sigma) to a final concentration of 2% (cell volume/medium volume). Bacteria were grown in LB, and the enzymatic activity of the culture supernatant was assessed. Samples were obtained from bacteria cultured at various temperatures (8, 17, 28 or 37°C) for 15 generations. The bacterial cultures were centrifuged and the supernatants collected and sterilized by passage through a Millipore filter with 0.22 µm pores. For hemolysis assays, we combined 600 µL of a 2% suspension of red blood cells (RBCs) with 600 µL of filtered supernatant and incubated this mixture for 2 h at 37°C. The suspension was centrifuged at 10,000 g for 8 min at 4°C, and hemoglobin release was assessed by determining absorbance at 540 nm. The percentage (%) of cells lysed was calculated as follows: $\% = [(X-B)/(T-B)] \times 100$. B (baseline) is a negative control corresponding to RBCs incubated with 600 µL sterile LB and T is a positive control corresponding to the total lysis obtained by incubating RBCs in LB supplemented with 0.1% SDS (final concentration). X is the absorbance value for the sample analyzed. All experiments were performed at least three times in triplicate. D609 was obtained from Sigma and used at a final concentration of 1 mM.

Protease and LPS assays

Protease assays were carried out with supernatants from bacteria cultured for 15 generations, as described by Heilio *et al.* [13]. LPS levels were quantified by determining 2-keto-3-deoxyoctulonic acid (KDO) concentration, as described by Karkhanis *et al.* [50].

Biosurfactant production

Biosurfactant production was assessed by the drop-collapse test mainly as described previously [51]. Drops of Volvic water were dispensed into a Petri dish with a polystyrene platform. Drops of culture supernatant were added to the drops of water. If the culture broth contained biosurfactant, the droplets of water collapsed.

Gel electrophoresis conditions, zymogram methods and amino-acid sequencing

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out as described by Laemmli [52]. For a zymogram on egg-yolk agar, a silver-stained SDS-PAGE gel was washed three times in water and placed directly on an egg-yolk agar plate. After overnight incubation at 37°C, lecithinase activity was detected as an opaque band corresponding to lecithin hydrolysis. For N-terminal amino-acid sequencing, the supernatant proteins were transferred to PVDF membranes and subjected to Edman degradation in an Applied Biosystems 492 automated protein sequencer.

Motility assays

Motility assays were performed as described [53], with light modifications. Each strain was incubated on LB agar plates for 24 h at 28°C. Plates of LB medium solidified with 0.3% agar (for the assessment of swimming motility) were inoculated by stabbing colonies with a toothpick and inserting the end of the toothpick just below the surface of the agar. Three colonies were picked from three plates and incubated at 28°C until a migration halo appeared. We then spotted 5 µL of 3 independent suspensions of each strain onto LB medium plus 0.6% agar (swarming motility) and the plates were incubated until a migration halo appeared.

Static biofilm assay and quantification

Biofilm assay was adapted from the method of O'Toole and Kolter [54]. Bacteria were plated on LB agar plates and incubated for 24 h at 28°C. Three independent LB suspensions of each strain were adjusted to an OD₅₈₀ of 0.4. We added 100 µL aliquots of each suspension to the wells of 96-well microtiter plates, at least in triplicate. The negative control consisted of LB broth without bacteria. Plates were incubated for 24 h at 37°C without shaking. The bacterial cells bound to the wall of the wells were then stained with 0.1% crystal violet and the remaining crystal violet was then quantified by treatment with 150 µL of 1% SDS and the determination of absorbance at 595 nm with a microtiter plate reader (Model 680XR, Biorad).

Electron microscopy

Early exponential growth phase bacteria were fixed by incubation in an equal volume of modified Karnofsky buffer (2.5% glutaraldehyde, 1% paraformaldehyde in

0.15 M sodium cacodylate buffer) at least 10 minutes and washed in phosphate buffer (0.1 M; pH 8). Nickel-coated copper grids (200 mesh) were floated on a drop of washed bacteria, rinsed in ultrapure grade water, and negatively stained with 0.5% (wt/vol) phosphotungstic acid (5 to 10 s). Electron microscopy was performed with a Philips CM10 transmission electron microscope.

