

UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER

FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année : 2014

2014 TOU3 2035

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

obtenu après soutenance

du Mémoire du DIPLÔME d'ÉTUDES SPÉCIALISÉES de BIOLOGIE MÉDICALE

(conformément à l'article 25 de l'arrêté du 8 avril 2013 relatif au régime des études en vue du diplôme d'état de Docteur en Pharmacie)

présentée et soutenue publiquement par

Christophe GARCIE

le vendredi 23 mai 2014 à Toulouse

RÔLE DE LA PROTÉINE CHAPERON Hsp90_{Ec} DANS LA VIRULENCE DE *Escherichia coli*

Directeur de thèse :

Monsieur le Professeur Eric OSWALD

JURY

Président : Madame le Professeur Christine ROQUES-CESCHIN
1^{er} assesseur : Madame le Professeur Nicole MARTY
2^{ème} assesseur : Madame le Docteur Patricia MARTIN
3^{ème} assesseur : Monsieur le Professeur Eric OSWALD

*A ma grand-mère,
qui comptait tant pour moi,
je dédie cette thèse*

A mon grand-père

A Jérémy, qui est parti trop tôt

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Christine Roques-Ceschin, président de mon jury de thèse

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse. J'espère sincèrement que nous aurons l'occasion de travailler ensemble à l'avenir, sur le versant hospitalier mais également en recherche fondamentale. Veuillez trouver ici la marque de mon plus profond respect et de ma haute considération.

A Madame le Professeur Nicole Marty, membre de mon jury de thèse

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury et de juger mon travail. Je souhaite vous exprimer ma profonde reconnaissance pour votre enseignement, votre soutien et vos conseils, qui m'ont accompagné tout au long de l'internat, et qui ont été si précieux pour ma spécialisation en Bactériologie Médicale. Recevez ici toute ma gratitude.

A Monsieur le Professeur Eric Oswald, mon directeur de thèse

Je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre équipe de recherche pour réaliser mon Master 2 Recherche puis ma thèse d'Université, et pour avoir ensuite accepté d'être mon directeur de thèse(s). Merci pour votre encadrement, votre disponibilité et votre confiance. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Docteur Patricia Martin, membre de mon jury et co-directrice de thèse

Je te remercie d'avoir, un jour, accepté d'être ma co-directrice de thèse d'Université. Pour ta disponibilité sans faille, tes précieux conseils, ta rigueur, ton soutien et ton encadrement au quotidien, ta gentillesse, ta sympathie, ton humour... Un immense merci ! Je te suis reconnaissant d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse d'exercice, pour ta lecture attentive du premier au dernier mot, et pour ta réactivité, même en vacances. Reçois ici la marque de mon plus grand respect.

Je tiens également à remercier :

Maryse Archambaud, pour m'avoir transmis votre passion de la Bactériologie Médicale, pour m'avoir guidé et mis « sur les rails » d'une carrière hospitalo-universitaire, pour vos conseils et votre encadrement, pour toutes les connaissances que vous m'avez transmises, pour votre gentillesse, votre sympathie, votre franchise, mais aussi pour votre courage. Je regrette seulement que nous ne puissions pas travailler ensemble plus longtemps. Je vous souhaite le meilleur pour cette nouvelle étape de votre vie. Merci pour tout, Maryse !

L'ensemble des personnes ayant contribué au cours de mon cursus à ma formation, loin d'être achevée, de pharmacien, de biologiste médical et de chercheur.

Les biologistes et les techniciens des différents laboratoires du CHU de Toulouse, et particulièrement ceux du laboratoire de Bactériologie-Hygiène.

Les membres de l'équipe 11 du CPTP, pour m'avoir accueilli dans le monde de la recherche en 2011. Vive *Escherichia coli* ! Et vive la colibactine (que l'on isolera... un jour) !

Toute l'équipe du Service des Maladies Infectieuses et Tropicales du CHU de Toulouse, et en particulier les infectiologues, pour votre accueil, votre gentillesse et votre disponibilité, et pour avoir grandement enrichi ma formation de bactériologiste.

Mes co-internes, d'un ou plusieurs semestres, passés ou actuels, avec une mention spéciale à mes co-internes du SMIT, pour avoir supporté MOOOLLISSS un semestre entier !

Tous mes amis rencontrés au cours de mes études (petite dédicace à ma petite Châtaigne), de mon internat (Agnès, Albertine, Alexandre, Alice, Alix, Aude, Camille, Céline, David, Elise, Guillaume, Jessica, Jérôme, Julie, Marion, Michaël, Romain, Sébastien, Sophie, Stevie... et ceux que j'ai oublié car il est 2h du mat' !) ou ailleurs (ils se reconnaîtront ^).

Caroline, Johann et Louis, mes amis si précieux, et futurs témoins. Merci de faire partie de ma vie. Que nos routes se suivent toujours, malgré la distance. Je vous souhaite le meilleur.

Tous les membres de ma famille, en particulier mes grands-parents, pour leur amour. Et les membres de ma belle-famille, pour leur gentillesse, leur générosité et leur soutien.

Mon petit frère adoré, Florent. Je suis fier du jeune homme que tu deviens jour après jour. Crois en tes projets, ne laisse personne te détourner de tes objectifs, et tu verras que rien n'est impossible. Je serai à tes côtés pour t'aider de mon mieux à accomplir tes projets. Ze t'M.

Mes parents, vous sans qui rien ne serait possible, merci pour votre amour et votre soutien. Merci pour tout ce que vous faites pour moi, merci de m'avoir permis d'aller toujours plus loin. Et parce qu'on ne le dit jamais assez, je vous aime !

Et enfin, Dani ma chérie, pour ton amour et ton soutien sans faille depuis bientôt 9 ans... Merci de me combler de bonheur tous les jours ! Merci de me supporter au quotidien ! Merci d'être l'élément essentiel à mon équilibre ! Et merci de m'offrir ce cadeau de la vie ! Je suis fier, comblé et heureux d'être ton chéri doudou ! Je t'aime plindé fort mon chaton !

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS	7
TABLE DES SIGLES ET ABREVIATIONS.....	8
PREAMBULE	9
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
I – LE CONTROLE QUALITE DES PROTEINES CHEZ <i>Escherichia coli</i>	12
I. A. Principes généraux.....	12
I. B. Contrôle qualité des protéines néo-synthétisées.....	14
I. B. 1. Machinerie de traduction	14
I. B. 2. Trigger Factor.....	14
I. B. 3. Système Hsp70 : complexe DnaK-DnaJ-GrpE	17
I. B. 4. Système Hsp60 : complexe GroEL-GroES.....	19
I. B. 5. Coopération entre les systèmes TF, DnaKJE et GroESL.....	22
I. C. Contrôle qualité des protéines sécrétées.....	24
I. C. 1. Translocation protéique vers le périplasme	25
I. C. 2. Repliement protéique dans le périplasme	25
I. C. 3. Stabilisation des protéines extracytoplasmiques	25
I. C. 4. Protéolyse des protéines périplasmiques	26
I. D. Contrôle qualité des protéines en situations de stress.....	27
I. D. 1. Mesures préventives	28
I. D. 1. a. Prévention de la dénaturation	28
I. D. 1. b. Prévention de l'oxydation.....	28
I. D. 1. c. Modulation de l'agrégation	29
I. D. 2. Mesures curatives.....	29
I. D. 2. a. Désagrégation protéique.....	29
I. D. 2. b. Repliement conformationnel	30
I. D. 2. c. Elimination des protéines mal conformées.....	30
I. D. 2. d. Elimination des agrégats protéiques	32
I. E. Régulation du contrôle qualité des protéines	33
I. E. 1. ARN thermosensibles.....	34
I. E. 2. Contrôle des régulateurs transcriptionnels.....	34
II – LA MACHINERIE Hsp90.....	35
II. A. Généralités.....	35
II. B. Structure et cycle réactionnel	36
II. C. Fonctions cellulaires et protéines clientes	37
II. D. Collaboration avec d'autres systèmes chaperons	40
II. E. Pathologies associées et cible thérapeutique	41

TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	43
I – INTRODUCTION	44
II – MATERIEL ET METHODES	52
III – RESULTATS.....	58
IV – DISCUSSION ET PERSPECTIVES	67
BIBLIOGRAPHIE	71

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Tableau I. Synthèse de l'analyse des mutants d'intérêt situés hors de l'îlot <i>pks</i>	50
Tableau II. Souches et plasmides utilisés dans cette étude.....	53
Tableau III. Amorces utilisées dans cette étude.....	54
Figure 1. Principes généraux du maintien de l'homéostasie protéique.....	9
Figure 2. Principes généraux du contrôle qualité protéique chez <i>Escherichia coli</i>	13
Figure 3. Structure et cycle réactionnel de la protéine chaperon Trigger Factor	15
Figure 4. Structure et cycle réactionnel du système chaperon Hsp70 (DnaKJE).....	18
Figure 5. Structure et cycle réactionnel du système chaperon Hsp60 (GroESL).....	21
Figure 6. Contrôle qualité des protéines néo-synthétisées.....	23
Figure 7. Contrôle qualité des protéines sécrétées.....	24
Figure 8. Contrôle qualité protéique en situations de stress.....	27
Figure 9. Mécanisme de désagrégation protéique par ClpB et DnaKJE	30
Figure 10. Mécanisme de dégradation protéique par une protéase.....	31
Figure 11. Élimination des agrégats protéiques par réorganisation asymétrique	32
Figure 12. Mécanismes de régulation de la réponse au choc thermique	33
Figure 13. Structure et cycle réactionnel de la protéine chaperon Hsp90 _{Ec}	36
Figure 14. Modèle du contrôle qualité des protéines dénaturées intégrant Hsp90 _{Ec}	40
Figure 15. Dommages cellulaires induits par des <i>E. coli</i> produisant la colibactine.....	45
Figure 16. Structure schématique de l'îlot génomique <i>pks</i>	47
Figure 17. Structure putative linéaire de la colibactine obtenue par analyse <i>in silico</i>	47
Figure 18. Protocole de construction, criblage et analyse de la banque de mutants.....	48
Figure 19. Hsp90 _{Ec} est nécessaire à la biosynthèse de la colibactine	59
Figure 20. Hsp90 _{Ec} ne régule pas la transcription des gènes de l'îlot <i>pks</i>	60
Figure 21. La protéase ClpQ intervient avec Hsp90 _{Ec} dans la synthèse de colibactine.....	61
Figure 22. Une surexpression de ClpQ abolit la production de colibactine	63
Figure 23. La virulence de la souche d'ExPEC SP15 n'est pas atténuée en l'absence de Hsp90 _{Ec} dans un modèle animal étudiant la phase précoce du sepsis.....	64
Figure 24. La survie systémique de la souche SP15 n'est pas modifiée en l'absence de Hsp90 _{Ec} dans un modèle animal étudiant la phase précoce du sepsis.....	64
Figure 25. La virulence de la souche SP15 est atténuée en l'absence de Hsp90 _{Ec} dans un modèle animal étudiant la phase tardive du sepsis	65
Figure 26. La production de yersiniabactine est diminuée en l'absence de Hsp90 _{Ec}	66
Figure 27. Connexion entre les voies de synthèse de colibactine et de yersiniabactine.....	69

TABLE DES SIGLES ET ABBREVIATIONS

• ADN : Acide DésoxyriboNucléique	• HSR : <i>Heat Shock Response</i>
• ADP : Adénosine DiPhosphate	• IPTG : IsoPropylThioGalactopyranoside
• ARN : Acide RiboNucléique	• kb : kilobases
• ARNm : ARN messenger	• kDa : kiloDaltons
• ARNr : ARN ribosomique	• LB : <i>Lysogeny Broth / Luria-Bertani</i>
• ARNt : ARN de transfert	• MD : <i>Middle Domain</i>
• ATP : Adénosine TriPhosphate	• NBD : <i>Nucleotide-Binding Domain</i>
• ATPase : Adénosine TriPhosphatase	• NEF : <i>Nucleotide Exchange Factor</i>
• BAC : <i>Bacterial Artificial Chromosome</i>	• NRP : <i>Non-Ribosomal Peptide</i>
• BLAST : <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	• NRPS : <i>Non-Ribosomal Peptide Synthase</i>
• Cas : <i>CRISPR-associated proteins</i>	• NTD : <i>N-Terminal Domain</i>
• CAS : Chrome Azurol S	• pb : paires de bases
• CRISPR : <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>	• PBS : <i>Phosphate Buffered Saline</i>
• CTD : C-Terminal Domain	• PCR : <i>Polymerase Chain Reaction</i>
• DO : Densité Optique	• PK : <i>PolyKetide</i>
• DnaKJE : complexe DnaK-DnaJ-GrpE	• PKS : <i>PolyKetide Synthase</i>
• <i>E. coli</i> : <i>Escherichia coli</i>	• PPIase : <i>Peptidyl-Propyl Isomerase</i>
• ECP : Effet Cyto-Pathogène	• PPTase : PhosphoPantéthéinyl Transférase
• EPEC : <i>Enteropathogenic E. coli</i>	• PST : PBS-SVF-Triton
• ExPEC : <i>Extra-intestinal Pathogenic E. coli</i>	• RT : Reverse-Transcriptase
• GroESL : complexe GroES-GroEL	• SBD : <i>Substrate-Binding Domain</i>
• HtpG : <i>High-Temperature Protein G</i>	• SVF : Sérum de Veau Foetal
• Hsp(s) : <i>Heat shock protein(s)</i>	• TF : <i>Trigger Factor</i>
	• UFC : Unité Formant Colonie

PREAMBULE

Lors de l'entrée chez un organisme hôte, une bactérie est confrontée à différents stress : élévation de température, acidité du milieu, stress oxydatif, molécules anti-microbiennes... Ces stress peuvent être responsables d'une dénaturation des protéines, entraîner la formation d'agrégats, et parfois conduire à la mort bactérienne. Pour faire face à ces situations, les bactéries sont capables de mettre en place différentes réponses cellulaires, afin de maintenir l'homéostasie protéique. La réponse bactérienne au choc thermique, appelée *Heat Shock Response* (HSR), est la mieux caractérisée à ce jour. Elle se traduit par la synthèse de nombreux acteurs de la famille des protéines de choc thermique, ou *Heat shock proteins* (Hsps). Elle comprend des protéines chaperons, des protéases et des régulateurs, qui forment un réseau interactif assurant le contrôle qualité protéique, présenté [Figure 1](#).

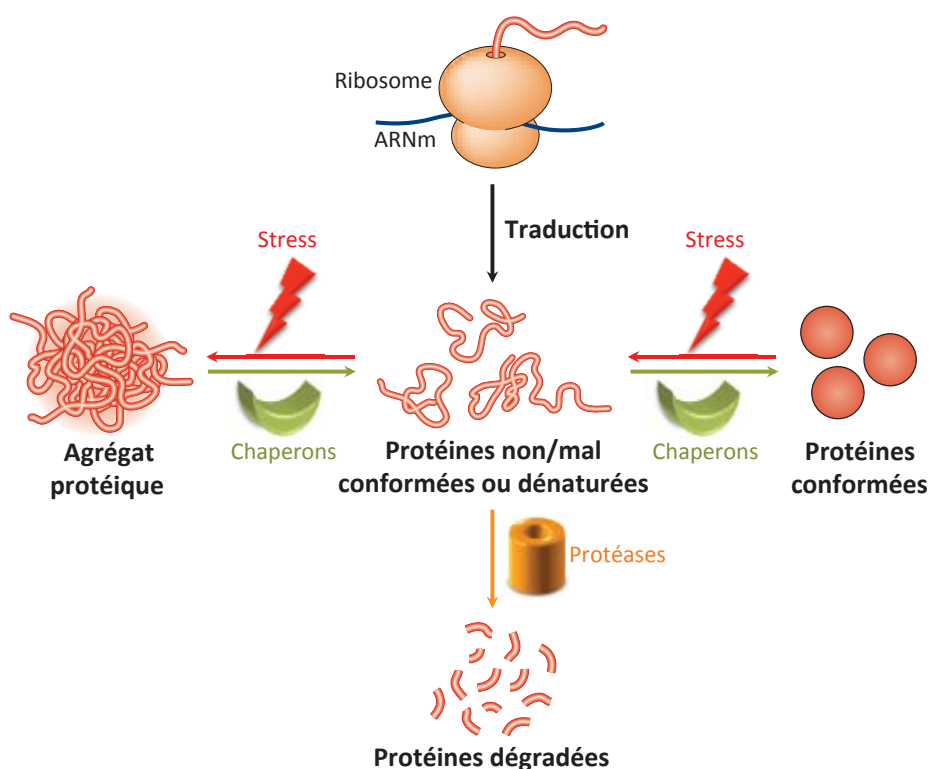


Figure 1. Principes généraux du maintien de l'homéostasie protéique

A l'issue de la traduction d'un ARN messager par la machinerie ribosomale, les chaînes d'acides aminés synthétisées ne sont pas conformées. Des protéines chaperons interviennent alors pour permettre leur repliement conformationnel. Cependant, lors d'un stress thermique par exemple, les protéines peuvent être dénaturées, voire former des agrégats. La mise en place de la réponse au choc thermique induit une production importante de protéines chaperons, qui permettent la désagrégation des protéines et assurent leur repliement. Si les altérations subies sont trop importantes, des protéases dégradent les protéines dénaturées en acides aminés [1].

Le contrôle qualité des protéines est ainsi le résultat d'un équilibre finement régulé entre deux processus cellulaires, le repliement conformationnel par les protéines chaperons, et la dégradation par les protéases, qui assurent un maintien constant de l'homéostasie protéique.

L'équipe de recherche du Pr. E. Oswald travaille sur la pathogénicité de *Escherichia coli*, et en particulier sur certaines souches capables de synthétiser une génotoxine : la colibactine. Dans le cadre d'un projet de recherche ayant pour objectif d'étudier la voie de biosynthèse de cette toxine, nous nous sommes intéressés au contrôle qualité des protéines. Il semblerait en effet qu'une ou plusieurs protéines chaperons soient nécessaires à la production de colibactine. Notre attention s'est focalisée sur l'un de ces systèmes, la protéine chaperon Hsp90_{Ec}.

Cette thèse s'articulera donc autour d'une revue bibliographique sur le contrôle qualité des protéines chez *E. coli*, en portant un intérêt particulier à la machinerie Hsp90 procaryote, et d'une présentation du travail expérimental, réalisé dans le cadre de ma thèse d'Université, visant à élucider le rôle de Hsp90_{Ec} dans la synthèse de facteurs de virulence de *E. coli*.

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

I – LE CONTROLE QUALITE DES PROTEINES CHEZ *Escherichia coli*

I. A. Principes généraux

Les protéines sont des macromolécules biologiques aux fonctions extrêmement variées et aux structures particulièrement complexes. Elles sont impliquées dans la quasi-totalité des processus biologiques chez tous les organismes vivants.

Synthétisées par le ribosome sous forme de longues chaînes linéaires d'acides aminés, elles vont être alors libérées par la machinerie de synthèse dans un environnement cytosolique surchargé en molécules de nature diverses. Elles vont être ainsi exposées à un nombre phénoménal d'interactions moléculaires non spécifiques, parfois responsables d'altérations structurales et/ou fonctionnelles [2]. Afin de s'en protéger, elles doivent subir différents repliements conformationnels, sous la forme d'interactions intra-moléculaires spécifiques, afin d'acquérir une structure tridimensionnelle unique, thermodynamiquement stable, fonctionnelle, et devenir ainsi biologiquement actives [2]. Cette conformation définitive est en réalité déterminée par la séquence primaire en acides aminés. Cependant, le repliement de la majorité des protéines est relativement lent, et nécessite de nombreuses étapes intermédiaires. Ce processus devient alors excessivement complexe *in vivo* en raison de l'encombrement moléculaire. Au sein de la cellule, la concentration en protéines cytosoliques peut en effet atteindre 400 g/L, freinant ainsi le repliement adéquat des protéines, et favorisant la formation d'agrégats [3].

Pour favoriser le repliement conformationnel et éviter l'agrégation des protéines, tous les organismes vivants, dont les bactéries, ont développé des systèmes de contrôle qualité des protéines particulièrement sophistiqués, constitués de molécules chaperons et de protéases, qui assurent le maintien de l'homéostasie protéique grâce à de nombreuses fonctions, énumérées ci-dessous et résumées dans la Figure 2 [4] :

- elles favorisent le repliement des protéines nouvellement synthétisées ① ;
- elles orientent les protéines vers le compartiment cellulaire approprié ② ;
- elles favorisent le repliement des protéines ③ dénaturées lors d'un stress ④ ;

- elles dégradent les protéines mal conformées ayant subi une dénaturation trop importante et non réversible ⑤ ;
- elles préviennent la dénaturation des protéines conformées, mais également l'agrégation des protéines non conformées ⑥ ;
- elles résolvent les agrégats protéiques ⑦ et permettent leur solubilisation ⑧ ;

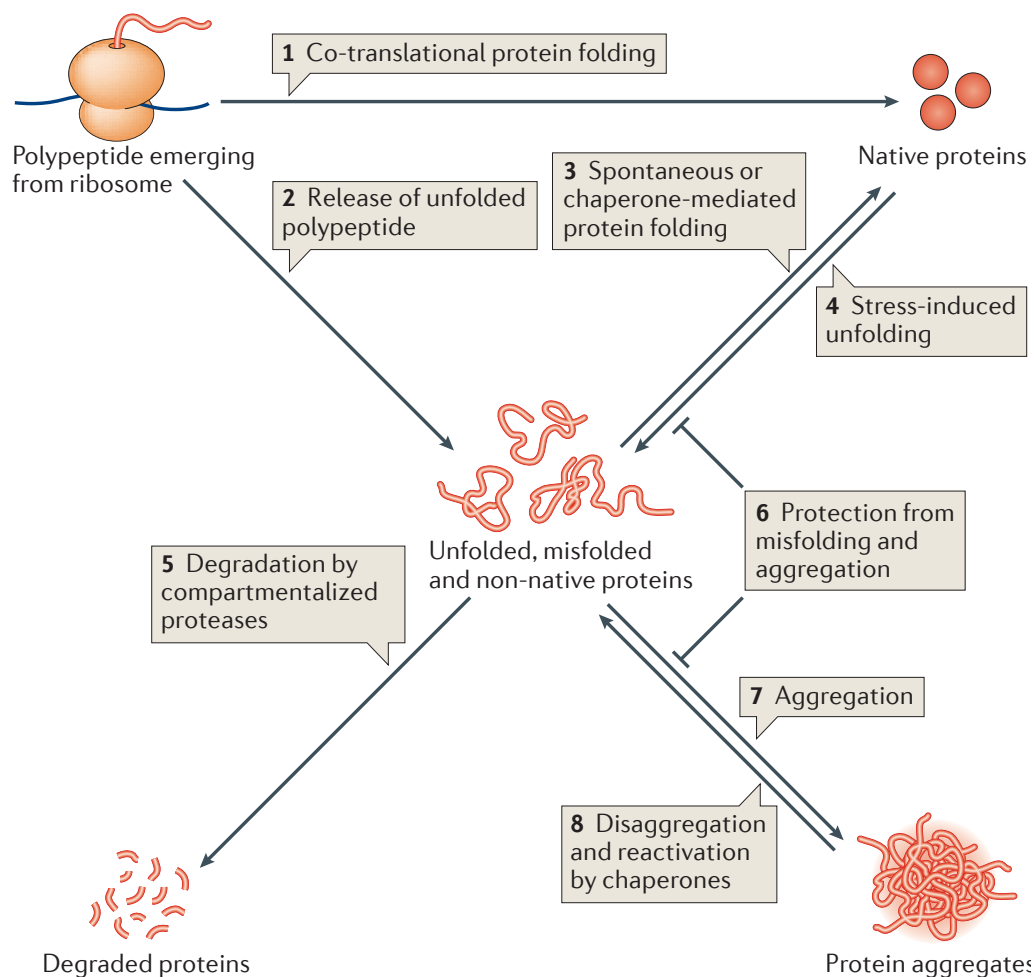


Figure 2. Principes généraux du contrôle qualité protéique chez *Escherichia coli*

Les mécanismes mis en jeu sont détaillés dans le paragraphe précédent [1].

Cette partie va donc explorer les différentes facettes du contrôle qualité des protéines chez *Escherichia coli* en suivant le cheminement des protéines au sein d'une cellule.

Nous présenterons d'abord les systèmes chaperons impliqués dans le repliement conformationnel des protéines néo-synthétisées. Nous aborderons ensuite les systèmes de contrôle qualité des protéines sécrétées. Puis nous verrons les différentes stratégies préventives et curatives mises en place pour assurer le maintien de l'homéostasie protéique en situations de stress. Et nous terminerons par les mécanismes de régulation du contrôle qualité.

I. B. Contrôle qualité des protéines néo-synthétisées

Les protéines subissent un contrôle qualité dès l'étape de traduction par l'action de la machinerie de synthèse protéique. Différents systèmes chaperons prennent ensuite en charge ces protéines immatures dès la sortie du ribosome pour poursuivre leur maturation.

I. B. 1. Machinerie de traduction

Le premier facteur influençant le repliement des protéines est la séquence de leur ARN messagers. Ils contiennent dans certaines régions des codons rares, qui correspondent à des complexes [acide aminé – ARN de transfert] présents en faible concentration intracellulaire, ce qui va ralentir le rythme de la traduction, et favoriser les premières étapes de repliement protéique au cours de l'élongation de la chaîne peptidique naissante [5].

Le ribosome bactérien participe également aux premières étapes du repliement. Il présente dans sa sous-unité 50S un tunnel moléculaire, par lequel va sortir la chaîne peptidique en cours d'élongation. Elle va subir dans ce tunnel de nombreuses interactions, qui peuvent moduler la cinétique de la traduction et favoriser la formation de structures secondaires spécifiques, telles que des hélices α ou des feuillets β [6].

Le rôle de la machinerie de traduction (ribosome, ARNm et ARNt), s'il est essentiel pour des protéines de petite taille, inférieure à 100 acides aminés, est cependant limité pour des protéines de taille plus conséquente, qui vont requérir pour leur repliement l'intervention de différentes protéines chaperons.

I. B. 2. Trigger Factor

▪ Généralités

La première protéine chaperon à interagir avec une protéine néo-synthétisée au cours de son élongation est la protéine *Trigger Factor* (TF) associée au ribosome [7]. Cette protéine est relativement conservée et retrouvée chez les bactéries et dans les chloroplastes. Elle est présente en quantité abondante dans le cytoplasme, à une concentration cellulaire avoisinant 50 μ M, soit 2 à 3 fois plus que le ribosome [8]. Son activité de chaperon, bien que ATP-indépendante, ne se résume pas à maintenir les protéines dans leur état natif, mais permet très efficacement le repliement conformationnel des protéines néo-synthétisées.

▪ Structure

TF est une protéine de 48 kDa de forme allongée, codée par le gène *tig* chez *E. coli*, et comporte trois domaines distincts (Figure 3.A) [8] :

- la partie N-terminale correspond au domaine de liaison au ribosome ; il présente notamment un motif particulier (GFRxGxxP) impliqué dans l'interaction avec la protéine ribosomale L23, fixée près du tunnel de sortie des protéines sur le ribosome ; ce domaine contribue également en partie à l'activité de chaperon ;
- la partie intermédiaire porte l'activité peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérase (PPlase) de TF, non essentielle pour le repliement des protéines ; ce domaine consolide cependant l'activité de chaperon en tant que site de liaison auxiliaire ; il est séparé du domaine amino-terminal par une longue région *linker* ;
- la partie C-terminale est composée de 2 domaines en hélices qui vont interagir avec la partie N-terminale pour former une cavité à la fois hydrophile et hydrophobe, et favoriser ainsi de multiples interactions avec une grande variété de substrats ; l'activité chaperon de TF repose principalement sur ce domaine C-terminal.

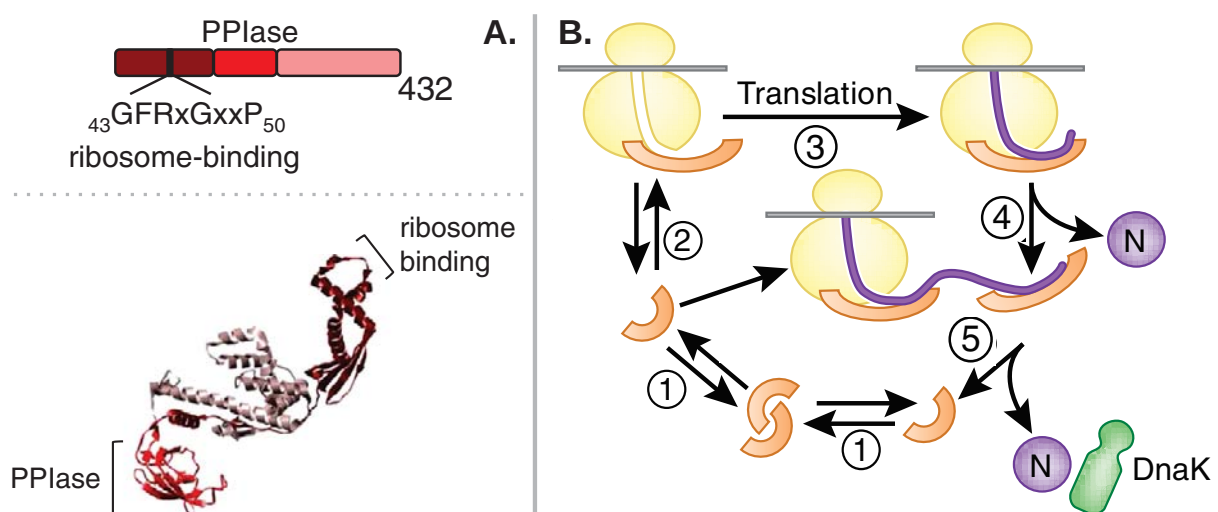


Figure 3. Structure et cycle réactionnel de la protéine chaperon Trigger Factor

A. Organisation des domaines protéiques et structure tridimensionnelle de TF [6].

B. Cycle réactionnel de TF [9]. ① La forme libre de TF est en équilibre entre état monomérique et dimérique. ② TF monomérique libre se lie au ribosome en l'absence de peptide avec une faible affinité. ③ La présence d'un peptide en cours d'élongation augmente l'affinité de TF pour le ribosome, qui favorise les premières étapes du repliement conformationnel ou empêche les interactions non spécifiques dans l'attente d'informations suffisantes sur la conformation définitive. ④ Après sa dissociation du ribosome, TF peut soit se détacher de la chaîne peptidique si elle a atteint sa conformation native, soit y rester lié pour favoriser l'assemblage de protéines multimériques. ⑤ Après sa dissociation de la protéine cliente, la forme libre de TF se trouve à nouveau en équilibre entre état monomérique et dimérique.

▪ Cycle réactionnel

TF est cycliquement lié ou non au ribosome, de manière ATP-indépendante, et forme une arche protectrice au niveau du tunnel de sortie protéique du ribosome.

La liaison de TF au ribosome est indispensable à son activité de protéine chaperon. Cette fixation peut être relativement tardive au cours de l'élongation protéique. En effet, la présence d'une chaîne peptidique en cours de traduction augmente significativement son affinité pour le ribosome, à plus forte raison si le peptide excède 100 acides aminés [10].

Suite à son détachement du ribosome, TF peut néanmoins rester lié à la chaîne peptidique en cours d'élongation, de façon à permettre à une molécule de TF libre de se fixer au ribosome, et dans certains cas à faciliter le transfert de son substrat aux systèmes chaperons intervenant en aval, DnaKJE et GroESL (Figure 3.B) [10]. Il a de plus été montré que des molécules de TF non liées peuvent se dimériser, encapsuler des protéines partiellement conformées et faciliter leur incorporation à des complexes protéiques multimériques [11].

▪ Substrats

TF interagit de manière co-traductionnelle avec la majorité des protéines synthétisées, et 60 à 70% d'entre elles acquièrent leur conformation définitive sans la participation des systèmes DnaKJE et GroESL [12]. Devant un si large spectre de substrats, un criblage des sites préférentiels de liaison de TF a été réalisé et montre que cette protéine chaperon se lie principalement à des motifs courts riches en acides aminés basiques et en résidus aromatiques, enchaînements fréquemment retrouvés chez la majorité des protéines [13].

▪ Fonction cellulaire

De récents travaux confirment que TF agit majoritairement selon 2 mécanismes, non mutuellement exclusifs, pour favoriser le repliement des protéines néo-synthétisées [11] :

- la cavité formée par les domaines N- et C-terminaux de TF fait office d'espace de repliement protéique privilégié, de taille réduite mais néanmoins suffisamment large pour permettre l'assemblage de petits domaines ;
- la fixation de TF sur des longues chaînes peptidiques en cours d'élongation retarde leur repliement jusqu'à l'obtention d'informations suffisantes sur la conformation définitive, évitant ainsi la formation d'intermédiaires protéiques incorrects.

▪ Mutation et phénotypes associés

La mutation du gène *tig* chez *E. coli* est tolérée et n'induit pas d'effet majeur sur la croissance bactérienne en conditions normales de culture [12]. Un mutant *tig* présente cependant une sensibilité accrue à certains antibiotiques et détergents, et une modification de viabilité à 4°C et 50°C [14]. L'absence d'altération phénotypique majeure s'explique par le fait que l'activité de TF est efficacement substituée par le système DnaKJE : une souche mutée pour *tig* et *dnaK* n'est en effet pas viable à une température supérieure à 30°C [15].

I. B. 3. Système Hsp70 : complexe DnaK-DnaJ-GrpE

▪ Généralités

Le système Hsp70 est une machinerie complexe comprenant la protéine chaperon DnaK (Hsp70), sa protéine co-chaperon DnaJ (analogue de Hsp40), et le facteur d'échange nucléotidique GrpE. Ce système, encore appelé DnaKJE, est exprimé à un niveau basal relativement important (concentration cytoplasmique d'environ 50 µM), et peut être induit en réponse à différents stress de manière à doubler sa concentration [16].

▪ Structure

DnaK est une protéine de 638 acides aminés composée de 3 domaines (Figure 4.A) [17] :

- un domaine N-terminal de liaison au nucléotide (*Nucleotide Binding Domain*, NDB) portant l'activité ATPase ;
- une région *linker* hautement conservée relie les domaines N- et C-terminaux ; elle comporte un segment hydrophobe caractéristique DVLLLD essentiel pour la communication allostérique entre les domaines ATPase et de liaison aux substrats ;
- un domaine C-terminal de liaison aux substrats (*Substrates Binding Domain*, SBD), divisé en un feuillet β et une hélice α ; l'extrémité C-terminale possède également une courte région très conservée servant de site auxiliaire de liaison aux substrats.

DnaJ est une protéine de 376 acides aminés, fonctionnelle sous forme dimérique, qui possède un domaine J caractéristique, indispensable à son interaction avec DnaK (Figure 4). Elle permet le recrutement des protéines clientes et stimule l'activité ATPase de DnaK [18].

GrpE est une protéine de 197 acides aminés, appartenant à la famille des facteurs d'échanges nucléotidiques (*Nucleotide Exchange Factors*, NEF), qui favorise la dissociation de l'ADP de DnaK, ainsi que la libération des protéines clientes conformées (Figure 4) [18].

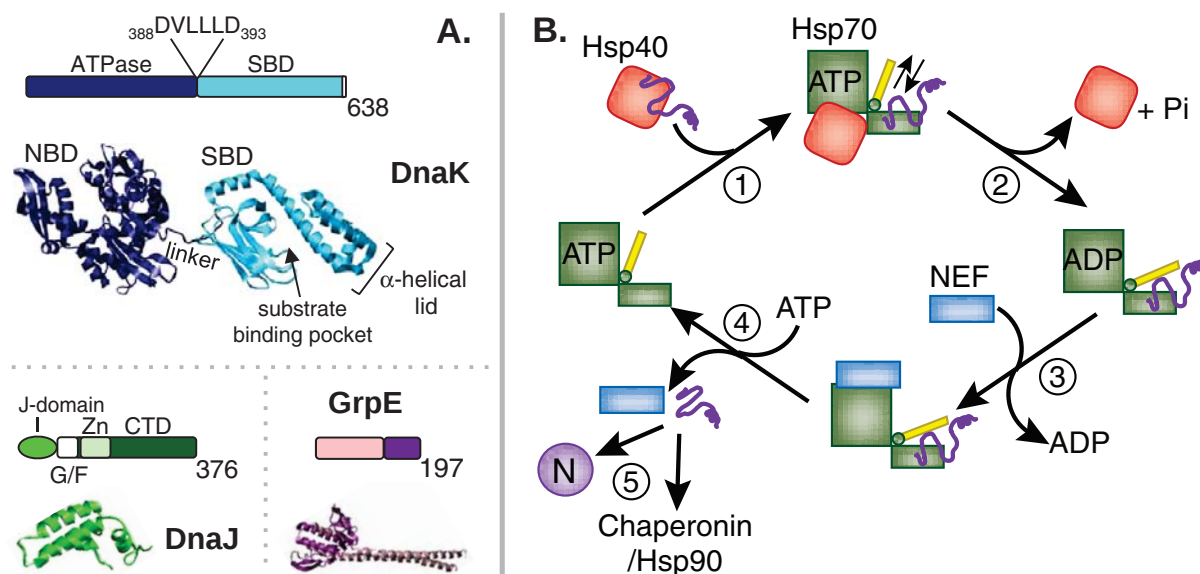


Figure 4. Structure et cycle réactionnel du système chaperon Hsp70 (DnaKJE)

A. Organisation des domaines protéiques et structure tridimensionnelle de DnaK, DnaJ et GrpE [6].

B. Cycle réactionnel du système DnaKJE [9]. ① DnaK, lié à l'ATP et en conformation ouverte, présente une faible affinité pour ses substrats. Les protéines clientes sont donc recrutées par la protéine co-chaperon DnaJ. ② La liaison de DnaJ sur DnaK catalyse l'hydrolyse de l'ATP en ADP, puis modifie l'état de DnaK en conformation fermée, et favorise le repliement conformationnel de la protéine cliente. DnaJ se dissocie alors de DnaK. ③ La fixation du facteur d'échange de nucléotide GrpE entraîne la dissociation de l'ADP. ④ La liaison d'une nouvelle molécule d'ATP sur DnaK permet sa transition en conformation ouverte, et la libération de la protéine cliente et de GrpE. ⑤ La protéine cliente libérée peut atteindre sa conformation définitive, être prise en charge par d'autres systèmes chaperons, ou se lier de nouveau à DnaJ.

▪ Cycle réactionnel

Durant le cycle de la protéine chaperon DnaK, le domaine de liaison aux substrats alterne entre un état ouvert ou fermé selon la nature du nucléotide fixé sur le domaine ATPase. Lorsqu'une molécule d'ATP est liée à DnaK, le SBD en conformation ouverte présente une faible affinité pour ses substrats, avec une cinétique d'échange rapide. Réciproquement, lorsqu'une molécule d'ADP est liée au NBD, le SBD en conformation fermée possède une affinité élevée et une cinétique d'échange ralentie [19].

Si l'hydrolyse de l'ATP est primordiale à l'activité de chaperon de DnaK, celle-ci possède pourtant une faible activité ATPasique. Son cycle réactionnel, détaillé en Figure 4.B, est ainsi contrôlé par sa co-chaperon DnaJ, qui cible les substrats mais surtout stimule l'hydrolyse de l'ATP par le domaine ATPase de DnaK. Le cofacteur GrpE favorise pour sa part la dissociation de l'ADP et la libération des substrats du SBD de DnaK [19].

▪ Substrats

DnaK se lie préférentiellement à de courtes séquences polypeptidiques hydrophobes, accessibles sur des protéines néo-synthétisées en cours de repliement, sur des protéines devant être exportées, ou sur des protéines dénaturées [20]. La fréquence importante de ces motifs de liaison, classiquement retrouvés tous les 50 à 100 acides aminés, suggère que le système DnaKJE intervient dans le repliement d'un grand nombre de protéines [20].

Une récente analyse de l'interactome de DnaK chez *E. coli* a ainsi révélé plus de 600 substrats potentiels en conditions physiologiques, dont 80% sont retrouvés au niveau du cytosol, 11% de la membrane interne, 3% de la membrane externe et 3% du périplasma [21].

▪ Fonctions cellulaires

Il est admis que le système DnaKJE intervient dans le repliement co- et post-traductionnel d'environ 15% des protéines néo-synthétisées [12]. DnaK participe également au transport des protéines sécrétées, à l'assemblage de complexes multimériques, ainsi qu'au repliement des protéines dénaturées, en collaboration avec d'autres systèmes chaperons [16]. Enfin, DnaK est impliquée dans la réponse au stress oxydatif, et constitue un acteur clé dans la régulation de la réponse au choc thermique, en agissant sur la stabilité du facteur de transcription σ^{32} [4]. Ces fonctions seront détaillées dans les paragraphes concernés.

▪ Mutation et phénotypes associés

Le rôle central du système DnaKJE dans le contrôle protéique est confirmé par la délétion du gène *dnaK*. Un mutant *dnaK* présente plusieurs caractéristiques phénotypiques notables : une cryosensibilité en dessous de 20°C, une croissance lente à 30°C avec filamentation et perte de mobilité, et une thermosensibilité au-dessus de 35°C [16]. Les conséquences de l'inactivation de DnaK, également observées chez d'autres espèces bactériennes, suggèrent un rôle majeur de ce système dans la physiologie bactérienne et dans la virulence [6].

I. B. 4. Système Hsp60 : complexe GroEL-GroES

▪ Généralités

Le système Hsp60 est le seul système chaperon essentiel à la viabilité de *E. coli* [22]. Composé de GroEL, complexe protéique en forme de tonneau, et de GroES, co-chaperon obligatoire semblable à un couvercle, l'ensemble forme la machinerie GroESL, véritable cage hydrophobe permettant le repliement protéique à l'abri de toute interaction non spécifique.

▪ Structure

GroEL est un complexe protéique en forme de tonneau composé de deux anneaux heptamériques de 57 kDa collés dos-à-dos, qui forment ainsi deux cavités pouvant accueillir des protéines non conformées [23]. Chaque sous-unité est divisée en trois domaines, de l'extérieur vers l'intérieur (Figure 5.A) [6] :

- le domaine apical est impliqué dans le recrutement des substrats, grâce à des résidus hydrophobes, et dans la liaison au complexe GroES ;
- le domaine intermédiaire permet la communication allostérique entre les domaines ;
- le domaine équatorial est nécessaire aux interactions intra- et inter-oligomères et à la liaison au nucléotide.

GroES est un complexe protéique heptamérique de 10 kDa en forme de couvercle qui, en obturant les cavités de GroEL, fournit un environnement protégé aux substrats de ce système, et une aide au repliement des polypeptides de 20 à 60 kDa (Figure 5.A) [23]. GroES comporte une courte région flexible de 16 résidus impliquée dans sa liaison à GroEL, dont la flexibilité est essentielle au bon fonctionnement de la machinerie GroESL [24].

Les anneaux du système fonctionnent alternativement. Les domaines équatoriaux assurent la communication allostérique entre eux. Ils sont conventionnellement désignés comme suit :

- l'anneau *cis* est constitué par le complexe GroESL et renferme une protéine cliente ;
- l'anneau *trans* correspond au cylindre GroEL ouvert, non lié à GroES, sans substrat ;
- lorsqu'un anneau *cis* est créé, l'autre devient anneau *trans*, et réciproquement.

▪ Cycle réactionnel

Le cycle du système GroESL débute par la liaison d'une protéine cliente sur l'anneau *trans*, puis la fixation de sept molécules d'ATP [25]. Celles-ci vont induire divers réarrangements du domaine apical de GroEL et favoriser l'encapsulation du substrat protéique. Ce processus se poursuit par le recrutement d'une sous-unité GroES et la fermeture de la cavité, et aboutit ainsi à la création d'un nouvel anneau *cis*. L'interaction de GroES avec le domaine apical de GroEL sur l'anneau *cis* entraîne des réarrangements des domaines apical et intermédiaire. Ils vont à leur tour induire des modifications de la cavité et augmenter son volume. Le substrat encapsulé peut alors se replier dans un espace sécurisé et isolé du contenu cytoplasmique pendant 10 à 15 secondes, temps nécessaire à l'hydrolyse de l'ATP. GroES se dissocie alors de GroESL, tandis que l'ADP et le substrat protéique sont libérés. Les protéines partiellement conformées peuvent ensuite subir un nouveau cycle dans un anneau *trans* (Figure 5.B) [9].

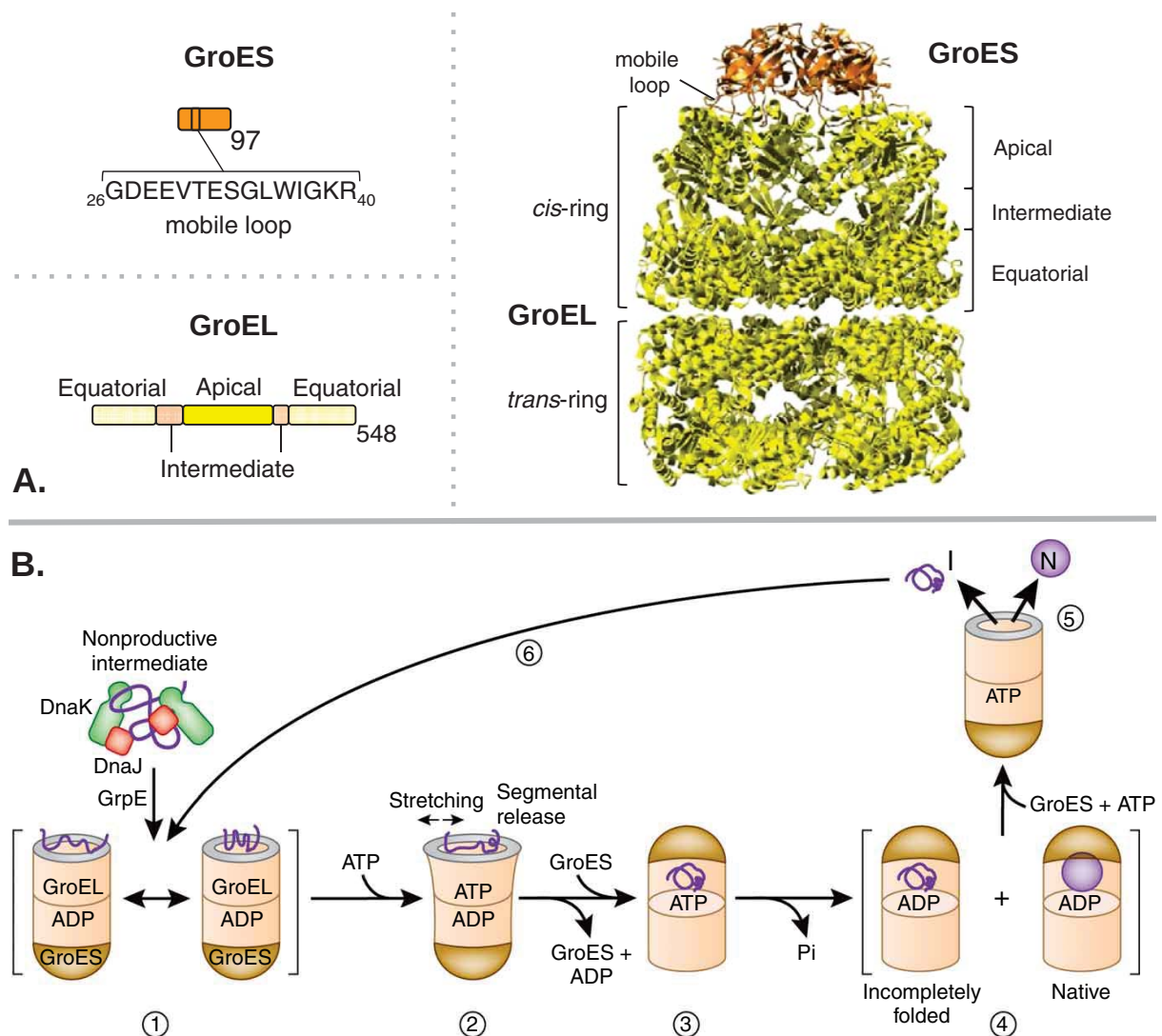


Figure 5. Structure et cycle réactionnel du système chaperon Hsp60 (GroESL)

A. Organisation des domaines protéiques et structure tridimensionnelle de GroEL et GroES [6].

B. Cycle réactionnel du système GroESL [9]. ① Les protéines clientes sont généralement transférées du système DnaKJE vers le système GroESL. Lors de sa liaison à un complexe GroEL, la protéine cliente oscille entre différents états conformationnels, lâches ou compacts. ② La fixation de l'ATP sur ce complexe entraîne un élargissement de la cavité GroEL, permettant à la protéine cliente de pénétrer complètement dans le tunnel. ③ La liaison du complexe GroES termine alors l'encapsulation du substrat. ④ La protéine cliente peut alors se replier dans l'espace isolé que constitue la cavité du complexe GroESL, jusqu'à hydrolyse de l'ATP. ⑤ La dissociation de GroES permet la libération du substrat, dans sa conformation définitive ou non. ⑥ Les protéines imparfaitement conformées peuvent nécessiter un nouveau cycle réactionnel.

Note : le fonctionnement symétrique de GroESL est volontairement omis par souci de simplification.

▪ Substrats

Il a été montré que le système GroESL interagit avec 250 substrats différents, soit approximativement 10% de l'ensemble des protéines cytosoliques [26]. Ces 250 protéines ont été réparties en 4 classes, selon leur dépendance vis-à-vis des systèmes chaperons :

- les protéines de classe I sont indépendantes des systèmes chaperons, mais peuvent dans certaines situations utiliser GroESL pour accélérer leur repliement ;
- les protéines de classe II nécessitent DnaKJE ou GroESL pour leur repliement ;
- les protéines de classe III sont des substrats obligatoires du système GroESL *in vitro* ;
- les protéines de classe IV sont des substrats obligatoires de GroESL confirmés *in vivo*.

▪ Fonctions cellulaires

La machinerie GroESL est impliquée dans le repliement conformationnel des protéines néo-synthétisées en aval des systèmes TF et DnaKJE. Deux mécanismes ont été proposés pour le repliement protéique assuré par le système chaperon Hsp60 :

- la cavité centrale agit comme une cage inerte, au sein de laquelle le repliement des protéines s'exécute à l'abri d'interactions non spécifiques avec le contenu cytosolique pouvant aboutir à la formation d'intermédiaires mal conformés ou d'agrégats [27] ;
- la cavité centrale permet de dénaturer activement les intermédiaires protéiques mal engagés dans le repliement, et de favoriser grâce à plusieurs cycles réactionnels l'obtention de conformations protéiques adéquates [28].

▪ Mutation et phénotypes associés

Parmi les 85 substrats obligatoires de classe III, 57 appartiennent également à la classe IV, et 6 d'entre eux sont des protéines essentielles chez *E. coli*. Ceci peut expliquer le caractère essentiel du système GroESL pour la viabilité bactérienne quelles que soient les conditions [22].

Les mutations viables de l'opéron *groESL* induisent généralement une thermosensibilité, un ralentissement de la croissance et une filamentation [29]. Les mêmes observations ont été retrouvées pour plusieurs espèces bactériennes, soulignant le rôle majeur de GroESL, en aval de TF et DnaKJE, dans le maintien de l'homéostasie protéique cytoplasmique [6].

I. B. 5. Coopération entre les systèmes TF, DnaKJE et GroESL

Les protéines néo-synthétisées peuvent donc être successivement prises en charge par les trois systèmes chaperons Trigger Factor, DnaKJE et GroESL, qui favorisent le repliement protéique *de novo* et forment ainsi un réseau interactif assurant un contrôle qualité co- et post-traductionnel efficace, où l'acteur central est le système DnaKJE [9].

De nombreuses études ont mis en évidence les redondances existantes entre ces trois systèmes. En l'absence de TF, le nombre de substrats de DnaK augmente considérablement, passant de 654 à 998 [21]. De plus, si la délétion de *tig* ou *dnaK* est tolérée par *E. coli*, une souche mutée pour ces deux gènes n'est pas viable à des températures excédant 30°C [15]. Il a par ailleurs été montré que le système GroESL est surexprimé en l'absence de TF et DnaK, et interagit avec 150 substrats supplémentaires [26]. Inversement, un mutant viable de GroESL est caractérisé par une surexpression de DnaKJE et une modification de l'interactome de DnaK [21]. Ces résultats confirment l'interconnexion des trois systèmes.

La [Figure 6](#) synthétise le contrôle qualité des protéines néo-synthétisées assuré par le réseau interactif des systèmes chaperons TF, DnaKJE et GroESL.

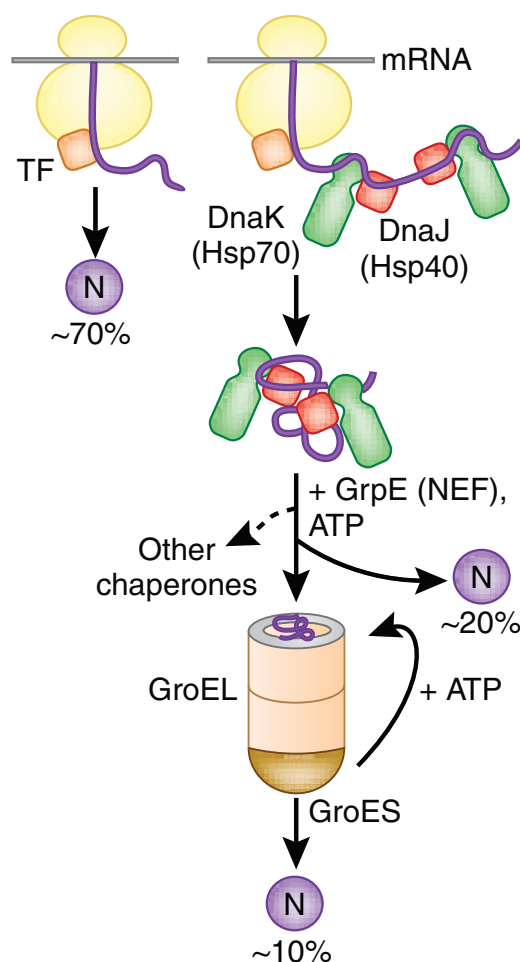


Figure 6. Contrôle qualité des protéines néo-synthétisées

La majorité des protéines néo-synthétisées interagit de manière co-translationnelle avec la protéine Trigger Factor. 70% des protéines sont alors capables d'atteindre leur conformation définitive rapidement après leur synthèse, sans l'intervention d'autres systèmes chaperons. Les protéines de taille plus conséquentes (environ 30%) vont être prises en charge par la machinerie DnaKJE, qui va permettre le repliement de deux tiers d'entre elles grâce à un ou plusieurs cycles réactionnels ATP-dépendants. Les protéines n'ayant pas encore réussi à atteindre leur état natif vont alors être encapsulées par le système GroESL pour leur repliement [9].

I. C. Contrôle qualité des protéines sécrétées

Le cytoplasme n'est pas l'unique compartiment cellulaire chez les bactéries. Elles possèdent également un large compartiment extracytoplasmique : l'enveloppe cellulaire. Les bactéries à Gram négatif comme *E. coli* sont constituées d'une membrane cytoplasmique (membrane interne), d'un compartiment périplasmique, et d'une membrane externe [30]. Le périplasme est un compartiment soluble, pris en sandwich entre les membranes interne et externe, qui représente environ 10% du volume total d'une cellule bactérienne.