Oligonucleotides and polymerase chain reactions

Five colonies of each strain were suspended in 600 µL sterile ultrapure water. The suspension (1 µL) was then used for PCR with template DNA from bacterial colonies. PCR was carried out in a 50 µL reaction volume, in a GeneAmp PCR system 2400 (Perkin-Elmer Corporation, USA). Each reaction mixture contained DNA template, 1.25 µL *Taq* polymerase (GMP grade, Roche Diagnostics GmbH, Germany), *Taq* PCR buffer (GMP grade, Roche Diagnostics GmbH, Germany), 0.2 µL primers and 125 µM of each deoxyribonucleoside triphosphate. After initial denaturation for five minutes at 94°C, the reaction mixture was subjected to 30 cycles of 1 minute at 94°C, 30 s at 54°C and 1.5 minutes at 72°C, followed by a final 7-minute extension at 72°C. The primers used for PCR were purchased from Proligo (France). The complete *plcC* gene sequence (approximately 1.2 kb) was amplified with PLC1 (5'-ATGTCAGGTCTTGAACTCGCA-3') and PLC2 (5'-TTAGTTGGCGGGTTGGTT-3'). The use of PLC0 (5'-GGTGGAAATCACCTGG-3') with PLC2 amplified the *plcC* gene and its promoter (approximately 1.5 kb). GntR (5'-CCGAGTCGGCGATCATG-3') was used with PLC (5'-GCAAGGACGTCAACGATTG-3') to amplify the 3' flanking region of *plcC*.

Sequence determination and analysis

The 1.2 kb or 1.5 kb PCR fragment was isolated with a DNA gel extraction kit (Genomics/Millipore) and cloned with the pMOSBlue Blunt-ended Cloning Kit (Amer sham/Biosciences). MOS cells were transformed and, after blue/white colony screening, clones were picked and plasmid DNA was isolated with the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Plasmids were checked by digestion with *Hind*III/*Ava*I and sequenced by Genome Express (France). The predicted protein sequence of MFN1032 PlcC was for BLAST queries <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Construction of a *plcC*-overexpressing MFN1032 clone: MFN1036

The 1.5 kb PCR fragment was inserted into the pMOSBlue vector. The 1.5 kb *Ava*I/*Hind*III fragment was then transferred to the pUCP2O shuttle vector to construct pMF36 [55]. MFN1032 was electroporated with pMF36. Positive colonies were selected based on mezlocillin resistance and lecithin degradation on an egg-yolk agar plate. Clones were checked by plasmid DNA isolation with the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), followed by enzymatic diges-

tion. The strain obtained, MFN1036, was cultured in LB with a final concentration of 500 µg/mL mezlocillin.

Construction of a *plcC*-negative mutant, **MFN1037**, and the complemented **MFN1038** strain

*Eco*RI/*Hind*III digestion of the 1.2 kb PCR fragment generated a 1 kb fragment corresponding to a 3'-deleted *plcC* gene. This fragment was inserted into the transferable suicide plasmid pME3087 [56], creating pMF1034 in *Escherichia coli* DH5 α MCR cells. Plasmids were isolated with the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), checked by digestion with *Hind*III/*Eco*RI and transferred into the *E. coli* S17.1 conjugative strain [57]. MFN1032 cells were conjugated with the S17.1 pMF1034 strain and selected for resistance to tetracycline and ampicillin. Clones were tested by PCR with PLC0 and PLC2 probes to confirm disruption of the *plcC* gene. MFN1037 (*plcC*-deficient MFN1032) had no 1.5 kb fragment corresponding to the *plcC* gene under the control of its own promoter. This strain also had an attenuated egg-yolk degradation phenotype. It was cultured in LB with a final concentration of 40 µg/mL tetracycline. Complementation of the mutation was obtained by electroporating MFN1037 with pMF36 (strain MFN1038). Clones were selected for resistance to mezlocillin and tetracycline and egg-yolk degradation phenotype, and were checked by plasmid DNA isolation with the QIAprep Spin miniprep Kit (Qiagen), followed by enzymatic digestion.