Un nombre important de fonctions cellulaires est ainsi assuré dans le périplasme, telles que la synthèse et le renouvellement du peptidoglycane, le métabolisme énergétique ou encore l'assemblage du flagelle et des pili [30]. Ces fonctions nécessitent le transport périplasmique d'un grand nombre de protéines, dont l'homéostasie est parfaitement maintenue grâce aux systèmes du contrôle qualité protéique du périplasme, présentés dans la Figure 7.

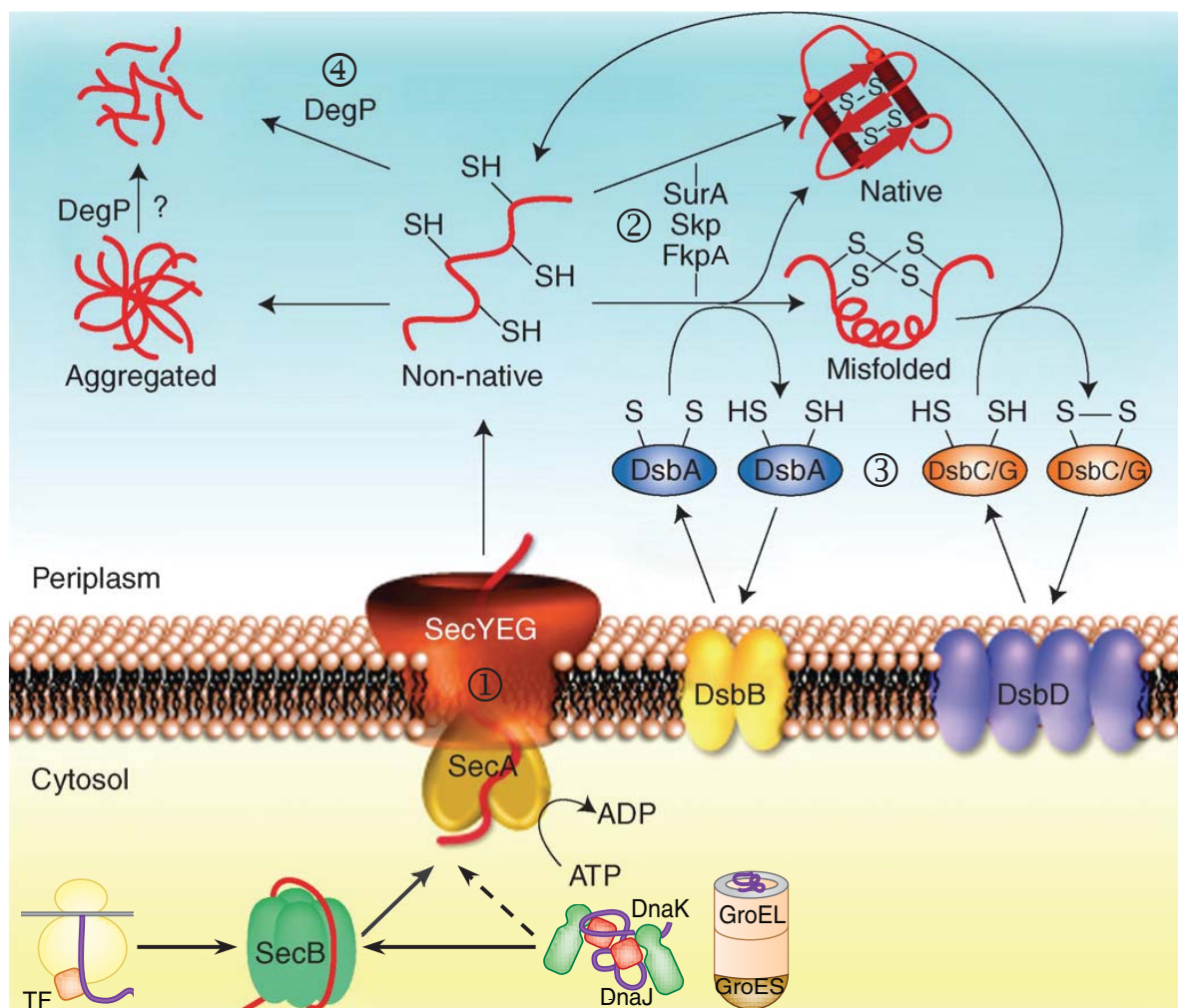


Figure 7. Contrôle qualité des protéines sécrétées

Mécanismes de l'homéostasie protéique périplasmique détaillés pages suivantes. D'après [4].

I. C. 1. Translocation protéique vers le périplasma

La majorité des protéines péripasmiques et de la membrane externe sont transloquées à travers la membrane cytoplasmique grâce à l'action du système Sec (Figure 7 – ①) [31].

Il est pour cela indispensable qu'elles soient maintenues dans un état non conformé le temps de leur séjour dans le cytoplasme. Les chaînes peptidiques naissantes sont ainsi directement transférées du ribosome ou de TF à la protéine chaperon SecB, qui va empêcher le repliement des protéines destinées à l'enveloppe cellulaire [32]. SecB est capable de les distinguer des protéines cytoplasmiques par la reconnaissance d'une séquence signal, mais peut également bénéficier de l'aide des systèmes chaperons TF, DnaKJE et GroESL [21].

Une fois lié à un peptide client, SecB se complexe avec la protéine cytosolique SecA, qui correspond à la partie cytoplasmique de système de translocation Sec. Suite à plusieurs cycles d'hydrolyse de l'ATP, SecA va permettre le transfert de la protéine dans le pore formé par le complexe membranaire SecYEG [33]. La translocation du substrat vers le périplasma est assurée par la force proton-motrice, et facilitée par le complexe SecDFYajC. Au cours du processus, la séquence signal est clivée par une peptidase membranaire. La protéine cliente non conformée se retrouve enfin dans l'espace péripasmique, où elle est prise en charge par différentes protéines chaperons spécifiques qui vont permettre son repliement [33].

I. C. 2. Repliement protéique dans le périplasma

Dans le périplasma, les protéines chaperons SurA, Skp et FkpA interagissent avec les protéines néo-transloquées et favorisent leur repliement conformationnel (Figure 7 – ②).

Il est important de rappeler que l'espace péripasmique, à la différence du cytoplasme, est un compartiment cellulaire dépourvu d'ATP. Les acteurs du contrôle qualité doivent donc assurer l'homéostasie protéique par des processus passifs ne nécessitant pas d'ATP [34].

I. C. 3. Stabilisation des protéines extracytoplasmiques

De nombreuses protéines extracytoplasmiques comportent des liaisons intramoléculaires de type ponts disulfures entre des résidus cystéines de la chaîne peptidique. Une machinerie oxydative spécifique, constituée par les protéines DsbA et DsbB, catalyse la formation de ces ponts disulfures, et est capable d'agir sur ses substrats polypeptidiques pendant ou après le processus de translocation dans le périplasma (Figure 7 – ③) [4].

Une fois que DsbA a oxydé sa protéine cliente par transfert de ponts disulfures depuis son site catalytique, elle est réoxydée par DsbB, ancrée dans la membrane cytoplasmique, qui est elle-même régénérée grâce à la chaîne de transport d'électrons membranaire [35].

Il arrive parfois que la machinerie oxydative favorise la formation de ponts disulfures non compatibles avec la conformation définitive de la protéine cliente. Ces anomalies, qui surviennent le plus souvent pour des protéines riches en résidus cystéines, peuvent être corrigées grâce aux isomérases DsbC et DsbG [35]. Elles catalysent l'isomérisation des liaisons inopportunes, permettant à leurs substrats d'atteindre une conformation adéquate, puis sont régénérées par la réductase membranaire DsbD.

I. C. 4. Protéolyse des protéines périplasmiques

Un autre acteur majeur de l'homéostasie protéique du périplasma est la protéine DegP. Elle présente à la fois des activités de protéine chaperon et de protéase ([Figure 7 – ④](#)) [4].

Lors d'un stress thermique ou en présence de protéines périplasmiques mal conformées, plusieurs formes hexamériques inactives de DegP s'assemblent pour former un complexe dodéca- ou tétracosamérique à activité protéolytique [36]. Ce mégacomplexe en forme de tunnel présente une large cavité interne vers laquelle sont orientés les sites catalytiques de chaque sous-unité de DegP. Si une protéine mal conformée encapsulée dans la cavité ne parvient pas à se replier correctement dans un délai raisonnable, elle subit l'activité protéolytique du système DegP et est entièrement dégradée. DegP semble par ailleurs capable de favoriser la désagrégation des corps d'inclusion périplasmiques, en l'absence d'ATP, par un mécanisme complètement inconnu à ce jour [36].

I. D. Contrôle qualité des protéines en situations de stress

Les bactéries sont confrontées en permanence à diverses conditions environnementales défavorables. Elles doivent donc s'adapter rapidement pour faire face à un choc thermique, un stress oxydatif, une variation de pH..., autant de situations pouvant entraîner la dénaturation voire l'agrégation des protéines, et perturber l'homéostasie protéique [37]. Les bactéries, dont *E. coli*, ont ainsi développé diverses stratégies préventives ou curatives pour répondre aux altérations que peuvent subir les protéines en situations de stress (Figure 8).

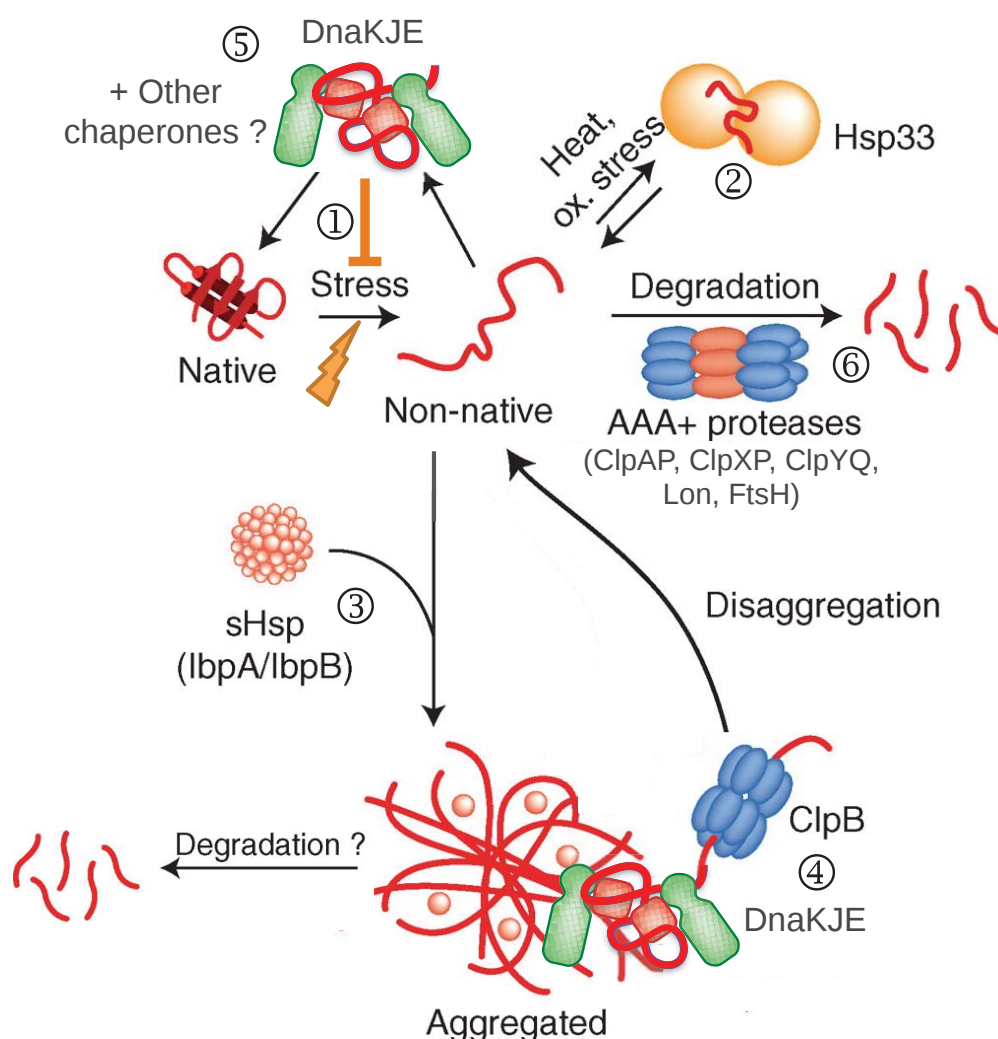


Figure 8. Contrôle qualité protéique en situations de stress

Stratégies de maintien de l'homéostasie protéique en situations de stress détaillées pages suivantes.
D'après [4].

I. D. 1. Mesures préventives

I. D. 1. a. Prévention de la dénaturation

La première stratégie mise en place par le contrôle qualité protéique lors d'un choc thermique consiste à maintenir les protéines en conformation soluble (Figure 8 – ①) [4].

Chez *E. coli*, le système DnaKJE joue un rôle majeur dans la prévention de la dénaturation, probablement grâce à sa concentration cellulaire élevée et son importante capacité de liaison aux substrats [38]. De plus, le cofacteur GrpE, facteur d'échange de nucléotide de DnaK, est inactivé de manière réversible lors d'un choc thermique. Cette inactivation entraîne un important retard de libération des protéines clientes en ralentissant les échanges ATP/ADP, car DnaK reste figé dans sa conformation fermée à haute affinité pour son substrat [39]. GrpE agit ainsi comme un senseur qui favorise le maintien des protéines liées à DnaK durant le stress thermique.

I. D. 1. b. Prévention de l'oxydation

In vivo, un choc thermique est souvent accompagné d'un stress oxydatif. Le maintien de l'homéostasie protéique dans cette situation devient particulièrement complexe, car les systèmes DnaKJE et GroESL sont inactivés en conditions oxydantes [40]. Cette inactivation s'explique par la diminution rapide et massive de la concentration intracellulaire en ATP.

En réponse au stress oxydatif, la protéine Hsp33 va prendre le relais du système DnaKJE (Figure 8 – ②) [40]. Cette protéine chaperon, conservée et largement retrouvée chez les bactéries, possède un mécanisme d'activation particulier. Elle présente dans son site actif quatre résidus cystéine qui stabilisent un atome de Zinc en coordination tétraédrique en conditions physiologiques. Lors d'une exposition concomitante à une température élevée et un stress oxydatif, Hsp33 subit d'importantes modifications structurales secondaires à l'oxydation des cystéines en ponts disulfures intermoléculaires. La protéine dimérisée présente ainsi une activité chaperon ATP-indépendante par formation de complexes stables avec ses substrats [41].

En conditions redevenues normales, le site actif de Hsp33 va être réduit grâce à l'action de réductases cellulaires. Pour autant, elle reste complexée à ses substrats. Leur libération va alors nécessiter l'action du système DnaKJE, qui intervient dès que le taux d'ATP cellulaire atteint à nouveau des concentrations suffisantes pour permettre le repliement protéique [40].

I. D. 1. c. Modulation de l'agrégation

Lorsque les capacités des systèmes DnaKJE et Hsp33 sont dépassées, les protéines vont être potentiellement dénaturées. En situation de stress prolongé, ces protéines altérées peuvent même former des agrégats protéiques, dont la dissociation est particulièrement complexe et énergivore pour la bactérie.

Afin de limiter ce processus, le contrôle qualité met en jeu les protéines IbpA et IbpB, deux chaperons moléculaires de 16 kDa qui constituent la famille des petites protéines de choc thermique (*small Heat shock proteins*, sHsps) (Figure 8 – ③) [42]. Ces deux protéines fonctionnent conjointement sous forme hétérodimérique, en fixant des protéines clientes mal conformées et en les séquestrant dans un état non conformé. Au fur et à mesure que les substrats sont recrutés, les complexes s'agrandissent jusqu'à former des agrégats protéiques organisés, dont la dissolution par le système ClpB/DnaK sera ensuite facilitée (*cf.* § I. D. 2. a).

La production des protéines IbpA et IbpB est fortement induite lors d'un choc thermique. Leur activation est de plus facilitée par l'élévation de température, qui favorise leur oligomérisation et augmente leur affinité pour les protéines clientes altérées [43].

I. D. 2. Mesures curatives

I. D. 2. a. Désagrégation protéique

Des conditions de stress sévères ou prolongées vont conduire à l'accumulation d'agrégats protéiques après saturation des systèmes et des stratégies préventives évoqués ci-dessus. Cependant, l'action combinée de la protéine chaperon ClpB et du système DnaKJE assure le sauvetage des protéines contenues dans ces agrégats, d'abord par resolubilisation, puis grâce à une nouvelle étape de repliement conformationnel (Figure 8 – ④) [44].

Le processus de désagrégation requiert l'intervention séquentielle de DnaKJE puis ClpB (Figure 9). La fixation initiale de DnaK sur l'agrégat protéique en limite l'accès pour les protéases et les autres systèmes chaperons, et facilite l'aiguillage des peptides agglomérés vers ClpB (i) [45]. ClpB exerce alors une force de traction sur la protéine à solubiliser, l'obligeant à traverser son pore central et à s'extraire de l'agrégat protéique dans lequel elle était piégée (ii). Ce processus actif ATP-dépendant sera ainsi répété afin d'extraire les peptides un par un jusqu'à dissolution complète de l'agrégat (iii) [46]. Ils subiront ensuite l'action d'autres systèmes chaperons pour retrouver leur conformation active (iv).

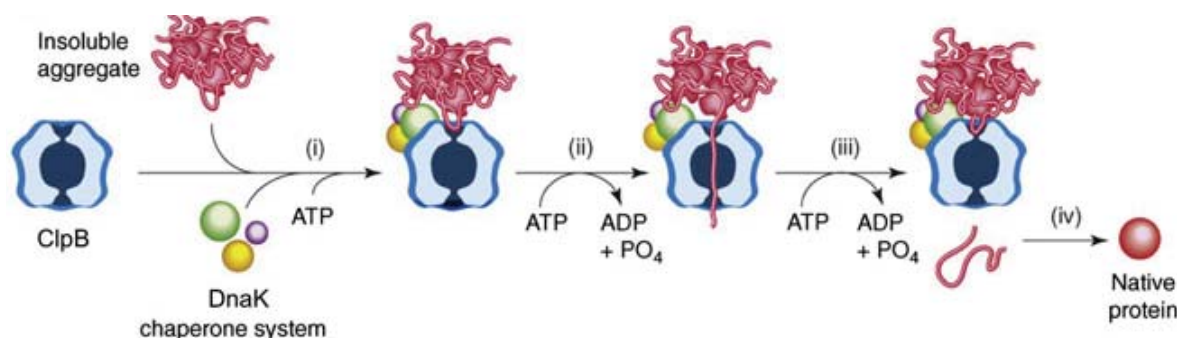


Figure 9. Mécanisme de désagrégation protéique par ClpB et DnaKJE

Étapes du processus de désagrégation protéique détaillées page précédente [46].

I. D. 2. b. Repliement conformationnel

Si les protéines dénaturées lors d'un stress et celles resolubilisées par ClpB et DnaKJE n'ont pas subi d'altérations trop importantes, elles peuvent être à nouveau conformées par l'action d'un ou plusieurs systèmes chaperons (Figure 8 – ⑤).

Les systèmes DnaKJE et GroESL, impliqués dans le repliement des protéines *de novo*, sont également nécessaires au repliement des protéines dénaturées pour acquérir à nouveau une conformation adéquate [34]. Ils ont été largement décrits plus haut (*cf.* § I. B. 3 et § I. B. 4).

La protéine chaperon Hsp90_{Ec}, encore appelée HtpG, semble également impliquée dans le repliement des protéines mal conformées suite à un stress [47]. Les fonctions de cette protéine chaperon ATP-dépendante, analogue procaryote du système Hsp90 largement étudié chez les organismes eucaryotes, sont pour le moment mal définies. La plupart des articles faisant une revue de la littérature sur le contrôle qualité protéique chez les bactéries excluent d'ailleurs Hsp90_{Ec} dans la description du réseau de protéines chaperons [4, 6, 33, 34]. Nous faisons le choix de lui consacrer une section entière (*cf.* § II – LA MACHINERIE Hsp90).

I. D. 2. c. Elimination des protéines mal conformées

Il est fréquent que les protéines aient subi des altérations majeures ou irréversibles, auquel cas les systèmes chaperons ne seront pas capables de restaurer leur conformation. Ces protéines endommagées sont alors prises en charge par l'une des 5 protéases de *E. coli* : ClpAP, ClpXP, ClpYQ, Lon ou FtsH (Figure 8 – ⑥) [48].

Ces 5 systèmes protéasiques sont tous composés de 2 unités à activités distinctes [48] :

- une unité à activité de chaperon moléculaire recrutant les substrats ;
- une unité à activité de protéase en forme de tunnel dégradant les substrats.

Ces deux activités peuvent être portées par une seule chaîne protéique, comme pour les protéases Lon et FtsH. Les autres systèmes, ClpAP, ClpXP et ClpYQ, sont constitués de deux chaînes protéiques : ClpA, ClpX et ClpY correspondent à l'activité chaperon, ClpP et ClpQ à l'activité protéasique [48].

Les protéases sont impliquées dans la dégradation des protéines trop altérées pour être de nouveau conformées, dans certains cas dans la dissolution des agrégats protéiques, mais également dans la protéolyse de nombreux régulateurs de voies de signalisations [4]. Elles sont donc impliquées dans la régulation de divers processus cellulaires, et notamment dans la régulation du contrôle qualité protéique et la réponse au choc thermique (*cf.* § I. E).

Le processus protéolytique, présenté Figure 10, débute par la reconnaissance de la protéine cliente à dégrader par l'unité à activité chaperon. Elle procède alors au dépliement conformationnel du substrat, qui traverse alors un canal protéique formé par cette unité protéique, jusqu'à pénétrer ensuite dans la chambre catalytique de l'unité protéasique [48]. La chaîne peptidique est ici fragmentée en petits peptides et acides aminés, qui seront recyclés pour la synthèse d'autres protéines.

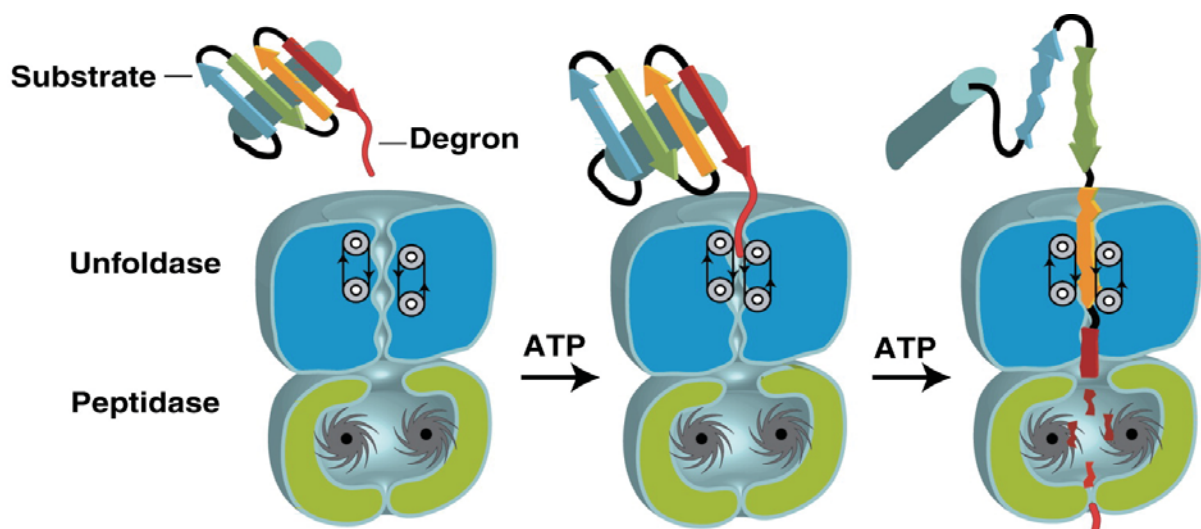


Figure 10. Mécanisme de dégradation protéique par une protéase

Étapes du processus de protéolyse détaillées dans le paragraphe précédent [48].

I. D. 2. d. Elimination des agrégats protéiques

Il peut arriver qu'un agrégat protéique ne puisse pas être résolu par l'action des protéines chaperons ou des protéases [49]. Ces agrégats, composés de nombreuses protéines altérées, ont alors tendance à grossir en interagissant avec d'autres protéines mal conformées. Leur persistance est potentiellement dangereuse pour la cellule, car ils servent de support à l'agrégation de nouvelles protéines, séquestrent généralement divers acteurs du contrôle qualité protéique, et ralentissent la multiplication cellulaire [50].

Les organismes vivants ont ainsi développé une stratégie face à cette agrégation terminale : la réorganisation asymétrique (Figure 11) [51]. L'agrégat protéique insoluble va d'abord être délocalisé vers un des pôles de la cellule. Lors de la division cellulaire, une seule des deux cellules filles obtenues possédera cet agrégat. Cette cellule présentera une croissance lente, alors que l'autre ne sera pas impactée puisqu'aucun agrégat protéique ne ralentira sa division [50]. La délocalisation de l'agrégat à l'un des pôles cellulaires implique vraisemblablement un processus énergétique actif qui n'a pour le moment pas été élucidé.

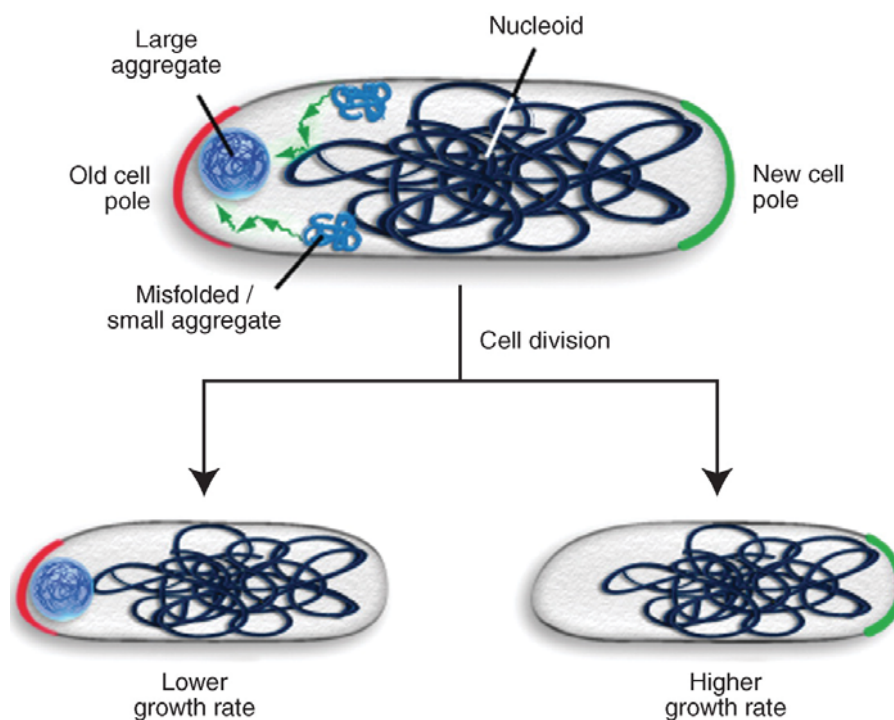


Figure 11. Élimination des agrégats protéiques par réorganisation asymétrique

Étapes du processus de réorganisation asymétrique détaillées dans le paragraphe précédent [4].

I. E. Régulation du contrôle qualité des protéines

Les organismes procaryotes sont fréquemment soumis à des fluctuations importantes et rapides des conditions environnementales dans lequel ils évoluent. *E. coli* par exemple doit survivre à l'augmentation de température subie lors de l'entrée dans un organisme mammifère, puis à l'acidité soudaine du contenu gastrique, suivie d'un retour rapide à un pH alcalin dans le duodénum, pour enfin tenter de s'implanter dans le tube digestif de son hôte.

Les différents stress rencontrés au cours de ce processus d'invasion vont non seulement interrompre le repliement des protéines néo-synthétisées, mais également dénaturer les protéines préalablement conformées. Les bactéries ont ainsi dû développer des réponses sophistiquées aux situations de stress, afin d'assurer au mieux et rapidement le maintien de l'homéostasie protéique en toutes conditions.

La situation la mieux caractérisée chez *E. coli* est la réponse au choc thermique (*Heat Shock Response*, HSR). Elle comprend deux systèmes majeurs, décrits dans la [Figure 12](#) [4] :

- un système d'ARN messagers thermosensibles ;
- un système de régulateurs transcriptionnels contrôlés par chaperons et protéases.

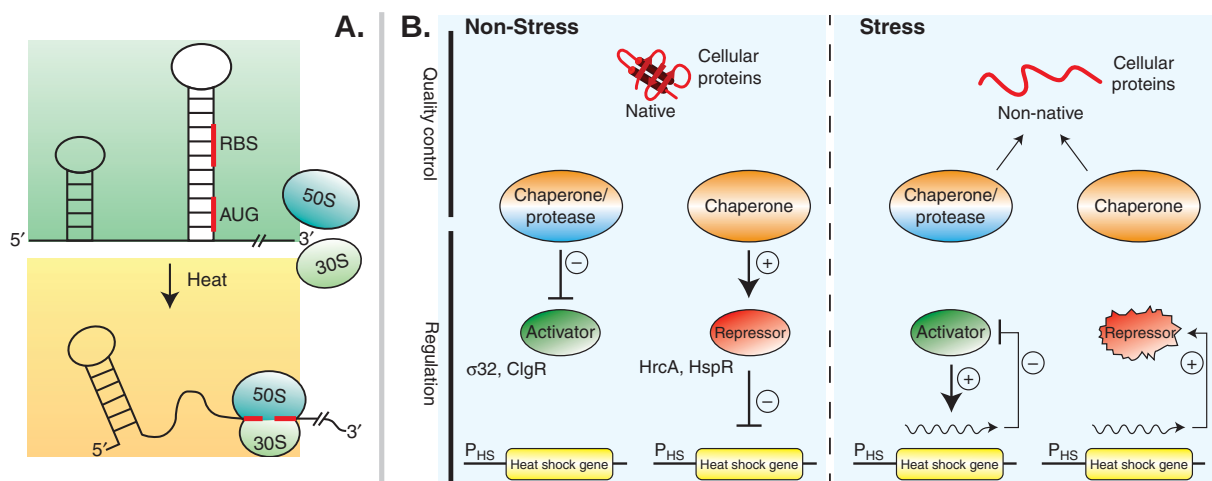


Figure 12. Mécanismes de régulation de la réponse au choc thermique

A. ARN thermosensibles : mécanisme d'action détaillé page suivante [4].

B. Régulateurs transcriptionnels : système de régulation détaillé page suivante [4].

I. E. 1. ARN thermosensibles

Les ARN thermosensibles (ou « ARN thermomètres ») sont des systèmes de contrôle de la synthèse des protéines de stress [52]. En situation physiologique, la séquence d'initiation de la traduction et le codon d'initiation, présents sur l'ARN messager de la protéine concernée, sont rendus inaccessibles pour le ribosome par la formation de structures en épingle à cheveux. Une élévation de température, lors d'un choc thermique par exemple, va altérer cette structure en épingle et dévoiler le site d'initiation de la traduction, sur lequel va venir se fixer le ribosome pour commencer la traduction et synthétiser la protéine de stress codée par cet ARN thermosensible (Figure 12.A).

L'ARN messager du gène *rpoH* est l'un des ARN thermosensibles impliqués dans la régulation de la réponse au stress. Il code le facteur de transcription central σ^{32} , qui contrôle l'expression d'environ 90 gènes impliqués dans la réponse au choc thermique [53]. Les ARN messagers codant les protéines chaperons IbpA et IbpB sont également thermosensibles [52].

I. E. 2. Contrôle des régulateurs transcriptionnels

L'expression de la quasi-totalité des protéines de choc thermique est contrôlée par le régulateur transcriptionnel central σ^{32} . La quantité cellulaire de ce régulateur doit donc être finement régulée pour que la synthèse de protéines de choc thermique soit adaptée aux conditions de stress environnementales. Cette modulation est assurée par les chaperons et les protéases eux-mêmes, selon le modèle de titration des protéines non conformées [54].

En conditions physiologiques, le régulateur σ^{32} est séquestré par les systèmes chaperons DnaKJE et GroESL ou dégradé par la protéase FtsH (Figure 12.B) [4]. Lors d'un choc thermique, ces chaperons et protéases vont rapidement être saturés par les protéines dénaturées, et n'exerceront plus leur contrôle sur σ^{32} . Ce dernier va alors pouvoir s'associer à l'ARN polymérase et favoriser l'expression des gènes du choc thermique [55]. Cette régulation inclut ainsi une boucle de régulation négative, par l'induction des protéines chaperons et des protéases qui ajustent finement la concentration cellulaire du régulateur transcriptionnel, afin d'éviter un emballement de la réponse au stress.

II – LA MACHINERIE Hsp90

II. A. Généralités

Hsp90 est une protéine chaperon ATP-dépendante ubiquitaire, hautement conservée, et abondamment exprimée. Elle participe au contrôle qualité des protéines cytosoliques en favorisant leur repliement conformationnel. Hsp90 appartient à la famille des protéines de choc thermique (*Heat shock proteins*, Hsps), qui sont induites en réponse à une élévation de température ou d'autres situations de stress pour assurer le maintien de l'homéostasie protéique intracellulaire.

La famille Hsp90 est retrouvée chez tous les organismes eucaryotes et procaryotes, et peut ainsi être divisée en 5 sous-familles selon la localisation : Hsp90 cytosolique eucaryote, Grp94 dans le réticulum endoplasmique, Trap1 mitochondriale, Hsp90c au niveau des chloroplastes, et HtpG présente chez les bactéries [56]. Cette famille est de plus hautement conservée. La comparaison des séquences entre les différents analogues montre par exemple 40% d'identité de séquence et 55% de similitudes entre Hsp90 humaine et HtpG [57].

Chez *Escherichia coli*, l'analogue procaryote de Hsp90, codé par le gène *htpG*, est appelé HtpG, pour *High temperature protein G*, ou encore Hsp90_{Ec}, notation qui sera utilisée ici. Cette protéine est abondamment exprimée en conditions normales de croissance, et est de plus induite au cours d'un choc thermique [58]. Son taux peut également être modifié selon la disponibilité des nutriments dans le milieu extracellulaire [59].

Si Hsp90 est essentielle chez les organismes eucaryotes, Hsp90_{Ec} n'est pas indispensable à la viabilité et la survie chez *E. coli*, même en conditions de stress. Un ralentissement de la croissance est cependant observé lorsque la température de culture dépasse 40°C [60]. L'induction d'un stress thermique augmente aussi considérablement le nombre de protéines agrégées chez une souche de *E. coli* mutée pour *htpG* [47].

Cette partie propose de faire une revue de la littérature sur la protéine chaperon Hsp90_{Ec}. Si les données structurales sont relativement abondantes, le mécanisme d'action, les substrats et les fonctions cellulaires de cet analogue procaryote sont moins bien connus.

II. B. Structure et cycle réactionnel

Hsp90_{Ec} est une protéine active sous forme dimérique. Chaque homodimère est constitué par 3 domaines protéiques (Figure 13.A) [56] :

- le domaine N-terminal (*N-Terminal Domain*, NTD) comporte le site de liaison au nucléotide (NBD), impliqué dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP, ainsi qu'une région formant un couvercle pour la cavité protéique du NBD [61] ;
- le domaine intermédiaire (*Middle Domain*, MD) assure la jonction entre les domaines N et C-terminaux, et est responsable de la flexibilité de la molécule [61] ;
- le domaine C-terminal (*C-Terminal Domain*, CTD) est nécessaire à la dimérisation de la protéine chaperon [62].

La structure tridimensionnelle de Hsp90 est conservée chez les organismes eucaryotes et procaryotes [63]. Cependant, contrairement à son homologue eucaryote, Hsp90_{Ec} ne possède pas de domaine de liaison *linker* entre les domaines NTD et MD, ni de motif conservé MEEVD à l'extrémité N-terminale, deux éléments essentiels aux interactions entre la machinerie Hsp90 et ses co-chaperons [56]. Ceci explique que Hsp90_{Ec} fonctionne de manière indépendante, à la différence des analogues eucaryotes de Hsp90, qui nécessitent l'aide de nombreuses protéines co-chaperons pour fonctionner correctement [64].

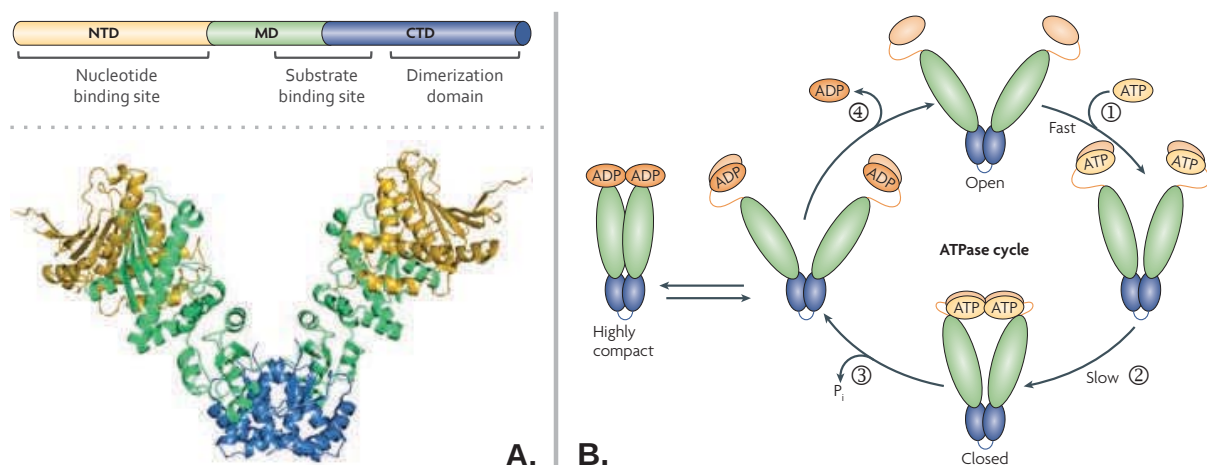


Figure 13. Structure et cycle réactionnel de la protéine chaperon Hsp90_{Ec}

- A. Organisation des domaines protéiques et structure tridimensionnelle de Hsp90_{Ec}. D'après [56].
- B. Cycle ATPasique de Hsp90_{Ec} [56]. ① & ② La fixation d'ATP sur Hsp90_{Ec} induit une transition en 2 étapes entre les conformations ouverte et fermée de la protéine chaperon. ③ L'hydrolyse de l'ATP en ADP entraîne une compaction transitoire suivie d'un relâchement conformationnel de Hsp90_{Ec}. ④ La dissociation de l'ADP permet le retour de Hsp90_{Ec} en conformation ouverte.

Une récente étude a permis de mettre en évidence une région très conservée de Hsp90_{Ec}, essentielle pour la liaison des protéines clientes, et composée par plusieurs résidus d'acides aminés, présents au niveau des domaines intermédiaire et C-terminal, et exposés à la surface de la protéine [65]. Ces résidus semblent importants à la fois pour l'interaction avec la protéine cliente, mais également pour son remodelage.

La protéine chaperon Hsp90_{Ec} est une molécule très flexible, pouvant subir de nombreux réarrangements, qui compliquent particulièrement la détermination de sa structure [66, 67]. Des analyses structurales ont montré que la protéine chaperon Hsp90_{Ec} présente une conformation en forme de « V » lorsqu'elle n'est pas liée à un nucléotide ou un substrat [63]. L'angle d'ouverture de la protéine libre est d'environ 75°, mais peut aller jusqu'à 120° dans certaines conditions ioniques [68].

Hsp90_{Ec} est une protéine chaperon ATP-dépendante, et présente un cycle réactionnel qui passe par plusieurs états structuraux relativement conservés entre les organismes vivants (Figure 13.B) [69]. La liaison d'ATP sur Hsp90_{Ec} induit une diminution de l'angle d'ouverture, jusqu'à aboutir à une conformation fermée de la molécule, dans laquelle les NTD de chaque monomère interagissent [63]. Hsp90_{Ec} présente également une activité ATPasique, bien que relativement faible, au niveau du domaine N-terminal [70]. L'hydrolyse de l'ATP en ADP induit alors une compaction importante puis un relâchement de la molécule. Ceci permet la libération de l'ADP et la restauration de la conformation ouverte de Hsp90_{Ec} non liée [63, 71]. La liaison d'une protéine cliente pourrait également induire des réarrangements moléculaires, non caractérisés pour le moment, mais aussi potentialiser l'activité ATPasique de Hsp90_{Ec} [72].

II. C. Fonctions cellulaires et protéines clientes

Hsp90 est une protéine chaperon essentielle chez les organismes eucaryotes, impliquée dans divers processus cellulaires, tels que le trafic protéique, la transduction de signaux ou la maturation de récepteurs [73]. Elle agit en facilitant le remodelage, l'activation et la régulation de plus de 200 protéines clientes, avec l'assistance de nombreux co-chaperons [56].

Les fonctions cellulaires et les protéines clientes de Hsp90_{Ec} sont beaucoup moins connues. Deux études de l'interactome de Hsp90 chez *E. coli*, réalisées par Butland *et al.* en 2005 [74], et par Arifuzzaman *et al.* en 2006 [75], ont pourtant permis d'identifier respectivement 15 et 54 candidats potentiels. Cependant, seuls deux substrats sont communs aux deux études, et aucune protéine cliente n'a pour le moment été confirmée.

▪ Fonctions cellulaires et substrats caractérisés à ce jour chez *E. coli*

L'unique protéine cliente interagissant avec Hsp90_{Ec} identifiée et confirmée chez *E. coli* est la protéine ribosomale L2, un composant essentiel de la sous-unité ribosomale 50S [76]. Dans cette étude, Hsp90_{Ec} reconnaît spécifiquement la protéine L2 grâce à une région comprise entre les domaines MD et CTD, et son activité ATPasique est augmentée d'un facteur 10 environ. Ces données sont en accord avec les études ayant respectivement caractérisé le site de liaison aux substrats [65] et montré que la liaison d'une protéine cliente potentialise l'activité ATPasique de la protéine chaperon Hsp90_{Ec} [72].

Par ailleurs, plusieurs études ont récemment démontré que Hsp90_{Ec} est nécessaire au bon fonctionnement de différents systèmes et processus cellulaires, sans pour autant clairement identifier le(s) partenaire(s) protéique(s) interagissant directement avec la protéine chaperon.

Hsp90_{Ec} est ainsi essentiel à l'activité du système CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), un important système de protection bactérien vis-à-vis des virus et des transferts horizontaux d'ADN et d'ARN [77]. Il confère aux bactéries une immunité adaptative qui module l'intégration d'acides nucléiques étrangers dans leur propre génome. Yosef *et al.* ont démontré dans cette étude que le système CRISPR était inactivé dans une souche mutée pour le gène *htpG*. Cette inactivation est liée à une diminution du niveau d'expression de la protéine Cas3 (protéine de la famille Cas, *CRISPR-associated proteins*). Dans ce système, la protéine chaperon Hsp90_{Ec} semble donc jouer le rôle de régulateur positif.

Afin de déterminer d'autres fonctions cellulaires de Hsp90_{Ec} chez *E. coli*, Grudniak *et al.* ont récemment étudié les modifications phénotypiques observées chez une souche mutée pour *htpG* [78]. Ils ont pu démontrer que cette souche présente une diminution de synthèse et de stabilité d'enzymes de types β -lactamases ou phosphatases alcalines, ainsi qu'une altération de la capacité à former des biofilms lorsque la température dépasse 42°C [78]. De précédentes études ont également mis en évidence le rôle de Hsp90_{Ec} dans divers processus cellulaires, tels que la protection contre le stress oxydatif ou la motilité, grâce à l'étude phénotypique de souches sur- ou sous-exprimant Hsp90_{Ec} [79–81].

Le rôle de Hsp90_{Ec} dans la motilité bactérienne est probablement lié à son implication dans l'assemblage de moteur flagellaire chez *E. coli* [82]. Li *et al.* ont en effet montré que Hsp90_{Ec} semble interagir avec Flil et FlhN, deux protéines oligomériques intégrées au sein du complexe formant le moteur flagellaire. Ainsi, la protéine chaperon Hsp90 procaryote pourrait être impliquée dans l'assemblage de volumineux complexes multimériques.

▪ Fonctions cellulaires et substrats caractérisés chez d'autres espèces bactériennes

L'analogue procaryote de Hsp90 est également nécessaire au fonctionnement de systèmes et complexes multimériques chez d'autres espèces bactériennes. HtpG est en effet impliqué dans la formation du phycobilisome, un complexe protéique participant à la photosynthèse chez *Synechococcus elongatus* [83]. La protéine chaperon interagit directement avec la protéine de liaison L_R30, qui s'intercale entre deux protéines chargées de capter la lumière.

D'autres études ont également montré que HtpG était impliquée dans l'assemblage de molécules complexes, appartenant à la famille chimique particulière des composés de type polycétides – peptides non ribosomiaux (*PolyKetides – Non Ribosomal Peptides*, PK-NRP). Ces molécules non protéiques sont produites par des machineries enzymatiques complexes. HtpG est ainsi impliquée dans la synthèse de l'albicidine, un antibiotique synthétisé par *Xanthomonas albilineans* [84], et de l'arthrofactine, un lipopeptide de *Pseudomonas* sp. nécessaire à la formation du biofilm [85]. Le mécanisme d'action de la protéine chaperon dans la synthèse de ces deux composés n'a pas été identifié. Les auteurs proposent que HtpG pourrait participer à l'assemblage des machineries enzymatiques, favoriser le repliement de certaines enzymes impliquées dans ces voies de biosynthèse, ou encore être impliquée dans la régulation de la production de ces molécules [84–86].

Le rôle de HtpG en tant que régulateur a été précédemment mis en évidence pour la synthèse des molécules à noyau tétrapyrrole [87]. Chez *Synechococcus elongatus*, HtpG interagit en effet *in vitro* et *in vivo* avec l'uroporphyrinogène décarboxylase, nommée HemeE, et semble réguler l'activité de cette enzyme.

La stratégie visant à étudier les modifications phénotypiques induites par la mutation du gène *htpG*, codant l'analogue procaryote de la protéine chaperon Hsp90, a été employée chez de nombreuses espèces bactériennes pour identifier d'autres fonctions cellulaires. HtpG est ainsi importante pour l'adaptation à diverses conditions de stress (choc thermique, acclimatation au froid, stress oxydatif, ...) chez les cyanobactéries [88, 89]. Des résultats similaires ont été retrouvés pour d'autres espèces bactériennes, telles que *Bacillus subtilis* [90], *Clostridium acetobutylicum* [91], *Edwardsiella tarda* [92], *Vibrio vulnificus* [93], ou encore certaines γ -protéobactéries psychrophiles [94].

Enfin, trois études récentes ont montré l'implication de HtpG dans la virulence de *Edwardsiella tarda* [92], de *Francisella tularensis* [95] et de *Leptospira interrogans* [96] (cf. § II. E).

II. D. Collaboration avec d'autres systèmes chaperons

La présentation du contrôle qualité des protéines dans la première partie (*cf.* § I –) a clairement démontré que les différents systèmes chaperons collaborent étroitement pour former un réseau interactif indispensable au maintien de l'homéostasie protéique chez *E. coli*.

La protéine chaperon Hsp90 n'échappe pas à cette règle. Chez les organismes eucaryotes, Hsp90 interagit avec de nombreux co-chaperons pour assurer le repliement de ses substrats. Chez *E. coli* pourtant, aucune protéine co-chaperon de Hsp90_{Ec} n'a été identifiée à ce jour. Une étude récente a cependant permis de mettre en évidence *in vitro* une collaboration entre les systèmes DnaKJE et Hsp90_{Ec} dans la réactivation de protéines dénaturées suite à un choc thermique ou chimique [70]. Genest *et al.* ont ainsi montré que la luciférase ayant subi une inactivation thermique peut être réactivée grâce à l'intervention séquentielle de DnaKJE puis de Hsp90_{Ec}. L'activité ATPasique des deux systèmes est indispensable à ce processus.

Ces données ont été renforcées par l'analyse du réseau de protéines chaperons de *E. coli* réalisée par Kumar *et al.*, qui ont en effet confirmé l'interaction entre DnaK et Hsp90_{Ec} [97]. Ils ont ainsi proposé un modèle organisationnel du réseau de chaperons et de protéases dans la prise en charge des protéines dénaturées, qui intègre enfin Hsp90_{Ec} (Figure 14). Des résultats similaires ont été obtenus chez *Synechococcus elongatus*, où HtpG interagit directement avec DnaK et DnaJ pour permettre le repliement de protéines dénaturées [98].

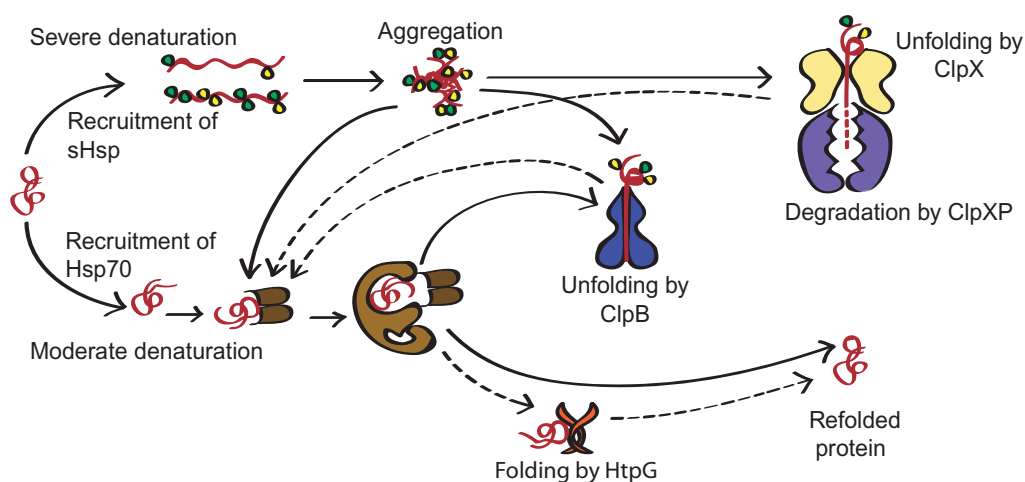


Figure 14. Modèle du contrôle qualité des protéines dénaturées intégrant Hsp90_{Ec}

En fonction de la sévérité des dommages induits par une dénaturation thermique, une protéine peut suivre deux voies majeures. Dans le cas d'une altération sévère, elle forme des agrégats organisés grâce à l'action des sHsps IbpA et IbpB. Ces agrégats sont ensuite soit dégradés par l'action de protéases (ClpXP par exemple), soit résolus par l'action de la désagrégase ClpB. Lorsque les dommages sont moins sévères, la protéine est recrutée par le système DnaKJE, qui va favoriser son repliement, avec l'aide de ClpB ou encore de Hsp90_{Ec} [97].

II. E. Pathologies associées et cible thérapeutique

L'implication de Hsp90 dans diverses pathologies est aujourd'hui clairement établie. L'exemple le plus étudié actuellement est sans aucun doute le rôle de Hsp90 dans le cancer. Une multitude de protéines clientes de Hsp90 humaine est en effet impliquée dans de nombreuses voies de signalisation à potentiel oncogénique [99]. Hsp90 est désormais considérée comme une cible thérapeutique particulièrement séduisante, ce qui a justifié le développement de stratégies d'inhibition. Des inhibiteurs spécifiques de l'activité ATPasique de Hsp90 ont été identifiés, tels que la geldanamycine, le radicicol ou la novobiocine [100]. L'inhibition de l'activité du système chaperon favorise la dégradation des protéines clientes par le protéasome, neutralisant de fait les voies de signalisation où elles sont impliquées. De nombreux essais cliniques sont en cours afin d'évaluer le potentiel anti-tumoral et anti-prolifératif de ces inhibiteurs et de leurs dérivés.

Ces dernières années, le rôle de Hsp90 a également été rapporté dans les pathologies neuro-dégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson, dont le développement est corrélé à l'accumulation de fibres amyloïdes [101]. La formation de ces composés amyloïdes semble associée à un dérèglement du contrôle qualité des protéines. De récents essais cliniques ont montré que l'inhibition de Hsp90 induit une activation secondaire d'autres systèmes chaperons, mais surtout favorise la dégradation des agrégats protéiques par le protéasome, diminuant la quantité de structures fibrillaires et donc la symptomatologie de ces pathologies dégénératives [99].

De nombreuses études évaluant le rôle des protéines chaperons dans la virulence de micro-organismes pathogènes ont également vu le jour [102]. L'induction de la réponse au stress lors du processus infectieux a en effet été démontrée chez divers agents pathogènes, bactériens, fongiques, parasitaires ou viraux. Le rôle de Hsp90 a été particulièrement étudié dans le processus infectieux de pathogènes protozoaires majeurs, dont *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* ou *Trypanosoma cruzi* [103]. La protéine chaperon semble indispensable aux transitions entre les différents stades du cycle parasitaire de ces protozoaires. Les inhibiteurs décrits précédemment sont actuellement en phase de test pour confirmer le potentiel de Hsp90 comme cible thérapeutique dans les infections parasitaires.

Concernant les champignons pathogènes, un récent rapport présente l'inhibition de Hsp90 comme une stratégie thérapeutique intéressante pour potentialiser l'efficacité des molécules antifongiques existantes, mais aussi bloquer l'évolution des résistances aux traitements [104].

Trois études récentes ont par ailleurs mis en évidence l'implication de l'analogue procaryote de Hsp90 dans la virulence de bactéries pathogènes. HtpG est en effet primordiale à *Edwardsiella tarda*, bactérie pathogène des poissons, pour faire face aux conditions de stress rencontrées chez l'hôte lors du processus infectieux [92]. Dang *et al.* ont montré que la mutation du gène *htpG* entraîne une réduction majeure de la dissémination systémique de la souche et une moindre résistance à l'effet bactéricide des macrophages, dans un modèle d'infection *in vivo* chez le poisson plat *Paralichthys olivaceus*.

HtpG est également impliquée dans la virulence de *Francisella tularensis*, bactérie capable de leurrer le système immunitaire inné de l'hôte et de se multiplier dans les macrophages [95]. Une souche mutée pour *htpG* présente une altération importante de la capacité à persister dans la rate et à induire une cytotoxicité macrophagique dans un modèle murin de sepsis. Enfin, King *et al.* ont récemment décrit que la protéine chaperon HtpG est un facteur de virulence de *Leptospira interrogans* dans un modèle aiguë de leptospirose chez le hamster, bien que son rôle dans la pathogenèse reste inconnu [96].

La littérature sur le rôle de Hsp90 procaryote dans la virulence bactérienne reste pour le moment anecdotique. Mais si son implication dans la pathogénicité de bactéries impliquées en médecine humaine ou animale venait à s'enrichir dans un futur proche, à l'image de ce qu'il est maintenant décrit chez les autres classes de micro-organismes pathogènes, HtpG pourrait bien devenir une cible anti-infectieuse intéressante comme l'est aujourd'hui son analogue humain dans le cancer.

L'étude expérimentale que nous allons maintenant présenter se propose d'étudier le rôle de Hsp90_{Ec} dans la virulence de certaines souches de *Escherichia coli*, et de tenter d'élucider les mécanismes dans lesquels elle est impliquée.

TRAVAIL EXPERIMENTAL

I – INTRODUCTION

Escherichia coli est une bactérie commensale de la microflore intestinale. Elle colonise le tube digestif du nouveau-né dès la naissance, puis devient la bactérie aéro-anaérobie facultative subdominante du microbiote intestinal de l'homme adulte [105]. Certaines souches de *E. coli* présentent également un potentiel pathogène considérable, provoquant diverses infections intestinales (diarrhées) mais aussi extra-intestinales (infections urinaires, sepsis, méningites néonatales, ...) [106].