Authors' contributions

GR wrote the manuscript and analyzed most of the data. AM participated in the molecular genetic studies, carried out the sequence comparison and participated in the design of the study and the manuscript. JG was involved in the swimming motility assays and flagellin identification. WV and OL carried out the glial cell cytotoxicity assays. MF helped to design and write the manuscript. NO was involved in designing the study. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the Région Haute-Normandie

References

- Whyte A, Lafong C, Malone J, Golda B: **Contaminated lithium heparin bottles as a source of pseudobacteremia.** *J Hosp Infect* 1999, **42**:342-343.
- Spiers AJ, Buckling A, Rainey PB: **The causes of *Pseudomonas* diversity.** *Microbiology* 2000, **146**:2345-2350.
- Von Graevenitz A: **Clinical microbiology on unusual *Pseudomonas* species.** *Progress in Clinical Pathology* 1970, **5**:185-218.
- Bernstein DL, Lummus ZL, Santilli G, Siskosky J, Bernstein IL: **Machine operator's lung. A hypersensitivity pneumonitis disorder associated with exposure to metalworking fluid aerosols.** *Chest* 1995, **108**(3):636-641.
- Kaushal ML, Grover PS, Gupta ML: **Non-fermenters in urinary tract infection.** *J Assoc Physicians India* 2003, **46**(9):798-800.
- Hsueh P, Teng L, Pan H, Chen Y, Sun C, Ho S, Luh K: **Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bacteremia among oncology patients.** *J Clin Microbiol* 1998, **36**:2914-2917.
- Chapalain A, Rossignol G, Lesouhaitier O, Merieau A, Gruffaz C, Guerrillon J, Meyer JM, Orange N, Feuilloley MG: **Comparative study of seven fluorescent pseudomonad clinical isolates.** *Can J Microbiol* 2008, **54**(1):19-27.
- Picot L, Abdelmoula SM, Merieau A, Leroux P, Cazin L, Orange N, Feuilloley MG: ***Pseudomonas fluorescens* as a potential pathogen: adherence to nerve cells.** *Microbes Infect* 2001, **3**(12):985-995.
- Feuilloley MGJ, Mezghani-Abdelmoula S, Picot L, Lesouhaitier O, Merieau A, Guerrillon J, Orange N: **Involvement of *Pseudomonas* and related species in central nervous system infections.** *Recent Adv Dev Microbiol* 2003, **7**:55-71.
- Picot L, Mezghani-Abdelmoula S, Chevalier S, Merieau A, Lesouhaitier O, Guerrillon J, Cazin L, Orange N, Feuilloley MG: **Regulation of the cytotoxic effects of *Pseudomonas fluorescens* by growth temperature.** *Res Microbiol* 2004, **155**(1):39-46.
- Lazdunski A: ***Pseudomonas aeruginosa*: a model of choice for the study of opportunistic pathogen.** *Ann Fr Anesth Reanim* 2003, **22**:523-526.
- Mohr CD, Tomich M, Herfst CA: **Cellular aspects of *Burkholderia cepacia* infection.** *Microbes Infect* 2001, **3**(5):425-435.