La frontière entre commensalisme et pathogénicité est cependant très floue : les souches commensales et pathogènes possèdent en effet des facteurs de virulence communs, tels que pili, capsule, sidérophores et autres toxines. Ils participent à l'adaptation de la bactérie à son environnement, favorisant par exemple son implantation dans l'intestin en portage commensal, ou encore sa survie dans le sang lors d'un sepsis [105].

Un grand nombre de ces facteurs de virulence est codé par des éléments génétiques mobiles aisément transmissibles, tels que les plasmides, les phages, les transposons, ou encore les îlots génomiques [106]. Grâce à l'importante plasticité de son génome, *E. coli* est capable d'acquérir facilement ces éléments génétiques, ce qui explique l'hétérogénéité phénotypique des souches appartenant à cette espèce bactérienne.

La diversité des souches de *E. coli* pathogènes rencontrées a justifié leur classification en pathovars, groupements de souches pathogènes d'une même espèce classées en fonction de symptômes et de caractéristiques pathogéniques propres [106]. L'ensemble de ces pathovars ayant un impact majeur en santé publique, il est primordial de comprendre leurs mécanismes de pathogénicité, afin d'élaborer de nouvelles approches thérapeutiques et préventives contre les infections à *E. coli*. Dans ce but, l'équipe de recherche du Pr. E. Oswald travaille sur la pathogénie moléculaire et cellulaire de souches entéro-pathogènes (*Enteropathogenic E. coli*, EPEC) et extra-intestinales (*Extra-intestinal Pathogenic E. coli*, ExPEC).

Nougayrède *et al.* ont notamment identifié en 2006, chez des souches commensales et pathogènes de *E. coli*, un îlot génomique responsable de la synthèse d'une nouvelle toxine, la colibactine. L'infection transitoire de cellules eucaryotes par des souches de *E. coli* produisant la colibactine conduit à l'apparition de cassures double-brins de l'ADN des

cellules infectées (Figure 15.A) [107]. Ces dommages, en activant la voie de signalisation intracellulaire ATM-Chk, entraînent secondairement une phosphorylation de l'histone H2AX, un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, et donc un arrêt de la prolifération. Lorsque cet arrêt est prolongé, il induit un phénotype de mégalocytose, effet cytopathique caractéristique. L'induction de ce phénotype est contact-dépendante, dose-dépendante, et se traduit par l'apparition de cellules 10 à 20 fois plus volumineuses que des cellules non infectées (Figure 15.B) [107, 108].

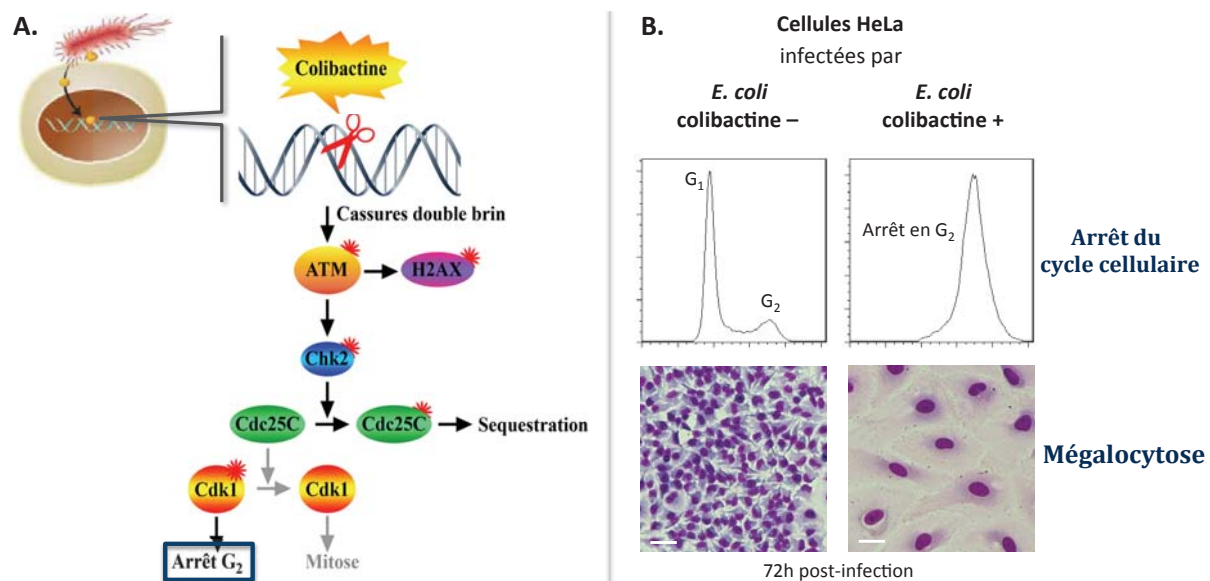


Figure 15. Dommages cellulaires induits par des *E. coli* produisant la colibactine

A. Mécanismes cellulaires activés en réponse aux cassures double-brins de l'ADN induites par des souches de *E. coli* produisant la colibactine au contact de cellules eucaryotes.

B. Des cellules eucaryotes de type HeLa infectées par une souche de *E. coli* produisant la colibactine présentent un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. Lorsqu'il est prolongé, il se traduit par un phénotype de mégalocytose après 72 heures d'incubation post-infection. Les cellules sont observées au microscope optique au grossissement 40 après coloration au Giemsa.

La colibactine est également exprimée *in vivo* par certains *E. coli* de la flore colique, et provoque des dommages sur l'ADN de cellules intestinales murines [109]. Même à faible dose, les dommages induits sont imparfaitement réparés par les systèmes cellulaires et déclenchent une instabilité chromosomique persistante, caractérisée par des altérations récurrentes des mitoses mais aussi du nombre et de la structure des chromosomes. Ces dommages aboutissent à des mutations géniques et à une initiation de la transformation cellulaire [109].

Plusieurs études de l'impact des souches de *E. coli* produisant la colibactine chez l'hôte ont ainsi été publiées par l'équipe depuis la découverte de la génotoxine. Il a récemment été montré que la synthèse de colibactine par des souches de *E. coli* commensales colonisant le

tube digestif de souriceaux dès la naissance entraîne une instabilité chromosomique dans les entérocytes, et a également un impact majeur sur le renouvellement et l'intégrité de l'épithélium digestif (Payros *et al.*, sous presse). Une autre étude confirme que ces souches induisent une instabilité génomique et une sénescence cellulaire *in vitro* et *in vivo*, pouvant conduire à la carcinogénèse et l'accélération du vieillissement [110]. Par ailleurs, d'autres travaux de l'équipe mettent en évidence que la présence de l'îlot *pks* est indispensable à l'effet anti-inflammatoire de la souche probiotique *E. coli* Nissle 1917 utilisée de manière empirique depuis un siècle et démontrée cliniquement efficace dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [111]. Enfin, les derniers travaux publiés montrent que des souches d'ExPEC produisant la colibactine exacerbent la lymphopénie observée au cours du sepsis dans un modèle murin, en causant des lésions double-brins sur l'ADN des lymphocytes, responsables de leur mort cellulaire par apoptose [112].

La colibactine n'est pas une protéine, mais un composé hybride de type polycétide – peptide non ribosomal (*PolyKetide – Non Ribosomal Peptide*, PK-NRP). Les PK-NRP appartiennent très souvent au métabolisme secondaire des bactéries. Ce sont des composés de poids moléculaire relativement faible pharmacologiquement actifs. De nombreuses molécules de cette famille sont utilisées comme médicaments : la plupart des antibactériens (Erythromycine, Rifamycine, Vancomycine, Amphotéricine B), certains anticancéreux (Doxorubicine Bléomycine), de nombreux immunosuppresseurs (Cyclosporine, Tacrolimus)... Les PK-NRP, de structure souvent complexe, sont produits par les bactéries et les champignons grâce à des machineries enzymatiques de type « mégasynthèses ». Ces systèmes de biosynthèse originaux sont constitués de plusieurs modules enzymatiques, appelés PKS-NRPS (*PolyKetide Synthase – Non-Ribosomal Peptide Synthase*), généralement codés sur des gènes physiquement très proches [113].

La synthèse de la colibactine est ainsi assurée par 16 enzymes de type PKS et/ou NRPS, codées au sein d'un îlot génomique, appelé *pks*, dont la structure est présentée [Figure 16](#). Cet îlot de 54 kb, regroupant 23 gènes, est retrouvé dans diverses souches de *E. coli*, commensales ou pathogènes, appartenant pour la quasi-totalité au phylogroupe B2 [114], mais également chez d'autres entérobactéries (*Citrobacter koseri*, *Klebsiella pneumoniae*...) [115]. L'îlot *pks* possède toutes les caractéristiques générales des îlots génomiques : insertion au niveau d'un locus ARNt (*asnW*), site d'insertion et d'échange d'ADN ; contenu moyen en G-C supérieur au reste du génome ; présence de motifs de répétitions de 8 nucléotides et d'une intégrase [115].

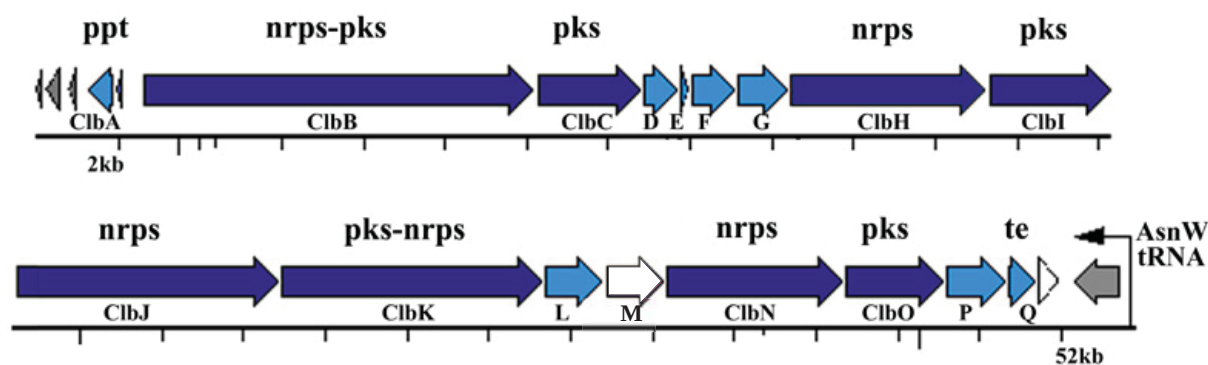


Figure 16. Structure schématique de l'îlot génomique *pks*

L'îlot génomique *pks*, d'une longueur de 54 kb, est positionné sur le chromosome de certaines souches de *E. coli* au niveau de l'ARNt *asnW*. Les gènes codant pour la machinerie de biosynthèse de type NRPS-PKS sont représentés en bleu foncé. Les gènes accessoires impliqués dans l'activation, l'assemblage et la maturation de la machinerie de biosynthèse et de la colibactine sont signalés en bleu clair. Les gènes non indispensables à la production de la génotoxine sont indiqués en blanc. Les gènes ne participant pas à la machinerie de biosynthèse et codant intégrases et transposases sont représentés en gris.

En dépit des connaissances acquises depuis la découverte de la colibactine en 2006, de nombreuses zones d'ombre persistent, en premier lieu concernant sa structure. La colibactine semble en effet être un composé instable et n'a encore jamais été isolée à ce jour. Seule une structure putative, prédite *in silico* à partir de la fonction présumée des enzymes codées par l'îlot *pks*, a pu être déterminée (Figure 17). De plus, les systèmes de régulation de la production de la toxine n'ont pour le moment pas été mis en lumière. Nous ignorons également si la colibactine est exportée ou non dans la cellule eucaryote. Enfin, le mécanisme d'action moléculaire de la génotoxine sur les cellules eucaryotes, qui pourrait être direct ou indirect, reste inconnu.

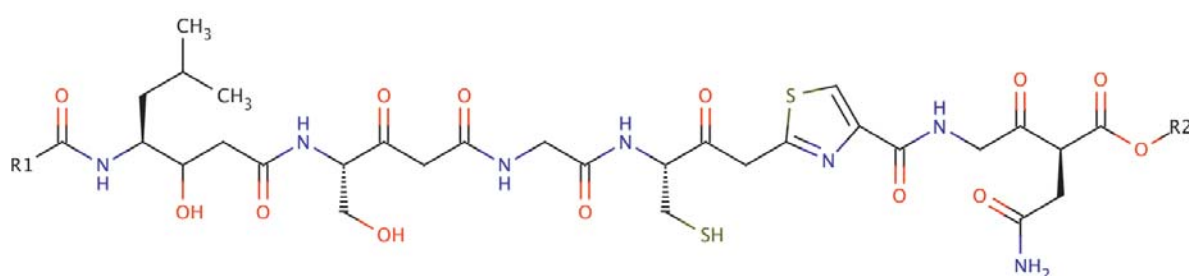


Figure 17. Structure putative linéaire de la colibactine obtenue par analyse *in silico*

La colibactine n'a pas encore été isolée et semble être un composé instable. Sa structure hypothétique linéaire est représentée ci-dessus d'après les domaines fonctionnels des enzymes de type PKS et NRPS codées par l'îlot génomique *pks*. Cette structure ne tient pas compte des étapes de cyclisations ou d'itérations, souvent observées dans la synthèse de PK-NRP mais non prévisibles à partir des domaines fonctionnels.

La synthèse des PK-NRP codés par des îlots génomiques nécessite classiquement la participation de gènes situés hors de ces îlots, par exemple des gènes du métabolisme permettant la production de monomères [116]. Dans le but de mieux appréhender les mécanismes de production de la colibactine par *E. coli*, mon projet de recherche a débuté par l'identification de gènes nécessaires à la biosynthèse de la génotoxine situés hors de l'îlot génomique *pks*. Le protocole général de ce projet est présenté dans la Figure 18.

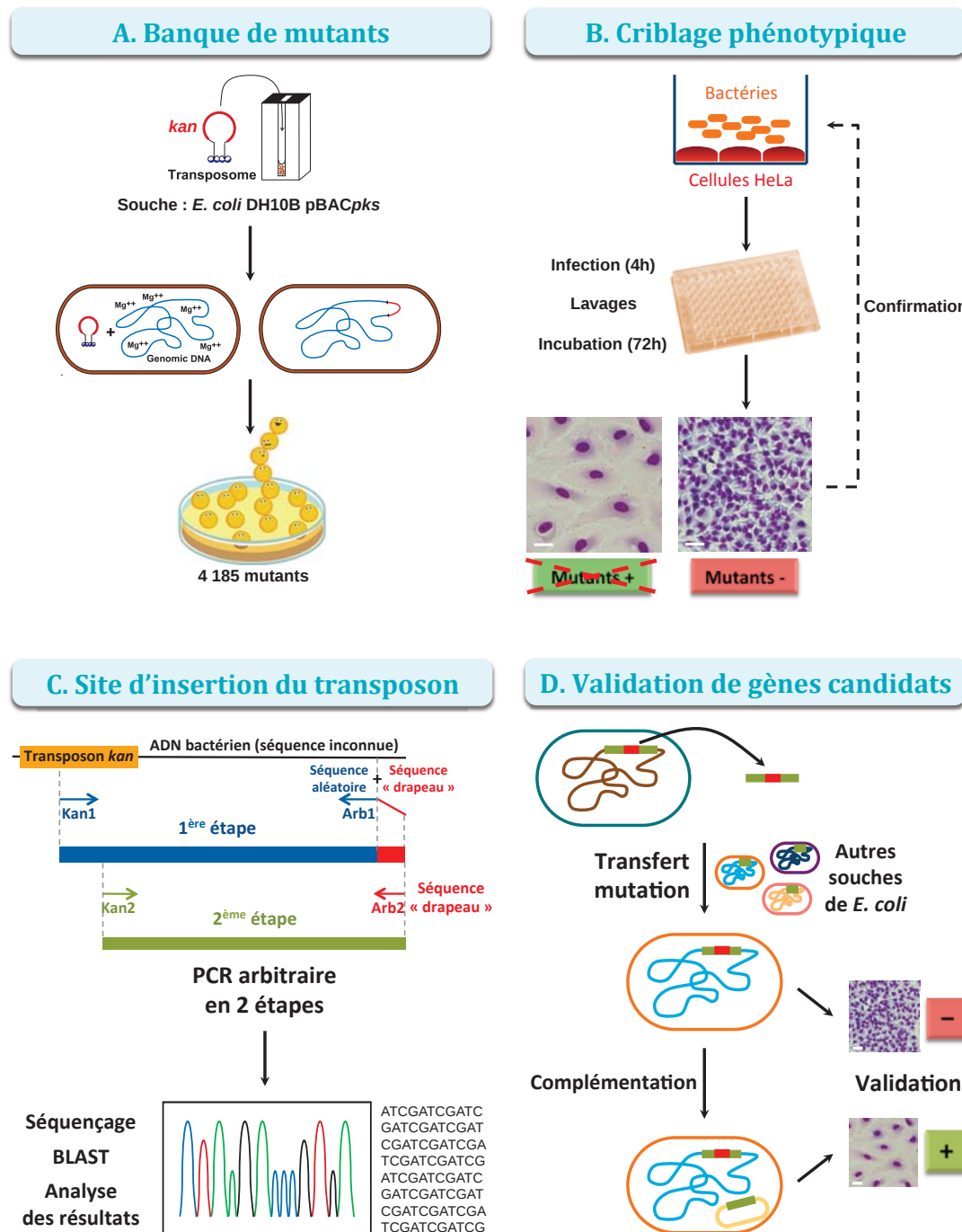


Figure 18. Protocole de construction, criblage et analyse de la banque de mutants

Étapes du protocole détaillées page suivante.

Afin d'identifier les gènes de *E. coli* non essentiels à la survie bactérienne mais impliqués dans la synthèse de la génotoxine, une banque de mutants a été construite par insertion aléatoire de transposons dans la souche de laboratoire de *E. coli* K-12 DH10B pBAC*pks* (portant l'îlot *pks* sur un chromosome bactérien artificiel). 4 185 mutants ont été obtenus, isolés et conservés en plaque 96 puits (Figure 18.A). Tous ces mutants ont d'abord été analysés pour la production de colibactine par un test d'interaction bactéries – cellules eucaryotes. Puis, les mutants ayant perdu la capacité à induire une mégaloctose ont été contrôlés pour la production de colibactine par le même test d'interaction (Figure 18.B). Le site d'insertion du transposon a ensuite été recherché pour les mutants d'intérêt, par PCR arbitraire et séquençage de l'amplicon obtenu. L'analyse des résultats de séquence a permis de distinguer les mutants d'intérêt portant une insertion située hors de l'îlot *pks* de ceux présentant le transposon au sein de l'îlot. Les mutants hors îlot ont ainsi été regroupés selon leur fonction à l'aide d'une analyse globale *in silico* (Figure 18.C). L'implication des gènes les plus intéressants dans la synthèse de colibactine a enfin été confirmée par transfert des mutations dans d'autres contextes génétiques puis par complémentation, afin de répondre au postulat moléculaire de Koch (Figure 18.D).

Sur 4 185 mutants criblés, 119 ont perdu la capacité à induire une mégaloctose. 70 d'entre eux portent une insertion du transposon au sein de l'îlot *pks* et ont été écartés. L'étude des 39 mutants d'intérêt restants a permis d'identifier 29 gènes (dont 5 doublons) et 4 régions inter-géniques potentiellement impliqués dans la synthèse de la colibactine. Le Tableau I résume l'analyse des mutants d'intérêts en les regroupant par fonction.

Trois principaux groupes émergent de cette analyse globale (Tableau I) :

- des gènes codant des protéines chaperons : *htpG* (Hsp90), *dnaJ* (Hsp70), *groL* (Hsp60) ;
- des gènes impliqués dans le métabolisme des polyamines : *speB*, *speC*, *puuR* ;
- des gènes impliqués dans des systèmes de pompe à efflux : *mdtE*, *gadW*.

Les autres mutants identifiés, plus difficiles à classer *a priori* mais pas moins intéressants, seront étudiés ultérieurement.

Cette banque de mutants pour la biosynthèse de la colibactine constitue désormais une véritable mine d'informations à exploiter. La validation des mutants d'intérêt ouvre de nombreuses perspectives d'élargissement de nos connaissances sur sa voie de biosynthèse.

Tableau I. Synthèse de l'analyse des mutants d'intérêt situés hors de l'îlot *pks*

Groupes	Mutant (n° plaque + position)	N° électroporation	Site d'insertion du Transposon		Position dans DH10B	Position dans MG1655	BLAST		Conservation du gène dans d'autres souches Colibactine +							Partenaires identifiés (STRING)	PCR <i>clbB/clbN</i>	Criblage milieu CAS	Remarques
			Gène ou région intergénique interrompue	Nom complet			Homologie (DH10B)	Séquence obtenue	<i>E. coli</i> 536	<i>E. coli</i> ABU3972	<i>E. coli</i> CF1073	<i>E. coli</i> HHE2034	<i>E. coli</i> UM146	<i>E. coli</i> UT189	<i>C. bovis</i> ATCC 25466-05				
Métabolisme	II-E8	1	<i>speB</i>	Agmatinase	3 176 716	3 081 647	74 nt	GCTGCGG	x	x	x	x	x	x	x	<i>groL, purH, speC</i>	+	+	
	XVII-H10	1	<i>speC</i>	Ornithine decarboxylase (constitutive)	3 209 500	3 106 819	673 nt	GCCTGGA	x	x	x	x	x	x	x	<i>carA, carB, purR, speB</i>	+	+	
	XVII-E10	1	<i>purR</i>	DNA-binding transcriptional repressor	1 449 678	1 360 282	834 nt	GGGCACA	Faible homologie (15%)							<i>speB, speC</i>	+	+	
Protéines	IV-F11	1	<i>groL</i>	GroEL, molecular chaperone HSP60 family, large subunit	4 471 039	4 370 677	746 nt	TGCGACCC	x	x	x	x	x	x	x	<i>hspG, dnaJ</i>	+	+	
	XXIII-F6	3	<i>hspG</i>	HtpG, molecular chaperone HSP90 family	434 517	495 186	603 nt	GTCCGAG	x	x	x	x	x	x	x	<i>dnaJ, groL (+lon, clpP, hslV)</i>	+	+	
	XXIII-H9	3	<i>dnaJ</i>	DnaJ, molecular chaperone HSP40, co-chaperone with DnaK	14 371	14 371	368 + 286 nt	GTATGGTC	x	x	x	x	x	x	x	<i>groL, htpG (+lon, clpP, hslV)</i>	-	+	PCR <i>clbB/clbN</i> -
Efflux	XXVII-H11	1	<i>mdtE</i>	Multidrug resistance efflux transporter	3 757 524	3 657 979	814 nt	AGCTGTAC	x	x	x	x	x	x	x	<i>gadW</i>	+	+	
	XXXVI-B4	4	<i>gadW</i>	DNA-binding transcriptional activator	3 760 117	3 662 372	122 nt	GGCATGG	x	x	x	x	x	x	x	<i>mdtE</i>	+	+	
	XVII-G12	1	<i>hlpA</i>	Cytoplasmic membrane lipoprotein-28	3 934 825	3 837 241	975 nt	GCTTTAGC	x	x	x	x	x	x	x	/	+	+	
Protéines membr.	XXXIX-D1	4	<i>spR</i>	Predicted peptidase, outer membrane lipoprotein	2 359 426	2 268 438	212 nt	GACAGGC	x	x	x	x	x	x	/	/	+	+	
	XVII-H7	1	<i>atpE</i>	F0 sector of membrane-bound ATP synthase, subunit c	4 016 643	3 923 966	179 nt	CAGGTCTT	x	x	x	x	x	x	x	<i>atpD, purB</i>	+	-	
	XXXIII-H1	3	<i>atpE</i>	F0 sector of membrane-bound ATP synthase, subunit c	4 016 709	3 919 125	95 nt	TGCCGATA	x	x	x	x	x	x	x	<i>atpD, purB</i>	+	-	
ATP synthase	V-H9	2	<i>atpD</i>	F1 sector of membrane-bound ATP synthase, subunit β	4 012 527	3 914 943	641 nt	GGGTGTAC	x	x	x	x	x	x	x	<i>atpE, purB</i>	+	-	Faible pousse
	XIV-H1	2	<i>atpD</i>	F1 sector of membrane-bound ATP synthase, subunit β	4 012 526	3 914 942	633 nt	GGGTGTAG	x	x	x	x	x	x	x	<i>atpE, purB</i>	+	-	Faible pousse
	XXII-C6	1	<i>glaA</i>	Glucose-inhibited cell-division protein	4 019 548	3 921 964	150 + 61 nt	AACGAGA	x	x	x	x	x	x	x	<i>atpD, atpE</i>	+	+	Mutant partiel
PEP	XXXVIII-F2	4	<i>ppc/argE</i>	PEP carboxylase / Acetylornithine decarboxylase	4 250 876	4 151 179	580 nt	GGCGGCA	x	x	x	x	x	x	x	<i>aspC, groL</i>	+	+	
	XXXVIII-B9	4	<i>ppc/argE</i>	PEP carboxylase / Acetylornithine decarboxylase	4 250 910	4 151 213	607 nt	CTTTATAA	x	x	x	x	x	x	x	<i>aspC, groL</i>	+	+	Mutant partiel
	XI-A8	1	<i>ppc</i>	Phosphoenolpyruvate carboxylase	4 248 972	4 149 275	275 nt	ATCTCGCC	x	x	x	x	x	x	x	<i>aspC, groL</i>	+	+	Faible pousse
Métabolisme général	XXXIX-C6	4	<i>purA</i>	Adenylosuccinate synthetase	4 503 781	4 403 419	639 nt	GGATAGT	x	x	x	x	x	x	x	<i>carA, carB, purB, pyrB</i>	+	-	
	XXIII-G10	2	<i>purA</i>	Adenylosuccinate synthetase	4 504 323	4 403 961	314 nt	GACAGGT	x	x	x	x	x	x	x	<i>carA, carB, purB, pyrB</i>	+	-	Faible pousse
	XXIII-H10	3	<i>purB</i>	Adenylosuccinate lyase	1 246 221	1 190 786	706 nt	CTTCATCA	x	x	x	x	x	x	x	<i>carA, carB, purA, pyrB</i>	+	-	Faible pousse
	XXIII-G4	3	<i>aspC</i>	Aromatic amino acid/aspartate amino-transferase	1 037 924	893 996	483 nt	GATATGCC	x	x	x	x	x	x	x	<i>carA, carB, groL, purA, purB, pyrB</i>	+	+	Faible pousse
	XL-B10	4	<i>carB</i>	Carbamoyl-phosphate synthase large subunit	31 571	31 571	568 nt	CAGCCCAA	x	x	x	x	x	x	x	<i>carA, purA, purB, pyrB</i>	+	-	Faible pousse
	XLIII-D1	5	<i>carA</i>	Carbamoyl phosphate synthetase small subunit	30 662	30 662	554 nt	GTAACGTA	x	x	x	x	x	x	x	<i>carB, purA, purB, pyrB</i>	+	-	Faible pousse
	XL-F2	4	<i>pyrB</i>	Aspartate carbamoyltransferase, catalytic subunit	4 572 058	4 470 241	539 nt	GGGTACG	x	x	x	x	x	x	x	<i>carA, carB, purA</i>	+	-	Faible pousse
	XXXVIII-G6	4	<i>serC</i>	Phosphoserine/phosphohydroxythreonine aminotransferase	1 011 484	957 556	600 nt	ATCCAGAA	x	x	x	x	x	x	x	<i>pyrB</i>	+	±	Faible pousse
	XVII-E5	1	<i>epiA</i>	Predicted metal dependent hydrolase	4 433 569	4 333 207	145 nt	GCAGCAAG	x	x	x	x	x	x	x	<i>pyrB</i>	+	+	
	XXVII-B8	1	<i>thfB</i>	Integration host factor, DNA-binding protein, subunit β	1 017 148	974 557	110 nt	CGGGTAC	x	x	x	x	x	x	x	<i>serC</i>	+	+	
Divers (pas de partenaire)	IV-G6	1	<i>ygaC/mdh</i>	Predicted protein / Predicted glutaredoxin-like protein	2 889 999	2 798 234	734 nt	GATTGACA	x	x	x	x	x	x	/	/	+	+	
	IX-H9	1	<i>yhdD</i>	DNA-binding DNA regulator YhdD	853 681	799 753	576 nt	CTGCCAG	x	x	x	x	x	x	/	/	+	+	
	XV-F10	2	<i>yplC/ygaQ</i>	Predicted protein / Putative alpha-amylase	2 875 186	2 783 421	83 nt	ATGTAGAA	BLAST dans DH10B et MG1655 seulement							/	+	+	
	XXII-G11	3	<i>sspA</i>	Stringent starvation protein A	3 473 121	3 375 376	1021 nt	CATCAGAT	x	x	x	x	x	x	/	/	+	+	
	XLII-D10	5	<i>yjw/ppiC</i>	Predicted protein / Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	4 056 844	3 957 922	338 nt	GGTACATA	BLAST dans DH10B et MG1655 seulement							/	+	+	
	XLII-G6	5	<i>ydeF/ydeK</i>	Conserved protein / Predicted protein	2 098 752	2 007 744	200 nt	TTCCCGCT	x	x	x	x	x	x	/	/	+	+	
	IX-H4	1	<i>recD</i>	Exonuclease V	3 042 911	2 949 041	709 nt	GGTGATGA	x	x	x	x	x	x	x	/	-	+	PCR <i>clbB/clbN</i> -
	XVII-B1	1	<i>lida</i>	L,D-carboxypeptidase A	1 281 996	1 241 755	549 nt	GATCGGTA	x	x	x	x	x	x	/	/	+	+	Faible pousse
	XXXVIII-F7	4	<i>lida</i>	L,D-carboxypeptidase A	1 282 264	1 242 023	51 nt	GCCACAAA	x	x	x	x	x	x	/	/	+	+	Faible pousse
	XLIV-H5	5	<i>nhaA</i>	Sodium-proton antiporter	17 549	17 549	222 nt	GCCGCTAT	x	x	x	x	x	x	/	/	+	+	Faible pousse
	XLV-A9	5	<i>pgi</i>	Glucose-phosphate isomerase	4 333 010	4 233 314	577 nt	GTCCACG	x	x	x	x	x	x	/	/	+	-	Faible pousse

Le groupe des protéines chaperons HtpG, GroEL et DnaJ, nous a semblé particulièrement intéressant. Ces trois protéines appartiennent à la famille des protéines du choc thermique (*Heat shock proteins*, Hsps). Cette large famille de protéines regroupe des chaperons moléculaires, des protéases, des facteurs de transcription et des enzymes du métabolisme général, qui permettent aux bactéries de s'adapter et survivre en conditions de stress [117].