- Hellio FC, Orange N, Guespin-Michel JF: **Growth temperature controls the production of a single extracellular protease by *Pseudomonas fluorescens* MF0, in the presence of various inducers.** *Res Microbiol* 1993, **144**(8):617-625.
- Dieckmann M, Johnson LA, Beacham IR: **The diversity of lipases from psychrotrophic strains of *Pseudomonas*: a novel lipase from a highly lipolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*.** *J Appl Microbiol* 1998, **85**(3):527-536.
- Preuss I, Kaiser I, Gehring U: **Molecular characterization of a phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C.** *Eur J Biochem* 2001, **268**(19):5081-5091.
- Ivanov A, Titball RW, Kostadinova S: **Characterisation of a phospholipase C produced by *Pseudomonas fluorescens*.** *New Microbiol* 1996, **19**(2):113-121.
- Sacherer P, Defago G, Haas D: **Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene gac A in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0.** *FEMS Microbiol Lett* 1994, **116**(2):155-160.
- Crevel I, US S, Carne A, Katan M: **Purification and properties of zinc-metallophospholipase C from *Pseudomonas fluorescens*.** *Eur J Biochem* 1994, **224**(3):845-852.
- Doi O, Nojima S: **Phospholipase C from *Pseudomonas fluorescens*.** *Biochim Biophys Acta* 1974, **248**(2):234-244.
- Songer JG: **Bacterial phospholipases and their role in virulence.** *Trends Microbiol* 1997, **5**(4):156-161.
- Titball RW: **Bacterial phospholipases C.** *Microbiol Rev* 1993, **57**(2):347-366.
- Schmiel DH, Miller VL: **Bacterial phospholipases and pathogenesis.** *Microbes Infect* 1999, **1**(13):1103-1112.
- Ostroff RM, Vasil AI, Vasil ML: **Molecular comparison of a non-hemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Bacteriol* 1990, **172**(10):5915-5923.
- Montes L-R, Ibaraguren M, Goni FM, Stonehouse MJ, Vasil MI, Alonso A: **Leakage-free membrane fusion induced by the hydrolytic activity of PlcHR2, a novel phospholipase C/sphingomyelinase from *Pseudomonas aeruginosa*.** *Biochim Biophys Acta* 2002, **1768**:2354-2372.
- Amtrmann E: **The antiviral, antitumoural xanthate D609 is a competitive inhibitor of phosphatidylcholine-specific phospholipase C.** *Drugs Exp Clin Res* 1996, **22**(6):287-294.
- Stonehouse MJ, Cota-Gomez A, Parker SK, Martin WE, Hankin JA, Murphy RC, Chen W, Lim KB, Hackett M, Vasil AI, et al: **A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C.** *Mol Microbiol* 2002, **46**(3):661-676.
- Rigali S, Derouaux A, Giannotta F, Dusart J: **Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies.** *J Biol Chem* 2002, **277**(15):12507-12515.
- Compart S, Brion D, Jerzy N, Christophe C, Barka EA: **Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects.** *Applied and Environmental Microbiology* 2005, **71**:4951-4959.
- Alonso A, Rojo F, Martinez JL: **Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and bio-**