L'expression de ces différents acteurs est modérée au niveau basal, mais potentiellement inductible lors de changements brusques des conditions environnementales. Ils sont ainsi fortement exprimés au cours des différentes étapes du processus infectieux, afin de prévenir la dénaturation voire l'agrégation protéique, en favorisant le repliement conformationnel ou la dégradation des protéines mal conformées [55]. Les gènes codant ces protéines de choc thermique peuvent être induits en réponse à différents stress : choc thermique lors de l'entrée d'un pathogène chez son hôte, acidité importante du milieu à l'arrivée dans le contenu gastrique, stress oxydatif lors du passage systémique... Ces processus sont donc indispensables à la survie des bactéries chez l'hôte. Plusieurs études ont ainsi démontré que des souches mutées pour des gènes codant des protéines chaperons présentent une virulence atténuée, confirmant leur rôle essentiel dans la pathogénicité bactérienne [118].

Nous avons donc décidé de focaliser notre travail sur l'une des trois protéines chaperons identifiées par la banque de mutants : HtpG, encore appelée Hsp90_{Ec}.

Cette protéine chaperon semble particulièrement intéressante dans l'étude de la biosynthèse de la colibactine. L'analogue procaryote de Hsp90 est en effet nécessaire à la synthèse de l'albicidine, un antibiotique produit par *Xanthomonas albilineans* [84], et à la production d'arthrofactine, un lipopeptide de *Pseudomonas* sp. [85]. L'albicidine et l'arthrofactine sont des composés de type PK-NRP, donc de même nature que la colibactine.

L'implication de Hsp90 procaryote dans la synthèse de molécules telles que la colibactine chez *E. coli* soulève également l'hypothèse de son rôle dans l'adaptation et la virulence bactérienne durant le processus infectieux chez l'hôte, ce qui a été récemment démontré pour d'autres espèces bactérienne : *Edwardsiella tarda* [92], *Francisella tularensis* [95] ou encore *Leptospira interrogans* [96].

Ce travail a donc pour objectifs d'élucider le rôle de la protéine chaperon Hsp90_{Ec} dans la biosynthèse de la colibactine chez *E. coli*, et de déterminer son implication dans la virulence.

II – MATERIEL ET METHODES

▪ Souches bactériennes et conditions de cultures utilisées

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont listées dans le Tableau II. La souche de *E. coli* M1/5 commensale a été isolée dans des selles d'un homme adulte et appartient au groupe phylogénétique B2 (don : U. Dobrindt). La souche de *E. coli* SP15 pathogène extra-intestinal a été isolée chez un patient présentant une méningite néo-natale et appartient au sérotype O18:K1:H7 [119]. Les souches M1/5 et SP15 possèdent toutes les deux l'îlot génomique *pks* nécessaire à la synthèse de colibactine.

L'inactivation des gènes *htpG*, *lon*, *clpP* et *clpQ* a été réalisée selon la méthode de Datsenko et Wanner utilisant la recombinase lambda Red [120] et les couples d'amorces indiqués dans le Tableau III. Pour les complémentations, le gène *htpG* a été cloné dans les plasmides pUFR043 (p-*htpG* (1), Tableau II, don de M. Royer, [84]) et pBAD/Myc-His (Invitrogen) (p-*htpG* (2), Tableau II, don de F. Motojima, [76]) ; l'opéron *clpYQ* a été cloné dans le plasmide pSE380 (Invitrogen) (p-*clpYQ*, Tableau II, don de P. Genevaux).

Pour les expériences de choc thermique, deux cultures de *E. coli* ont été inoculées en parallèle dans du milieu LB à partir de cultures d'une nuit en milieu LB puis diluées 1:100. Ces cultures ont alors été incubées 3 heures à 37°C. Une des 2 cultures a alors été transférée dans un incubateur à 45°C et maintenue à cette température pendant 30 minutes, l'autre restant à 37°C [59]. Une extraction des ARN a enfin été immédiatement réalisée sur les deux cultures, 37 et 45°C.

Avant injection aux souris, toutes les souches de *E. coli* ont été préalablement cultivées une nuit en milieu LB à 37°C. Ces cultures ont ensuite été diluées 1:100 dans du milieu LB et cultivées 3 heures à 37°C sous agitation. Les bactéries ont alors été centrifugées puis suspendues avec du PBS stérile à la concentration de 2.10^9 UFC/mL. Toutes les souches présentent les mêmes capacités de croissance en LB *in vitro* (données non présentées).

Pour la quantification de yersiniabactine par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, les bactéries ont été cultivées en milieu M63 – glycérol 0,6% sans supplémentation en fer, et incubées pendant 17 heures à 37°C.

Tableau II. Souches et plasmides utilisés dans cette étude

Souches ou plasmides	Description ou séquence	Référence
Souches de <i>E. coli</i>		
M1/5	Souche commensale issue de selles d'un adulte sain	Don : U. Dobrindt
M1/5 <i>htpG</i>	M1/5 mutée pour <i>htpG</i> , Kan ^r	Cette étude
M1/5 <i>htpG</i> p- <i>htpG</i> (1)	M1/5 <i>htpG</i> portant p- <i>htpG</i> (1), Kan ^r	Cette étude
M1/5 <i>htpG</i> p- <i>htpG</i> (2)	M1/5 <i>htpG</i> portant p- <i>htpG</i> (2), Amp ^r	Cette étude
M1/5 <i>htpG lon</i>	M1/5 mutée pour <i>htpG</i> et <i>lon</i> , Kan ^r	Cette étude
M1/5 <i>htpG clpP</i>	M1/5 mutée pour <i>htpG</i> et <i>clpP</i> , Kan ^r	Cette étude
M1/5 <i>htpG clpQ</i>	M1/5 mutée pour <i>htpG</i> et <i>clpQ</i> , Kan ^r	Cette étude
M1/5 <i>htpG clpQ</i> p- <i>clpYQ</i>	M1/5 <i>htpG clpQ</i> portant p- <i>clpYQ</i> , Kan ^r Amp ^r	Cette étude
M1/5 <i>htpG clpQ</i> p- <i>htpG</i> (2)	M1/5 <i>htpG clpQ</i> portant p- <i>htpG</i> (2), Kan ^r Amp ^r	Cette étude
M1/5 <i>clpQ</i>	M1/5 mutée pour <i>clpQ</i> , Kan ^r	Cette étude
M1/5 <i>clpQ</i> p- <i>clpYQ</i>	M1/5 <i>clpQ</i> portant p- <i>clpYQ</i> , Kan ^r Amp ^r	Cette étude
M1/5 p- <i>clpYQ</i>	M1/5 portant p- <i>clpYQ</i> , Amp ^r	Cette étude
SP15	Souche pathogène issue d'une méningite néonatale	[119]
SP15 <i>htpG</i>	SP15 mutée pour <i>htpG</i> , Kan ^r	Cette étude
SP15 <i>htpG</i> p- <i>htpG</i> (1)	SP15 <i>htpG</i> portant p- <i>htpG</i> (1), Kan ^r	Cette étude
SP15 <i>htpG</i> p- <i>htpG</i> (2)	SP15 <i>htpG</i> portant p- <i>htpG</i> (2), Kan ^r	Cette étude
SP15 <i>clpQ</i>	SP15 mutée pour <i>clpQ</i> , Kan ^r	Cette étude
SP15 <i>clpQ</i> p- <i>clpYQ</i>	SP15 <i>clpQ</i> mutée et portant p- <i>clpYQ</i> , Kan ^r Amp ^r	Cette étude
SP15 p- <i>clpYQ</i>	SP15 portant p- <i>clpYQ</i> , Kan ^r	Cette étude
Plasmides		
p- <i>htpG</i> (1)	pUFR043, faible nombre de copies, portant <i>htpG</i> , Kan ^r	Don : M. Royer
p- <i>htpG</i> (2)	pBAD/Myc-His, nb de copies élevé, portant <i>htpG</i> -His, Amp ^r	Don : F. Motojima
p- <i>clpYQ</i>	pSE380, nb de copies élevé, portant l'opéron <i>clpYQ</i> , Amp ^r	Don : P. Genevaux

▪ Extraction des ARN et étape de RT-PCR

Les ARN des souches de *E. coli* cultivées en milieu LB jusqu'à une absorbance de 0,600 à DO_{660 nm} ont été isolés à l'aide du kit commercial RNeasy Mini kit (Qiagen).

Les ARN bactériens des souches de *E. coli* après infection des cellules eucaryotes HeLa ont été isolés des ARN totaux grâce au MicrobEnrich kit (Ambion). L'absence de contamination des ARN bactériens par des ARN eucaryotes a été vérifiée grâce à l'amplification du gène codant l'enzyme GAPDH eucaryote par PCR, et en contrôlant l'absence d'ARNr eucaryote sur puces Bioanalyzer (Agilent).

La concentration en ARN a été quantifiée grâce au spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific), et les rapports DO₂₆₀/DO₂₈₀ et DO₂₆₀/DO₂₃₀ ont été analysés pour vérifier l'absence de contamination par des protéines ou du solvant. Un microgramme d'ARN totaux a ensuite subi une étape de RT-PCR dans un volume total de 20 µL contenant 1 µL de iScript reverse transcriptase (Biorad) pendant 30 minutes à 42°C, selon les instructions du fournisseur. La réaction est stoppée par dénaturation enzymatique à 85°C durant 5 minutes.

▪ PCR quantitative en temps réel

Chaque échantillon a été analysé en triplicata sur plaque 96 puits (Biorad). Le mélange réactionnel est composé de iQ SYBR Green Supermix (Biorad) et de 5 µL d'échantillon, pour un volume final de 25 µL. La réaction de PCR en temps-réel (2 StepAmp) comprend une étape de dénaturation initiale pendant 3 minutes à 95°C, suivie de 39 cycles de 10 secondes à 95°C et de 30 secondes à 62°C. Toutes les quantifications des réactions de PCR en temps-réel incluent des contrôles négatifs (mélange réactionnel sans échantillon). Les gènes *cysG* et *hcaT* ont été utilisés comme gène de référence [121]. Les amorces utilisées sont listées dans le Tableau III.

Tableau III. Amorces utilisées dans cette étude

Amorce	Séquence
<i>htpG</i> -P1	TGAGGTAGACCTACATGAAAGGACAAGAACTCGTGGTTTTTCAGTCAGAAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>htpG</i> -P2	GACTGGAACGGTTTACCGTCGAACTCAGTCAGATAGTTCATCATCCACTCATGGGAATTAGCCATGGTCC
<i>lon</i> -P1	CGTCGGGACCGTGGCCTCTA
<i>lon</i> -P2	ACGGCCAGCCGAGCTTTAG
<i>clpP</i> -P1	AAAGCCTCTTTTCGGTGTAGC
<i>clpP</i> -P2	GCCGCCCTGGATAAGTATAG
<i>clpQ</i> -P1	GCCAGCGGTTACGCAGAGCA
<i>clpQ</i> -P2	CGCGGAACAGGCAGAGACGG
RT- <i>hcaT</i> -F	GCTGGCACTGCTGACA
RT- <i>hcaT</i> -R	CGCCGAGCCAATGACA
RT- <i>cysG</i> -F	TGGGCCAGGTAGCGAA
RT- <i>cysG</i> -R	GGACCTGCACCAACCA
RT- <i>htpG</i> -F	GAACAGTTCATGCCGAA
RT- <i>htpG</i> -R	GCCAAACTGTTGCCAGA
RT- <i>clbA</i> -F	TGGACGCTCAAAGAA
RT- <i>clbA</i> -R	TGGGACTGCATAGGAAA
RT- <i>clbC</i> -F	CCTACCATGCGCTGGA
RT- <i>clbC</i> -R	CACCGGACCGTTGAGA
RT- <i>clbJ</i> -F	GCCTCTGCTGTCGACA
RT- <i>clbJ</i> -R	TGGCATGCCTATCACCA
RT- <i>clbP</i> -F	ATAGACGCCTGGTTGCA
RT- <i>clbP</i> -R	GCTGATCCGGTCGCAA
RT- <i>clbQ</i> -F	CCTTCGAACTGGTGCA
RT- <i>clbQ</i> -R	GGGGGTGAAAATTGTCA

▪ Test d'interaction bactéries – cellules eucaryotes (effet cyto-pathogène) [107] et quantification de la mégalocytose et la génotoxicité induites par la colibactine

Ce test consiste en l'infection pendant 4 heures de cellules HeLa subconfluentes par des colibacilles, dans un milieu de culture cellulaire. La culture bactérienne est ensuite éliminée par lavages successifs et remplacement par du milieu de culture contenant de la gentamicine. Le phénotype cellulaire est observé après 72 h d'incubation à 37°C sous CO₂.

Pré-cultures

Les cellules HeLa sont maintenues au laboratoire par passage en série en milieu DMEM (Gibco) additionné de sérum de veau fœtal (SVF, 10% final, Eurobio), d'acides aminés non essentiels (1% final, PAA) et de gentamicine (80 µg/mL final, Gibco).

Les cellules HeLa sontensemencées 24 h avant le test en plaque 96 puits (Falcon), à une concentration de $5 \cdot 10^3$ cellules/100 µL/puit (pour une quantification de mégaloctose) ou de $1,5 \cdot 10^5$ cellules/200 µL/puit (pour une quantification de génotoxicité), dans du milieu de culture DMEM GlutaMAX (Gibco) additionné de SVF (10% final), d'acides aminés non essentiels (1% final) et de gentamicine (80 µg/mL final), et incubées à 37°C sous 5% de CO₂.

Interaction

Après 3 lavages des cultures de cellules HeLa, confluentes à environ 70%, par du tampon HBSS (PAA) pour éliminer la gentamicine et les molécules antibiotiques potentiellement sécrétées par les cellules eucaryotes, le milieu de culture cellulaire est remplacé par du milieu d'interaction (DMEM, HEPES 25 mM, Glucose 4,5 mM (Gibco), SVF 5%).

Les souches bactériennes de *E. coli*, cultivées sur la nuit précédant le test en milieu LB, sont alors diluées dans le même milieu d'interaction, et les cellules HeLa sont infectées avec une multiplicité d'infection (nombre de bactéries pour une cellule eucaryote, MOI) de 6 à 200. Les antibiotiques et les inducteurs d'expression plasmidique adéquats sont également ajoutés pendant l'interaction. La co-culture est effectuée pendant 4 heures à 37°C sous 5% de CO₂.

Lavages et incubation

À la fin de l'interaction, une mesure de l'absorbance à DO_{590 nm} de la plaque 96 puits est réalisée. Les cellules sont alors lavées 4 fois avec du tampon HBSS pour éliminer les bactéries, puis incubées à 37°C sous 5% de CO₂ dans du milieu DMEM, SVF 10%, gentamicine 200 µg/mL.

A partir de la fin de l'interaction bactéries-cellules, il est possible de quantifier soit la mégaloctose, soit la génotoxicité induites par la colibactine.

Quantification de la mégaloctose [107]

Après 72 heures d'incubation post-infection, les cellules sont lavées 2 fois par du tampon PBS (Sigma), puis fixées par du formaldéhyde (3,7% final, Sigma) pendant 15 minutes. Les cellules sont ensuite colorées au bleu de méthylène (1% m/v dans du Tris-HCl 0,01 M, Sigma) durant 1 heure environ. Le bleu de méthylène est ensuite extrait avec une solution de HCl 0,1 M, et quantifié par mesure de l'absorbance à DO_{660 nm}.

Quantification de la génotoxicité [122]

La génotoxicité est quantifiée par la méthode *In Cell Western* [122]. Huit heures après la fin de l'infection, les cellules HeLa sont lavées avec du PBS et directement fixées sur plaque avec du paraformaldéhyde (4% final en PBS) pendant 20 minutes à température ambiante. Après lavage avec du PBS, le paraformaldéhyde est neutralisé grâce à du NH_4Cl 20 mM pendant 2 minutes suivi d'un lavage au PBS durant 5 minutes. Les cellules sont alors perméabilisées avec du Triton X-100 (0,2% final en PBS) pendant 5 minutes, et lavées avec du tampon PST (PBS, SVF 2% final, Triton X-100 0,2% final).

Les cellules sont ensuite incubées avec du milieu MAXblock Blocking (Active Motif), additionné d'un inhibiteur de phosphatases PHOSTOP (Roche) pendant 60 minutes à température ambiante, puis avec un anticorps monoclonal de lapin anti- γ -H2AX (dilution 1:200 en tampon PST, Cell Signalling) pendant une nuit. Puis après 3 lavages de 5 minutes en tampon PST, un deuxième marquage est réalisé avec un anticorps secondaire d'âne conjugué et fluorescent absorbant en infrarouge à 800 nm (IRDye™ 800 CW) dilué à 1:500 en tampon PST. Le marquage de l'ADN est assuré par la solution RedDot2 (dilution 1:500, Biotium). Après 30 minutes d'incubation et 3 lavages de 5 minutes en tampon PST, l'ADN cellulaire et l'histone γ -H2AX sont simultanément visualisés grâce au système d'acquisition Odyssey Infrared Imaging Scanner (Li-Cor ScienceTec) aux longueurs d'onde 680 nm (marquage rouge de l'ADN) et 800 nm (marquage vert de l'histone γ -H2AX).

Lors de l'acquisition, la mesure de l'intensité de fluorescence relative permet une analyse quantitative des 2 signaux. La fluorescence relative de γ -H2AX par cellule est déterminée avec le ratio γ -H2AX / contenu en ADN. L'intensité relative mesurée pour chaque échantillon est ensuite rapportée à l'intensité relative des puits contrôles (cellules HeLa non infectées), pour calculer le taux de phosphorylation de l'histone H2AX exprimé en pourcentage.

▪ **Modèle murin de sepsis**

Les expérimentations animales ont été menées selon les directives européennes sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Les protocoles utilisés ont été validés par le « Comité d'éthique Midi-Pyrénées pour l'expérimentation animale ».

Des souris mâles C57BL/6J (JANVIER) âgés de 8 à 9 semaines ont reçu dans le coussinet plantaire [123] une injection de suspension bactérienne à 10^8 UFC/mL, contenant la souche de *E. coli* SP15 sauvage ou mutée pour le gène *htpG*.

Pour les expériences de quantification bactérienne systémique, les souris sont sacrifiées après anesthésie létale (Rompun et Kétamine dans du NaCl 0,9%) 4, 6 ou 28h après infection. Après ouverture de la cavité abdominale, la veine cave postérieure est sectionnée pour collecter du sang par aspiration, et la rate est prélevée. Les bactéries localisées dans la rate sont isolées après dissociation mécanique du tissu splénique (Precellys tissue homogenizer). Les bactéries sont quantifiées dans le sang et dans la rate par ensemencement de dilutions en séries sur milieu sélectif approprié (gélose MacConkey).

Pour les expériences de suivi de mortalité, les souris reçoivent, 21 heures après infection, une injection intra-péritonéale de 100 μ L de gentamicine (1 mg/mL) et deux injections sous-cutanée (une sur chaque flanc) de 250 μ L de soluté de réhydratation Ringer. Un suivi de mortalité est réalisé sur 250 heures après injection des bactéries.

▪ Quantification de yersiniabactine par LC-MS

Les souches sont cultivées en milieu M63 glycérol pendant 17 heures à 37°C en triplicata. La production de yersiniabactine est quantifiée grâce au système de chromatographie liquide haute performance Waters 2795 Alliance HT couplé au spectromètre de masse Micromass Quattro Premier XE (Micromass MS Technologies). Les échantillons sont injectés dans une colonne Phenomenex Kinetex 2,6u C8 100A de 150 mm, à un flux de 400 μ L/min et avec un gradient linéaire d'un mélange eau – acétonitrile – acide acétique (1%). Des aliquots de 1 mL de surnageant de culture sont préparés, auxquels est ajouté le contrôle interne 5,6,7,8-tétra-deutéro-3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline (0,12 ng/mL). La transition entre les formes pseudomoléculaire et les ions fils de la yersinabactine est : m/z 482 > 295. Cette transition spécifique a été utilisée pour la quantification relative de la yersiniabactine.

▪ Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6.0c. La moyenne et l'écart-type sont indiqués sur les figures. Les valeurs de p -value sont calculées grâce au test d'Anova unilatéral ou bilatéral, suivi par une correction de Bonferroni. Pour les quantifications bactériennes, les nombres d'UFC par mg de rate ou par mL de sang ont été transformés en valeurs logarithmiques. Les courbes de survie ont été comparées par le test *log-rank*. $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative et noté *, $p < 0,01$ est noté **, et $p < 0,001$ est noté ***. Les résultats non significatifs sont notés *ns*.

III – RESULTATS

▪ Hsp90_{Ec} est nécessaire à la génotoxicité induite par certaines souches de *E. coli*

Dans le but de déterminer si la protéine chaperon Hsp90_{Ec} est nécessaire à la biosynthèse de la colibactine par des souches de *E. coli* commensales ou pathogènes, le gène *htpG* a été délété dans les souches M1/5 et SP15, isolées respectivement chez un homme adulte sain et chez un patient atteint d'une méningite néo-natale. Les souches mutées pour le gène *htpG* ont ensuite été transformées avec deux plasmides différents exprimant le gène *htpG* sauvage, sous le contrôle d'un promoteur inductible soit par l'IPTG, appelé p-*htpG* (1), soit par l'arabinose, appelé p-*htpG* (2). Des cellules HeLa ont été infectées avec ces différentes souches. La production de colibactine a ensuite été détectée, soit par quantification de la mégaloctose (Figure 19.A), soit par quantification de la phosphorylation de l'histone H2AX (Figure 19.B), deux phénotypes corrélés aux cassures double-brins de l'ADN induites par la génotoxine [107, 109].

Afin de quantifier le phénotype de mégaloctose, les cellules HeLa sont fixées et colorées au bleu de méthylène après 72 heures d'incubation post-infection. Les résultats montrent que l'inactivation du gène *htpG* est associée à une perte du phénotype de mégaloctose dans les deux souches testées, et donc à une perte de la production de colibactine. La transformation des souches mutées par des plasmides portant le gène *htpG* fonctionnel permet une restauration partielle ou complète de la mégaloctose (Figure 19.A).

La quantification de la phosphorylation de l'histone H2AX (γ -H2AX), mesure indirecte de la génotoxicité induite par la colibactine, est réalisée par la technique *In Cell Western* [123]. Les cellules HeLa sont fixées et perméabilisées après 8 heures d'incubation post-infection. Le marquage simultané de l'ADN et de l'histone H2AX phosphorylée permet le calcul du taux d'induction de phosphorylation de H2AX par cellule (Figure 19.B). Les résultats indiquent que les souches M1/5 et SP15 sauvages induisent une génotoxicité dépendant de la multiplicité d'infection. Les cellules HeLa infectées par les souches mutées pour *htpG* ne présentent pas d'induction de la phosphorylation de H2AX. L'introduction du gène *htpG* fonctionnel dans ces souches mutées permet une restauration de l'induction de cassures doubles-brins de l'ADN.

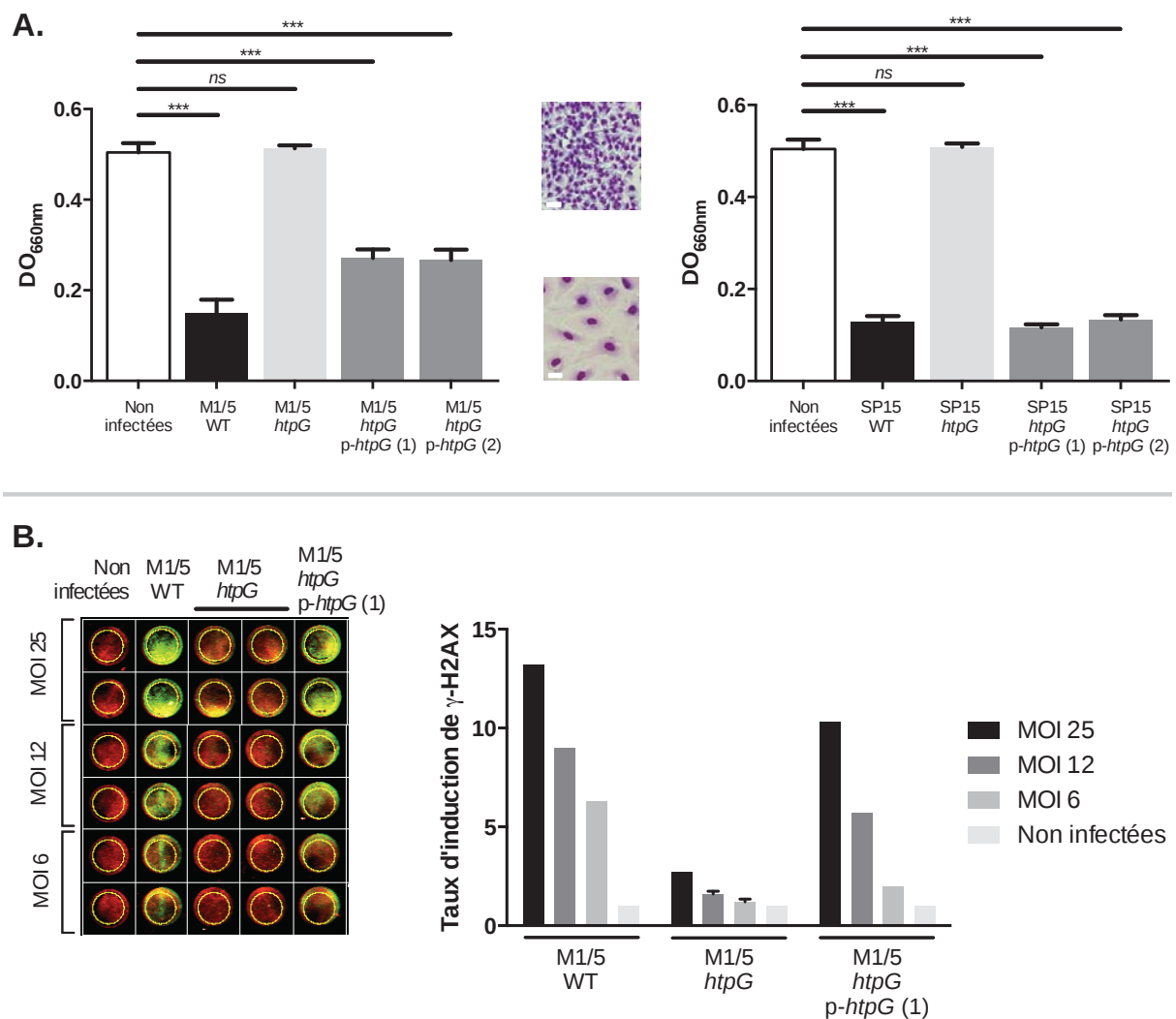


Figure 19. Hsp90_{Ec} est nécessaire à la biosynthèse de la colibactine

La production de colibactine par les souches de *E. coli* M1/5 et SP15 et leurs dérivés est déterminée par quantification de la mégalocytose (**A**) et de la phosphorylation de H2AX (**B**), phénotypes associés à l'induction de cassures double-brins de l'ADN sur des cellules eucaryotes. Des souches de *E. coli* sauvages, mutées pour le gène *htpG* ou complémentées sont ajoutées directement sur des cellules HeLa, et co-cultivées pendant 4 heures avant d'être lavées.

A. Après 72 heures d'incubation post-infection, les cellules sont fixées et colorées au bleu de méthylène, ensuite quantifié par mesure de l'absorbance à 660 nm. Multiplicité d'infection : 200. Analyse statistique : test d'Anova unilatéral. *** : $p < 0,001$; ns : non significatif.

B. Après 8 heures d'incubation post-infection, les cellules sont fixées, perméabilisées et marquées pour l'ADN et l'histone H2AX phosphorylée, selon la méthode In Cell Western. Les signaux mesurés permettent de calculer le taux d'induction de phosphorylation de H2AX par cellule. Multiplicité d'infection : 6 à 25. Analyse statistique : à venir après répétition de l'expérience.

L'ensemble de ces résultats indique donc que la protéine chaperon Hsp90_{Ec} est impliquée dans la biosynthèse de la colibactine chez des souches de *E. coli* commensales et pathogènes.

▪ Hsp90_{Ec} ne participe pas à la régulation de la transcription des gènes de l'îlot *pks*

Pour élucider le rôle de Hsp90_{Ec} dans la biosynthèse de la colibactine, nous avons analysé son implication éventuelle dans la régulation transcriptionnelle des gènes de l'îlot *pks*. Les souches M1/5 sauvages et mutées pour le gène *htpG* sont cultivées à 37°C, puis subissent un choc thermique à 45°C, connu pour induire l'expression de Hsp90_{Ec} [59]. Après extraction des ARN totaux, une analyse transcriptionnelle est réalisée pour le gène *htpG* et pour 5 gènes codés dans l'îlot *pks* : *clbA*, *clbC*, *clbJ*, *clbP* et *clbQ*, choisis pour quantifier l'expression des différentes unités transcriptionnelles de l'îlot *pks* (Figure 20) [124].

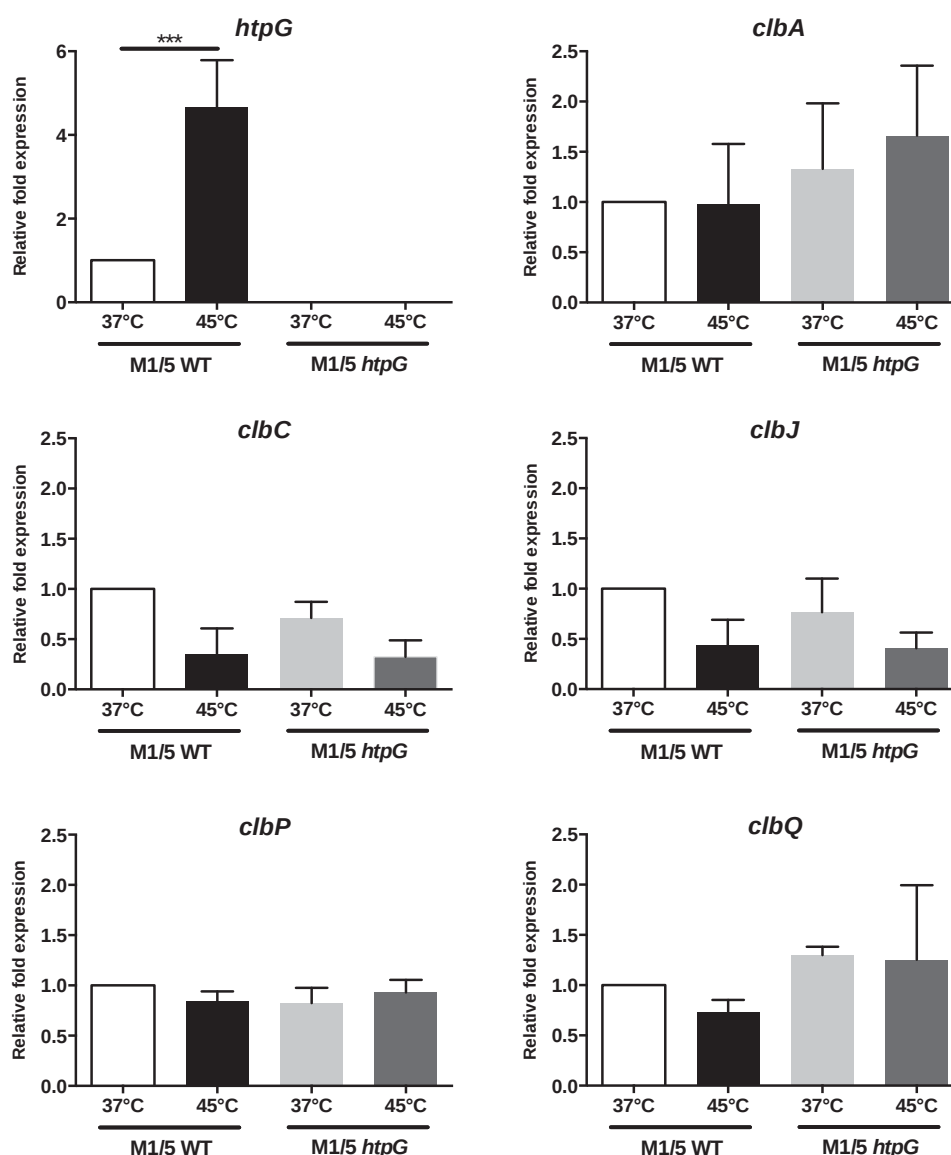


Figure 20. Hsp90_{Ec} ne régule pas la transcription des gènes de l'îlot *pks*

Des souches de *E. coli* M1/5 sauvage ou mutée pour *htpG* sont cultivées à 37°C, puis subissent ou non un choc thermique à 45°C. Après extraction des ARN totaux, la transcription du gène *htpG* et de 5 gènes de l'îlot *pks* est quantifiée par PCR quantitative après reverse-transcription. Les résultats sont exprimés en taux d'induction de l'expression, comparé à la souche M1/5 sauvage cultivée à 37°C. Analyse statistique : test d'Anova unilatéral. *** : $p < 0,001$.

Les résultats indiquent qu'un choc thermique transitoire induit une augmentation de la transcription du gène *htpG*, comme précédemment décrit dans la littérature [59]. Cependant, la transcription des gènes *clb* n'est pas modifiée suite à un choc thermique, et l'expression reste identique que Hsp90_{Ec} soit fonctionnel ou non (Figure 20).

Ces données montrent donc que l'implication de Hsp90_{Ec} dans la biosynthèse de la colibactine ne se situe pas au niveau de la régulation transcriptionnelle de l'îlot *pks*.

■ Hsp90_{Ec} et la protéase ClpQ interviennent dans la synthèse de colibactine

De manière générale, le contrôle qualité des protéines comprend l'action conjointe de protéines chaperons et de protéases. Afin de déterminer si l'abolition de production de colibactine en l'absence de la protéine chaperon Hsp90_{Ec} résulte d'une activité protéasique, nous avons étudié l'effet de l'inactivation de trois protéases majeures de *E. coli*, Lon, ClpP et ClpQ, en l'absence de Hsp90_{Ec}. Les gènes *lon*, *clpP* et *clpQ* codant ces protéases ont donc été interrompus dans la souche de *E. coli* M1/5 préalablement mutée pour le gène *htpG*. Le phénotype de mégaloctose induit par ces doubles mutants a été quantifié (Figure 21).

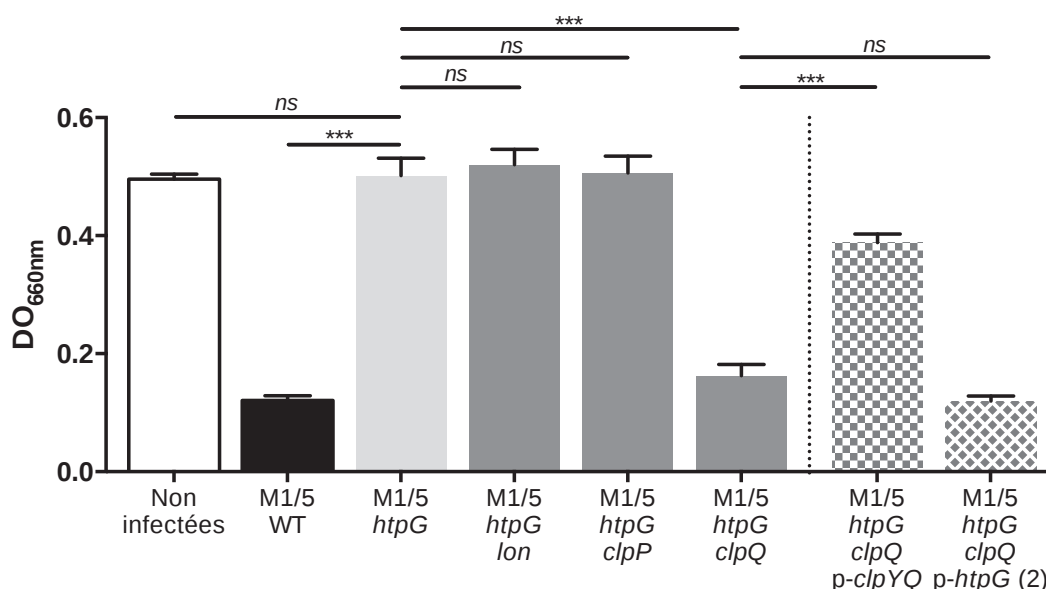


Figure 21. La protéase ClpQ intervient avec Hsp90_{Ec} dans la synthèse de colibactine

La production de colibactine par les souches de *E. coli* M1/5 et ses dérivées est déterminée par quantification de la mégaloctose. Les souches M1/5 sauvage, mutée pour *htpG*, mutées pour *htpG* et un gène codant une protéase (*lon* ou *clpP* ou *clpQ*), ou complémentées, sont ajoutées directement sur des cellules HeLa, et co-cultivées pendant 4 heures avant d'être lavées. Après 72 heures d'incubation post-infection, les cellules sont fixées et colorées au bleu de méthylène, ensuite quantifié par mesure de l'absorbance à 660 nm. Multiplicité d'infection : 200. Analyse statistique : test d'Anova unilatéral. *** : $p < 0,001$; ns : non significatif.

En l'absence conjointe de la protéine chaperon et de la protéase impliquées dans une voie de biosynthèse, le contrôle qualité protéique est interrompu : il n'y a ni participation au repliement protéique, ni dégradation des intermédiaires mal conformés ([Figure 1](#)). Une partie des produits néo-synthétisés, même si mal ou incomplètement conformée, aura tout de même une activité biologique. Ainsi, si une protéase intervient de concert avec Hsp90_{Ec} dans la production de colibactine, nous devrions observer une restauration du phénotype de mégalytose lors de l'infection de cellules eucaryotes par les doubles mutants.

Les données obtenues indiquent que l'interruption des gènes *lon* ou *clpP* dans un mutant *htpG* ne permet pas de restaurer la production de colibactine ([Figure 21](#)). Par contre, l'infection de cellules HeLa par le double mutant *htpG clpQ* induit un phénotype de mégalytose, reflétant ainsi une restauration de la production de colibactine ([Figure 21](#)).

Ces résultats démontrent que la protéase ClpQ joue un rôle dans la production de colibactine, en collaboration avec la protéine chaperon Hsp90_{Ec}. Les expériences de complémentation confirment ces données, puisque la transformation de la souche M1/5 mutée pour *htpG* et *clpQ* par un plasmide portant l'opéron *clpYQ* fonctionnel entraîne une perte du phénotype de mégalytose, identique au phénotype observé avec un simple mutant *htpG*. Au contraire, l'introduction du gène *htpG* fonctionnel dans le double mutant n'induit aucune modification, la mégalytose est bien observée ([Figure 21](#)).

▪ ClpQ est impliquée négativement dans la production de colibactine

Pour mieux comprendre l'implication de ClpQ dans la synthèse de colibactine, nous avons inactivé le gène codant la protéase dans les souches M1/5 et SP15 sauvages. Le phénotype de mégalytose induit par ces mutants a ensuite été quantifié. La simple mutation de *clpQ* n'induit pas de perte de mégalytose, la génotoxine est produite comme dans la souche sauvage ([Figure 22](#)).

Nous avons ensuite transformé les mutants *clpQ* par un plasmide inducible à nombre élevé de copies portant l'opéron *clpYQ* fonctionnel. De façon intéressante, cette souche perd la capacité à induire un phénotype de mégalytose ([Figure 22](#)). L'expression importante de la protéase ClpQ semble donc altérer la production de colibactine. L'introduction du même plasmide p-*clpYQ* dans les souches M1/5 et SP15 sauvages entraîne également une perte de la capacité à produire la colibactine ([Figure 22](#)).

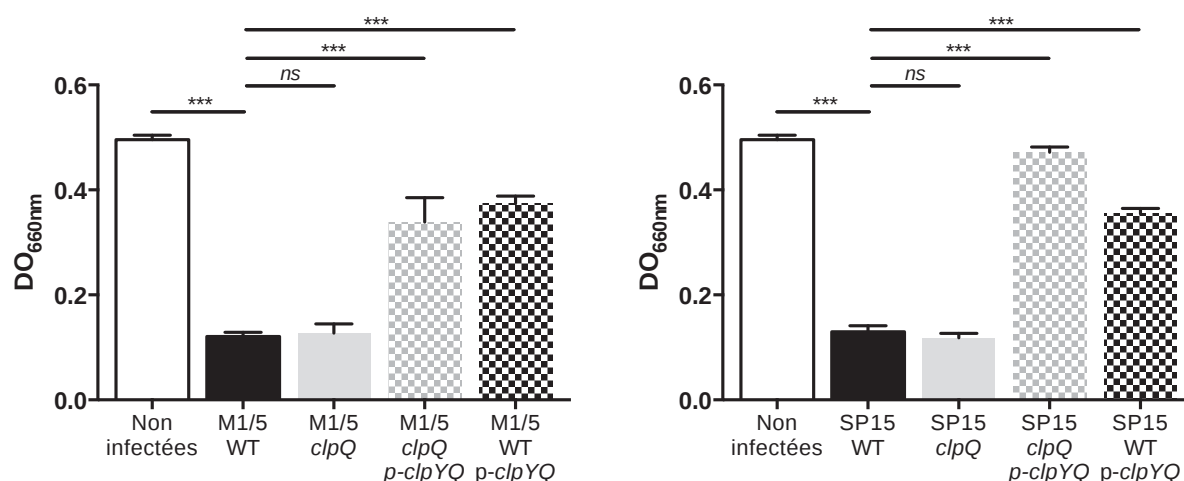


Figure 22. Une surexpression de ClpQ abolit la production de colibactine

La production de colibactine par les souches de *E. coli* M1/5 et SP15 et leurs dérivées est déterminée par quantification de la mégalocytose. Les souches de *E. coli* sauvages, mutées pour *clpQ* ou complétées, sont ajoutées directement sur des cellules HeLa, et co-cultivées pendant 4 heures avant d'être lavées. Après 72 heures d'incubation post-infection, les cellules sont fixées et colorées au bleu de méthylène, quantifié par mesure de l'absorbance à 660 nm. Multiplicité d'infection : 200. Analyse statistique : test d'Anova unilatéral. *** : $p < 0,001$; ns : non significatif.

L'ensemble de ces résultats indique donc que la protéase ClpQ peut abolir la production de la génotoxine, soit en l'absence de Hsp90_{Ec}, soit en condition de surexpression de ClpQ.

▪ Hsp90_{Ec} participe à la virulence de souches d'ExPEC en phase tardive du sepsis

Outre l'aspect mécanistique de l'implication de Hsp90_{Ec} dans la synthèse de colibactine, l'étude de la relevance biologique de cette protéine chaperon dans la virulence bactérienne *in vivo* semble pertinente. Nous avons ainsi analysé l'impact de la mutation de Hsp90_{Ec} au cours d'un sepsis, en utilisant un modèle animal sans ou avec traitement antibiotique, permettant d'étudier respectivement la phase précoce ou tardive de ce processus physiopathologique.

Le modèle murin de sepsis disponible au laboratoire consiste en l'injection dans le coussinet plantaire de PBS (contrôle négatif) ou de suspension bactérienne contenant la souche pathogène ExPEC SP15 sauvage ou mutée pour *htpG*. Pour l'étude de la phase précoce du sepsis, aucun antibiotique n'est administré. Un suivi de la mortalité est réalisé (Figure 23).

Les résultats montrent que toutes les souris testées meurent entre 37 et 60 heures post-injection dans les groupes SP15 sauvage et *htpG* muté. Aucune mortalité n'est observée dans le groupe contrôle (Figure 23). Dans ce modèle, l'absence de la protéine chaperon Hsp90_{Ec} n'atténue pas la virulence de la souche d'ExPEC testée.

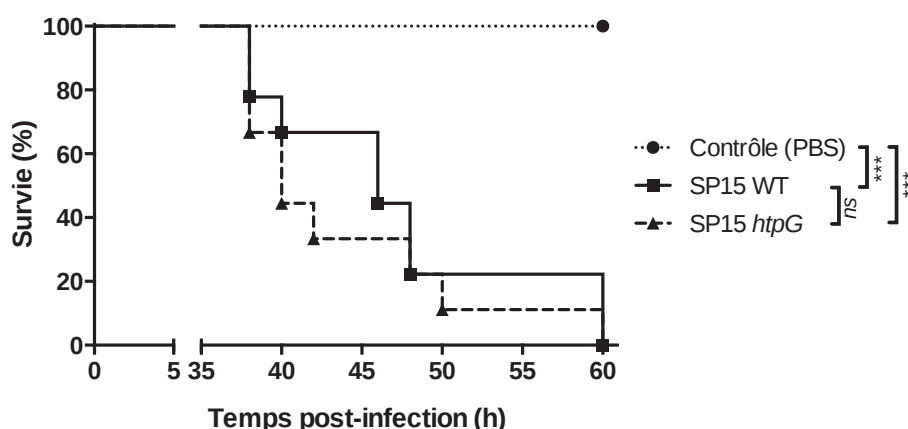


Figure 23. La virulence de la souche d'ExPEC SP15 n'est pas atténuée en l'absence de Hsp90_{Ec} dans un modèle animal étudiant la phase précoce du sepsis

Des souris reçoivent dans le coussinet plantaire une injection de 50 μ L de PBS ou de suspension bactérienne contenant 10^8 UFC de *E. coli* SP15 sauvage ou mutée pour *htpG*. Un suivi de mortalité est effectué sur 60 heures. Nombre d'animaux par groupe : $n = 8$. Analyse statistique : test log-rank. *** : $p < 0,001$; ns : non significatif.

Nous avons également évalué avec ce même modèle la cinétique de la survie bactérienne systémique chez les animaux infectés. Des souris ont été sacrifiées à 4, 6 ou 28 heures après infection, et les bactéries ont été quantifiées dans le sang et la rate (Figure 24).

Les résultats obtenus ne montrent aucune différence quels que soient la localisation et le délai post-infection (Figure 24). La protéine chaperon Hsp90_{Ec} n'est donc pas requise pour la persistance systémique de la souche d'ExPEC SP15 dans la phase précoce du sepsis.

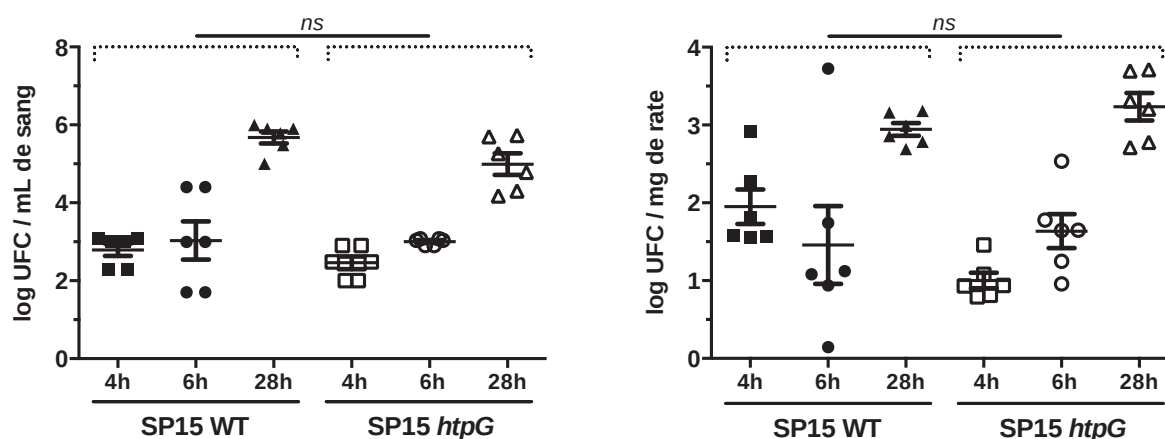


Figure 24. La survie systémique de la souche SP15 n'est pas modifiée en l'absence de Hsp90_{Ec} dans un modèle animal étudiant la phase précoce du sepsis

Des souris reçoivent dans le coussinet plantaire une injection de 50 μ L de PBS ou de suspension bactérienne contenant 10^8 UFC de *E. coli* SP15 sauvage ou mutée pour *htpG*. A 4, 6 ou 28 heures post-infection, 3 souris par groupe sont sacrifiées. Les bactéries sont alors quantifiées dans le sang et la rate prélevés chez ces animaux. Les données présentées ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes dont les résultats ont été groupés. Analyse statistique : test d'Anova bilatéral. ns : non significatif.

Pour évaluer le rôle de Hsp90_{Ec} dans la phase tardive du sepsis, le protocole utilisé dans l'expérience précédente est modifié par l'administration d'un antibiotique, mimant la prise en charge thérapeutique d'un patient septicémique. Des souris reçoivent dans le coussinet plantaire une injection de PBS ou de suspension bactérienne avec la souche d'ExPEC SP15 sauvage ou mutée pour *htpG*. Puis, 21 heures après l'infection, les animaux sont traités par une injection intra-péritonéale de gentamicine. Un suivi de mortalité est réalisé (Figure 25).

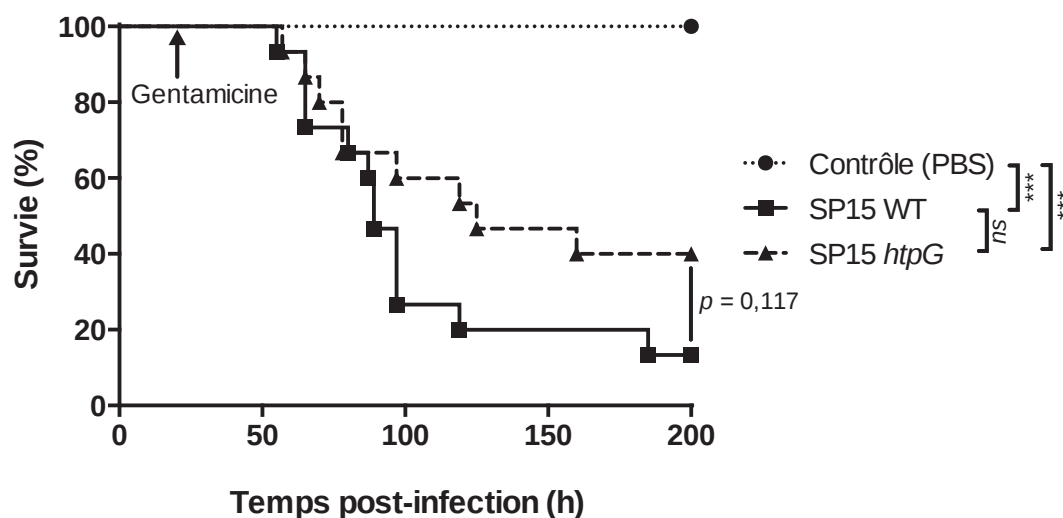


Figure 25. La virulence de la souche SP15 est atténuée en l'absence de Hsp90_{Ec} dans un modèle animal étudiant la phase tardive du sepsis

*Des souris reçoivent dans la patte une injection de 50 μ L de PBS ou de suspension bactérienne contenant 10⁸ UFC de E. coli SP15 sauvage ou *htpG* muté. 21 heures après infection, une injection intrapéritonéale de 100 μ L de gentamicine (1 mg/mL) et deux injections sous-cutanées de 250 μ L de soluté de réhydratation sont réalisées. Un suivi de mortalité est effectué sur 200 h après infection. Nombre d'animaux par groupe : n = 15. Analyse statistique : test log-rank. *** : p < 0,001 ; ns : non significatif.*

L'analyse des courbes de survie semble montrer que la mortalité des souris infectées avec la souche SP15 mutée pour *hptG* est inférieure à celle du groupe sauvage. Aucune mortalité n'est observée dans le groupe contrôle (Figure 25). La diminution de mortalité observée dans le groupe SP15 *htpG* n'est cependant pas statistiquement significative ($p = 0,117$), probablement en raison d'un faible nombre d'animaux.

Dans ce modèle murin de sepsis avec traitement antibiotique, l'absence de la protéine chaperon Hsp90_{Ec} semblerait atténuer la virulence de la souche d'ExPEC SP15 dans la phase tardive du sepsis. Ces résultats doivent être confirmés avec un plus grand nombre d'animaux.

▪ Hsp90_{Ec} est également impliquée dans la biosynthèse de yersiniabactine

Les résultats précédents montrent que la protéine chaperon Hsp90_{Ec} est impliquée dans la synthèse de la colibactine. Nous avons donc voulu savoir si elle participait également à la synthèse des autres composés de type PK-NRP synthétisés par *E. coli*, les sidérophores, qui sont des systèmes de captation du fer, un élément essentiel à leur survie.

Nous avons pour cela évalué la production de yersiniabactine, un des quatre sidérophores de *E. coli*, dans les souches M1/5 et SP15 sauvages ou mutées pour *htpG*. La yersiniabactine produite par ces souches a été quantifiée par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (Figure 26).