- degradative properties irrespective of their origin.** Environ Microbiol 1999, 1(5):421-430.
30. Morales G, Wiehmann L, Gudowius P, van Delden C, Tummler B, Martinez JL, Rojo F: **Structure of *Pseudomonas aeruginosa* populations analyzed by single nucleotide polymorphism and pulse-field gel electrophoresis genotyping.** J Bacteriol 2004, 186(13):4228-4237.
31. Alouf J: **Les toxines bactériennes membranolytiques.** Bull Soc Fr Microbiol 2000, 15(2):104-110.
32. Sonoki S, Ikezawa H: **Studies on phospholipase C from *Pseudomonas aureofaciens*. I. Purification and some properties of phospholipase C.** Biochim Biophys Acta 1978, 403(2):412-424.
33. Barker AP, Vasil AI, Filloux A, Ball G, Wilderman PJ, Vasil ML: **A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis.** Mol Microbiol 2004, 53(4):1089-1098.
34. Voulhoux R, Ball G, Ize B, Vasil ML, Lazdunski A, Wu LF, Filloux A: **Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway.** Embo J 2001, 20(23):6735-6741.
35. Rossier O, Cianciotto NP: **The *Legionella pneumophila* tatB gene facilitates secretion of phospholipase C, growth under iron-limiting conditions, and intracellular infection.** Infect Immun 2005, 73(4):2020-2032.
36. Givskov M, Eberl L, Christiansen G, Benedik MJ, Molin S: **Induction of phospholipase- and flagellar synthesis in *Serratia liquefaciens* is controlled by expression of the flagellar master operon fliD.** Mol Microbiol 1995, 15(3):445-454.
37. Schmiel DH, Young GM, Miller VL: **The *Yersinia enterocolitica* phospholipase gene yplA is part of the flagellar regulon.** J Bacteriol 2000, 182(8):2314-2320.
38. Young GM, Schmiel DH, Miller VL: **A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system.** Proc Natl Acad Sci USA 1999, 96(11):6456-6461.
39. Young BM, Young GM: **YplA is exported by the Ysc, Ysa, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica*.** J Bacteriol 2002, 184(5):1324-1334.
40. Jacob-Dubuisson F, Fernandez R, Coutte L: **Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways.** Biochim Biophys Acta 2004, 1694(1-3):235-257.
41. Warren SM, Young GM: **An amino-terminal secretion signal is required for YplA export by the Ysa, Ysc, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica* biovar IB.** J Bacteriol 2005, 187(17):6075-6083.
42. Linares JF, Gustafsson I, Baquero F, Martinez JL: **Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons.** Proc Natl Acad Sci USA 2006, 103(51):19484-19489.
43. Kaufman M, Thomas R: **Emergence of complex behaviour from simple circuit structures.** C R Biol 2003, 326(2):205-214.
44. Rigali S, Schlicht M, Hoskisson P, Nothaft H, Merzbacher M, Joris B, Titgemeyer F: **Extending the classification of bacterial transcription factors beyond the helix-turn-helix motif as an alternative approach to discover new cis/trans relationships.** Nucleic Acids Res 2004, 32(11):3418-3426.
45. Guespin-Michel JF, Polack B, Merieau A: **Bacterial adaptation and epigenesis.** Recent research and Developments in Microbiology 2003, 7:289-305.
46. Filopon D, Merieau A, Bernot G, Comet JP, Leberre R, Guery B, Polack B, Guespin-Michel J: **Epigenetic acquisition of inducibility of type III cytotoxicity in *P. aeruginosa*.** BMC Bioinformatics 2006, 7:272.
47. Holloway BW, Krishnapillai V, Morgan AF: **Chromosomal genetics of *Pseudomonas*.** Microbiol Rev 1979, 43:73-102.
48. Burini JF, Gugi B, Merieau A, Guespin-Michel JF: **Lipase and acidic phosphatase from the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*: two enzymes whose synthesis is regulated by the growth temperature.** FEMS Microbiol Lett 1994, 122(1-2):13-18.
49. Dacheux D, Attrée I, Toussaint B: **Expression of ExsA in trans confers type III secretion system-dependent cytotoxicity on noncytotoxic *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates.** Infect Immun 2001, 69(1):538-542.
50. Karkhanis YD, Zeitner JY, Jackson JJ, Carlo DJ: **A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria.** Anal Biochem 1978, 85(2):595-601.
51. Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM, McInerney MJ: **Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms.** J Microbiol Meth 2004, 56(3):339-347.
52. Laemmli UK, Molbert E, Showe M, Kellenberger E: **Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4.** J Mol Biol 1970, 49(1):99-113.
53. Deziel E, Comeau Y, Villemur R: **Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities.** J Bacteriol 2001, 183(4):1195-1204.
54. O'Toole GA, Kolter R: **Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis.** Mol Microbiol 1998, 28(3):449-461.
55. West SE, Schweizer HP, Dall C, Sample AK, Runyen-Janecky LJ: **Construction of improved *Escherichia*-*Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*.** Genet 1994, 148(1):81-86.
56. Schnider U, Keel C, Voisard C, Defago G, Haas D: **Tn5-directed cloning of pqq genes from *Pseudomonas fluorescens* CHA0: mutational inactivation of the genes results in overproduction of the antibiotic pyoluteorin.** Appl Environ Microbiol 1995, 61(11):3856-3864.
57. Simon RPU, Pehle A: **A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria.** Biotechnology 1993, 1:784-790.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp