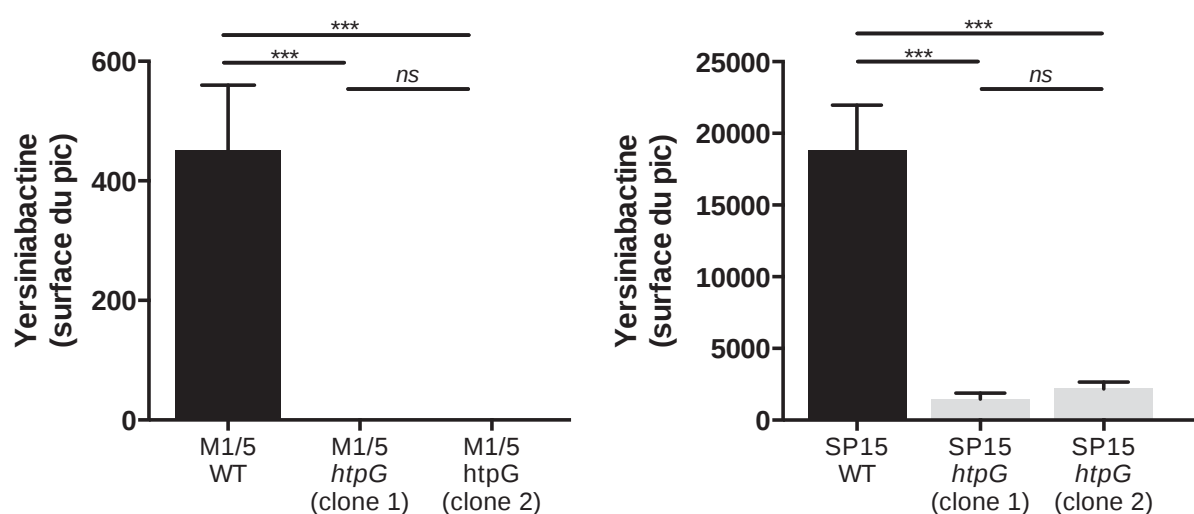


Figure 26. La production de yersiniabactine est diminuée en l'absence de Hsp90_{Ec}

A l'issue d'une culture en milieu M63 glycérol pendant 17 heures à 37°C, la production de yersiniabactine par les souches de *E. coli* M1/5 et SP15 sauvages et mutées pour le gène *htpG* est quantifiée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Les résultats sont exprimés en surface des pics obtenus standardisés en fonction de la quantité de bactéries. Analyse statistique : test d'Anova unilatéral. *** : $p < 0,001$; ns : non significatif.

Les résultats montrent que la production de yersiniabactine est largement altérée, voire presque abolie, dans les souches mutées pour *htpG*, en comparaison aux souches sauvages. La protéine chaperon Hsp90_{Ec} est donc impliquée dans la biosynthèse de deux composés de type PK-NRP produits par *E. coli*, la colibactine et la yersiniabactine.

IV – DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble des résultats de ce travail expérimental indique donc que la protéine chaperon Hsp90_{Ec} est impliquée dans la biosynthèse de deux métabolites produits par *E. coli*, la colibactine et la yersiniabactine. Hsp90_{Ec} est en effet indispensable à la génotoxicité induite par des souches de *E. coli* produisant la colibactine. Elle ne participe pas à la régulation de la transcription de gènes de l'îlot *pks*. Hsp90_{Ec} intervient en collaboration avec la protéase ClpQ. Un équilibre entre les quantités de protéine chaperon et de protéase doit être conservé pour permettre la production de la génotoxine, interrompue par une surexpression de ClpQ. Il semblerait également que Hsp90_{Ec} participe *in vivo* à la virulence de souches d'ExPEC produisant la colibactine en phase tardive du sepsis dans un modèle murin. Ces résultats doivent être confirmés avec un nombre d'animaux plus important. Enfin, Hsp90_{Ec} intervient également dans la biosynthèse de la yersiniabactine, un sidérophore de *E. coli*, qui appartient, comme la colibactine, à la famille chimique des composés de type PK-NRP.

L'implication de l'analogue procaryote de Hsp90 dans la production de PK-NRP a déjà été démontrée pour des métabolites secondaires synthétisés par d'autres espèces bactériennes : l'albicidine, une molécule à activité antibiotique produite par *Xanthomonas albilineans* [84], et l'arthrofactine, un lipopeptide cyclique de *Pseudomonas* sp. à propriétés tensioactives [85]. Le mécanisme d'action de la protéine chaperon n'a pas été démontré, mais les auteurs proposent que HtpG favoriserait le repliement conformationnel des enzymes de biosynthèse. Par ailleurs, une autre étude a montré que le système DnaKJE est également impliqué dans la synthèse de PK-NRP, la putisolvine, un autre lipopeptide tensioactif produit par *Pseudomonas putida* [125]. Les auteurs évoquent plusieurs mécanismes d'action potentiels, mais s'orientent préférentiellement vers une action sur le repliement conformationnel de facteurs régulant positivement la production de putisolvine.

L'analyse de la littérature ci-dessus nous conduit à proposer trois hypothèses non mutuellement exclusives concernant le mécanisme d'action et les partenaires potentiels de Hsp90_{Ec} dans la biosynthèse de colibactine et de yersiniabactine : (i) Hsp90_{Ec} favoriserait le repliement de certaines enzymes des machineries de biosynthèse ; (ii) Hsp90_{Ec} permettrait l'assemblage et la stabilisation de ces complexes multimoléculaires ; (iii) Hsp90_{Ec} participerait à la régulation post-transcriptionnelle des voies de biosynthèse.

Dans le but d'élucider le mécanisme d'action de Hsp90_{Ec}, il est indispensable d'identifier sa ou ses protéines clientes dans chaque voie de biosynthèse. En analysant *in silico* la liste des substrats potentiels proposés par les deux études d'interactome de Hsp90_{Ec} [74, 75], nous avons identifié un candidat potentiel : EntD, une phosphopantéthéinyl transférase (PPTase). EntD est impliquée dans la biosynthèse d'entérobactine, de salmocheline et de yersiniabactine, trois sidérophores de *E. coli* [126]. Les PPTases sont des enzymes essentielles dans les voies de biosynthèse PKS-NRPS [127]. Elles sont en effet responsables de l'activation des PKS et NRPS par transfert de motifs phosphopantéthéinyls du coenzyme A sur les résidus sérines des modules enzymatiques [128]. Les souches produisant la colibactine synthétisent une autre PPTase, ClbA, codée par l'îlot *pks* (Figure 16), qui est responsable de l'activation des différentes PKS et NRPS nécessaires à la biosynthèse de la génotoxine [107].

Sur le plan conceptuel, la présence de EntD dans l'interactome de Hsp90_{Ec} [75] est particulièrement intéressante, et suggère l'hypothèse que cette protéine chaperon favorise le repliement conformationnel des PPTases, enzymes indispensables à la synthèse des PK-NRP. Afin de vérifier cette hypothèse, des expériences de co-immunoprécipitation entre la protéine chaperon Hsp90_{Ec} et les deux PPTases de *E. coli*, EntD et ClbA, sont actuellement en cours.

La démonstration de l'implication de Hsp90_{Ec} dans deux voies de biosynthèse permettant la production de métabolites secondaires à fonctions distinctes chez une même bactérie est également attrayante. Nous avons récemment identifié une autre connexion entre la production de colibactine et de sidérophores chez *E. coli* (Figure 27) [123]. La PPTase ClbA, codée par l'îlot *pks* et principalement impliquée dans la synthèse de colibactine, peut suppléer la PPTase EntD dans l'activation des enzymes produisant les sidérophores. Ainsi, avec les PPTases, la protéine chaperon Hsp90_{Ec} est un régulateur clé additionnel dans la synthèse de facteurs de virulence et de fitness de certaines souches de *E. coli*. La mise en évidence de ces différents niveaux de connexions dans la régulation de la production de ces métabolites secondaires est essentielle pour la compréhension de la pathogénicité de *E. coli*, qui semble être orchestrée par un système intégré finement régulé. De la prise en compte de ces connexions pourrait dépendre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour le développement de stratégies anti-infectieuses innovantes.

Nous avons par ailleurs montré qu'une souche d'ExPEC mutée pour le gène *htpG* présenterait une virulence atténuée dans un modèle murin étudiant la phase tardive du sepsis en mimant la prise en charge thérapeutique d'un patient septicémique (Figure 25). Le rôle de HtpG dans la virulence a déjà été établie *in vivo* dans différents modèles animaux, chez *Edwardsiella tarda* [92], *Francisella tularensis* [95] et *Leptospira interrogans* [96].

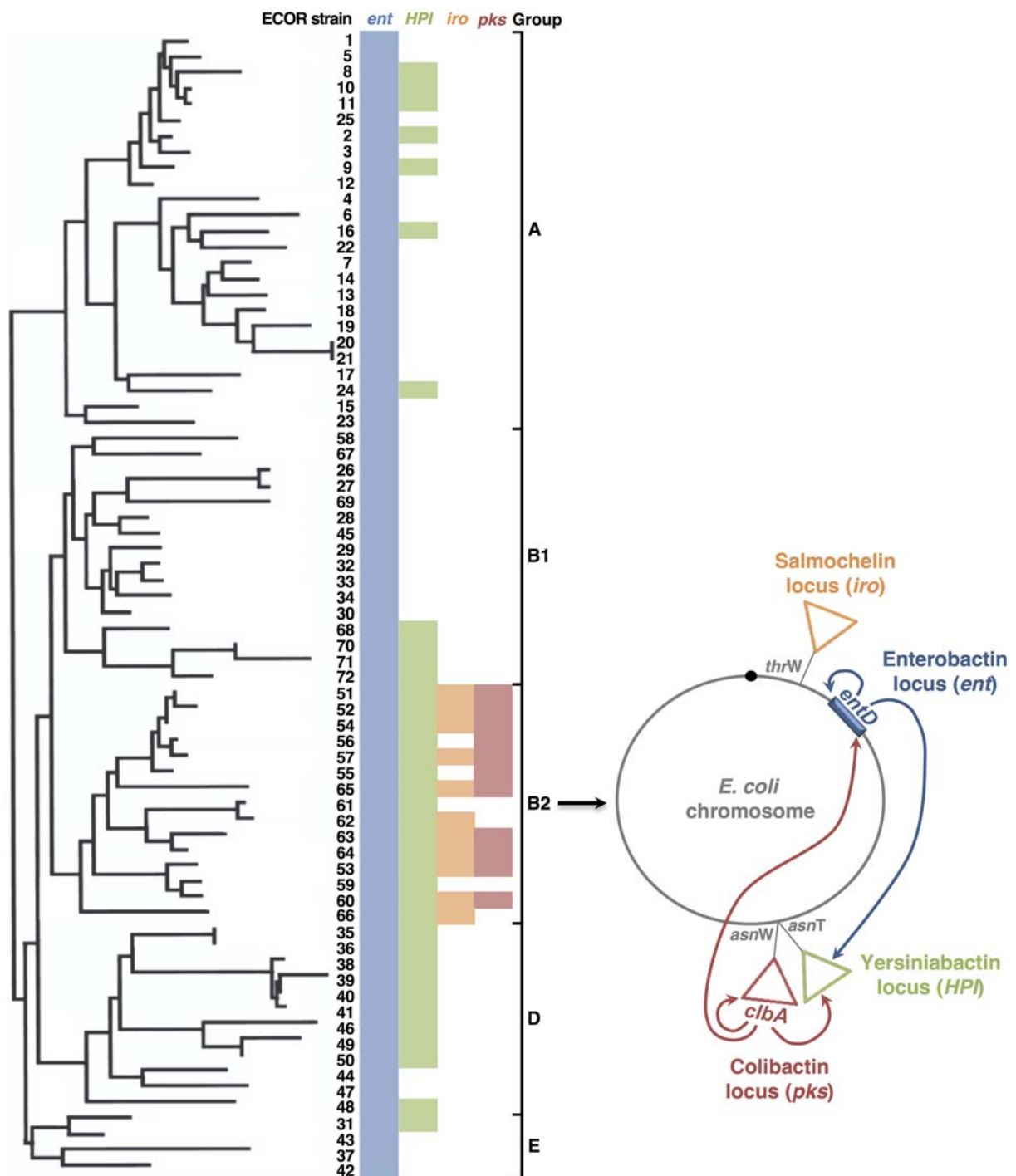


Figure 27. Connexion entre les voies de synthèse de colibactine et de yersiniabactine

Gauche. Distribution phylogénétique des souches de références de *E. coli* (collection ECOR) [129]. Les souches portant le locus *ent* (entérobactine) sont indiquées en bleu, l'îlot HPI (yersiniabactine) en vert, le locus *iro* (salmochéline) en orange, et l'îlot *pks* (colibactine) en rouge.

Droite. Archétype du chromosome des souches de *E. coli* appartenant au phylogroupe B2 [123]. Les loci codant l'entérobactine (*ent*), la yersiniabactine (*HPI*), la salmochéline (*iro*) et la colibactine (*pks*) sont représentés selon leur position sur le chromosome avec le même code couleur que précédemment. Les flèches symbolisent l'interconnexion entre les différentes voies de biosynthèse. EntD participe à la production d'entérobactine et de yersiniabactine, mais pas de colibactine. ClbA participe à la synthèse de colibactine, d'entérobactine et de yersiniabactine.

La démonstration de l'implication de l'analogue procaryote de Hsp90 dans la virulence de plusieurs espèces bactériennes constitue un argument fort pour considérer cette protéine chaperon comme cible thérapeutique anti-infectieuse potentielle, à l'image de ce qui est décrit dans le traitement de certains cancers [100], de protozooses [103] ou encore d'infections fongiques [104]. De nombreux inhibiteurs de l'activité ATPasique de Hsp90 ont été développés depuis la découverte de la geldamycine, la novobiocine ou le radicicol. Les essais cliniques menés actuellement utilisent des molécules dérivées mieux tolérées, présentant une meilleure efficacité et des modalités d'administration facilitées [99].

La principale difficulté rencontrée par cette stratégie repose sur l'homologie importante entre les différents analogues de la protéine Hsp90. Avec 40% d'identité de séquences entre Hsp90 humaine et procaryote [57], il est particulièrement difficile de développer des inhibiteurs spécifiques d'un règne du vivant, d'autant plus que la cible d'action moléculaire se situe dans la région très conservée du site ATPasique de la protéine chaperon [102]. Le développement de molécules anti-Hsp90 non spécifiques comme traitement antibiotique, agissant indifféremment sur cellules eucaryotes et procaryotes, et potentiellement responsables d'effets indésirables, n'est pas recevable à une époque où les stratégies thérapeutiques deviennent ciblées, voire personnalisées [130]. Il est donc indispensable d'approfondir nos connaissances structurales, mécanistiques et fonctionnelles concernant l'analogue procaryote de Hsp90, pour développer une stratégie thérapeutique robuste.

Dans cette optique, une récente étude a présenté les résultats d'un criblage de molécules se liant spécifiquement sur HtpG [131]. Minagawa *et al.* ont notamment mis en évidence que des dérivés de la colistine et de la polymyxine B, deux antibiotiques utilisés en médecine, sont capables de se fixer sur le domaine N-terminal (NTD) de HtpG, au niveau d'une région distincte du site ATPasique. Les auteurs montrent de plus que le sulfate de colistine inhibe l'activité chaperon sans affecter l'activité ATPasique, en induisant l'oligomérisation des NTD, ce qui interrompt le cycle réactionnel de la protéine chaperon [131]. Les données présentées semblent en faveur d'une inhibition spécifique de HtpG, mais doivent être confirmées.

L'acquisition de nouvelles données sur l'analogue procaryote de Hsp90 dans les prochaines années devrait permettre d'identifier des inhibiteurs spécifiques, dans l'objectif à terme de les tester dans le cadre d'essais cliniques en thérapeutique anti-infectieuse.

BIBLIOGRAPHIE

1. Doyle S.M., Genest O. and Wickner S. Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2013). **14**:617–629.
2. Jahn T.R. and Radford S.E. Folding versus aggregation: polypeptide conformations on competing pathways. *Arch Biochem Biophys* (2008). **469**:100–117.
3. Ellis R.J. and Minton A.P. Protein aggregation in crowded environments. *Biol Chem* (2006). **387**:485–497.
4. Mogk A., Huber D. and Bukau B. Integrating protein homeostasis strategies in prokaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2011). **3**:a004366.
5. Komar A.A. A pause for thought along the co-translational folding pathway. *Trends Biochem Sci* (2009). **34**:16–24.
6. Castanié-Cornet M.-P., Bruel N. and Genevaux P. Chaperone networking facilitates protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Biochim Biophys Acta* (2013). doi:10.1016/j.bbamcr.2013.11.007.
7. Valent Q.A., Kendall D.A., High S., Kusters R. *et al.* Early events in preprotein recognition in *E. coli*: interaction of SRP and trigger factor with nascent polypeptides. *EMBO J* (1995). **14**:5494–5505.
8. Hoffmann A., Bukau B. and Kramer G. Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor. *Biochim Biophys Acta* (2010). **1803**:650–661.
9. Hartl F.U. and Hayer-Hartl M. Converging concepts of protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Nat Struct Mol Biol* (2009). **16**:574–581.
10. Kaiser C.M., Chang H.-C., Agashe V.R., Lakshmipathy S.K. *et al.* Real-time observation of trigger factor function on translating ribosomes. *Nature* (2006). **444**:455–460.
11. Martinez-Hackert E. and Hendrickson W.A. Promiscuous substrate recognition in folding and assembly activities of the trigger factor chaperone. *Cell* (2009). **138**:923–934.
12. Deuerling E., Schulze-Specking A., Tomoyasu T., Mogk A. *et al.* Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature* (1999). **400**:693–696.
13. Merz F., Boehringer D., Schaffitzel C., Preissler S. *et al.* Molecular mechanism and structure of Trigger Factor bound to the translating ribosome. *EMBO J* (2008). **27**:1622–1632.
14. Kandror O. and Goldberg A.L. Trigger factor is induced upon cold shock and enhances viability of *Escherichia coli* at low temperatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997). **94**:4978–4981.
15. Genevaux P., Keppel F., Schwager F., Langendijk-Genevaux P.S. *et al.* *In vivo* analysis of the overlapping functions of DnaK and trigger factor. *EMBO Rep* (2004). **5**:195–200.
16. Genevaux P., Georgopoulos C. and Kelley W.L. The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli*: a paradigm for the repartition of chaperone functions. *Mol Microbiol* (2007). **66**:840–857.
17. Swain J.F., Dinler G., Sivendran R., Montgomery D.L. *et al.* Hsp70 chaperone ligands control domain association via an allosteric mechanism mediated by the interdomain linker. *Mol Cell* (2007). **26**:27–39.

18. Brehmer D., Rüdiger S., Gässler C.S., Klostermeier D. *et al.* Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nat Struct Biol* (2001). **8**:427–432.
19. Mayer M.P. and Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci CMLS* (2005). **62**:670–684.
20. Rüdiger S., Germeroth L., Schneider-Mergener J. and Bukau B. Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J* (1997). **16**:1501–1507.
21. Calloni G., Chen T., Schermann S.M., Chang H. *et al.* DnaK Functions as a Central Hub in the *E. coli* Chaperone Network. *Cell Rep* (2012). **1**:251–264.
22. Fayet O., Ziegelhoffer T. and Georgopoulos C. The *groES* and *groEL* heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J Bacteriol* (1989). **171**:1379–1385.
23. Saibil H.R., Fenton W.A., Clare D.K. and Horwich A.L. Structure and allostery of the chaperonin GroEL. *J Mol Biol* (2013). **425**:1476–1487.
24. Nojima T., Ikegami T., Taguchi H. and Yoshida M. Flexibility of GroES mobile loop is required for efficient chaperonin function. *J Mol Biol* (2012). **422**:291–299.
25. Jewett A.I. and Shea J.-E. Reconciling theories of chaperonin accelerated folding with experimental evidence. *Cell Mol Life Sci CMLS* (2010). **67**:255–276.
26. Kerner M.J., Naylor D.J., Ishihama Y., Maier T. *et al.* Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *Escherichia coli*. *Cell* (2005). **122**:209–220.
27. Horwich A.L. and Fenton W.A. Chaperonin-mediated protein folding: using a central cavity to kinetically assist polypeptide chain folding. *Q Rev Biophys* (2009). **42**:83–116.
28. Lin Z., Madan D. and Rye H.S. GroEL stimulates protein folding through forced unfolding. *Nat Struct Mol Biol* (2008). **15**:303–311.
29. Horwich A.L., Low K.B., Fenton W.A., Hirshfield I.N. *et al.* Folding *in vivo* of bacterial cytoplasmic proteins: role of GroEL. *Cell* (1993). **74**:909–917.
30. Ruiz N., Kahne D. and Silhavy T.J. Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nat Rev Microbiol* (2006). **4**:57–66.
31. Driessen A.J.M. and Nouwen N. Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem* (2008). **77**:643–667.
32. Hartl F.U., Lecker S., Schiebel E., Hendrick J.P. *et al.* The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. *Cell* (1990). **63**:269–279.
33. Baneyx F. and Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* (2004). **22**:1399–1408.
34. Leichert L.I. Proteomic methods unravel the protein quality control in *Escherichia coli*. *Proteomics* (2011). **11**:3023–3035.
35. Ito K. and Inaba K. The disulfide bond formation (Dsb) system. *Curr Opin Struct Biol* (2008). **18**:450–458.
36. Krojer T., Sawa J., Schäfer E., Saibil H.R. *et al.* Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature* (2008). **453**:885–890.

37. Guisbert E., Yura T., Rhodius V.A. and Gross C.A. Convergence of molecular, modeling, and systems approaches for an understanding of the *Escherichia coli* heat shock response. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* (2008). **72**:545–554.
38. Mogk A., Tomoyasu T., Goloubinoff P., Rüdiger S. *et al.* Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J* (1999). **18**:6934–6949.
39. Groemping Y. and Reinstein J. Folding properties of the nucleotide exchange factor GrpE from *Thermus thermophilus*: GrpE is a thermosensor that mediates heat shock response. *J Mol Biol* (2001). **314**:167–178.
40. Winter J., Linke K., Jatzek A. and Jakob U. Severe oxidative stress causes inactivation of DnaK and activation of the redox-regulated chaperone Hsp33. *Mol Cell* (2005). **17**:381–392.
41. Winter J., Ilbert M., Graf P.C.F., Ozcelik D. *et al.* Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. *Cell* (2008). **135**:691–701.
42. Mogk A., Deuerling E., Vorderwülbecke S., Vierling E. *et al.* Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Mol Microbiol* (2003). **50**:585–595.
43. Haslbeck M., Franzmann T., Weinfurtner D. and Buchner J. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat Struct Mol Biol* (2005). **12**:842–846.
44. Weibezahn J., Tessarz P., Schlieker C., Zahn R. *et al.* Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB. *Cell* (2004). **119**:653–665.
45. Haslberger T., Zdanowicz A., Brand I., Kirstein J. *et al.* Protein disaggregation by the AAA+ chaperone ClpB involves partial threading of looped polypeptide segments. *Nat Struct Mol Biol* (2008). **15**:641–650.
46. Sabate R., de Groot N.S. and Ventura S. Protein folding and aggregation in bacteria. *Cell Mol Life Sci CMLS* (2010). **67**:2695–2715.
47. Thomas J.G. and Baneyx F. ClpB and HtpG facilitate de novo protein folding in stressed *Escherichia coli* cells. *Mol Microbiol* (2000). **36**:1360–1370.
48. Sauer R.T. and Baker T.A. AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction. *Annu Rev Biochem* (2011). **80**:587–612.
49. Maisonneuve E., Fraysse L., Moinier D. and Dukan S. Existence of abnormal protein aggregates in healthy *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* (2008). **190**:887–893.
50. Lindner A.B., Madden R., Demarez A., Stewart E.J. *et al.* Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008). **105**:3076–3081.
51. Winkler J., Seybert A., König L., Pruggnaller S. *et al.* Quantitative and spatio-temporal features of protein aggregation in *Escherichia coli* and consequences on protein quality control and cellular ageing. *EMBO J* (2010). **29**:910–923.
52. Narberhaus F., Waldminghaus T. and Chowdhury S. RNA thermometers. *FEMS Microbiol Rev* (2006). **30**:3–16.

53. Nonaka G., Blankschien M., Herman C., Gross C.A. *et al.* Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, sigma32, reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *Genes Dev* (2006). **20**:1776–1789.
54. Bukau B. Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol Microbiol* (1993). **9**:671–680.
55. Richter K., Haslbeck M. and Buchner J. The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell* (2010). **40**:253–266.
56. Taipale M., Jarosz D.F. and Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2010). **11**:515–528.
57. Gupta R.S. Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Mol Biol Evol* (1995). **12**:1063–1073.
58. Neidhardt F.C., VanBogelen R.A. and Vaughn V. The genetics and regulation of heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* (1984). **18**:295–329.
59. Mason C.A., Dünner J., Indra P. and Colangelo T. Heat-induced expression and chemically induced expression of the *Escherichia coli* stress protein HtpG are affected by the growth environment. *Appl Environ Microbiol* (1999). **65**:3433–3440.
60. Bardwell J.C. and Craig E.A. Ancient heat shock gene is dispensable. *J Bacteriol* (1988). **170**:2977–2983.
61. Huai Q., Wang H., Liu Y., Kim H.-Y. *et al.* Structures of the N-terminal and middle domains of *E. coli* Hsp90 and conformation changes upon ADP binding. *Struct Lond Engl* 1993 (2005). **13**:579–590.
62. Harris S.F., Shiau A.K. and Agard D.A. The crystal structure of the carboxy-terminal dimerization domain of HtpG, the *Escherichia coli* Hsp90, reveals a potential substrate binding site. *Struct Lond Engl* 1993 (2004). **12**:1087–1097.
63. Shiau A.K., Harris S.F., Southworth D.R. and Agard D.A. Structural Analysis of *E. coli* Hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements. *Cell* (2006). **127**:329–340.
64. Pearl L.H. and Prodromou C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem* (2006). **75**:271–294.
65. Genest O., Reidy M., Street T.O., Hoskins J.R. *et al.* Uncovering a region of heat shock protein 90 important for client binding in *E. coli* and chaperone function in yeast. *Mol Cell* (2013). **49**:464–473.
66. Graf C., Stankiewicz M., Kramer G. and Mayer M.P. Spatially and kinetically resolved changes in the conformational dynamics of the Hsp90 chaperone machine. *EMBO J* (2009). **28**:602–613.
67. Krukenberg K.A., Förster F., Rice L.M., Sali A. *et al.* Multiple conformations of *E. coli* Hsp90 in solution: insights into the conformational dynamics of Hsp90. *Struct Lond Engl* 1993 (2008). **16**:755–765.
68. Krukenberg K.A., Southworth D.R., Street T.O. and Agard D.A. pH-dependent conformational changes in bacterial Hsp90 reveal a Grp94-like conformation at pH 6 that is highly active in suppression of citrate synthase aggregation. *J Mol Biol* (2009). **390**:278–291.

69. Southworth D.R. and Agard D.A. Species-dependent ensembles of conserved conformational states define the Hsp90 chaperone ATPase cycle. *Mol Cell* (2008). **32**:631–640.
70. Genest O., Hoskins J.R., Camberg J.L., Doyle S.M. *et al.* Heat shock protein 90 from *Escherichia coli* collaborates with the DnaK chaperone system in client protein remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011). **108**:8206–8211.
71. Richter K. and Buchner J. Hsp90: twist and fold. *Cell* (2006). **127**:251–253.
72. Street T.O., Lavery L.A. and Agard D.A. Substrate binding drives large-scale conformational changes in the Hsp90 molecular chaperone. *Mol Cell* (2011). **42**:96–105.
73. Wandinger S.K., Richter K. and Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem* (2008). **283**:18473–18477.
74. Butland G., Peregrín-Alvarez J.M., Li J., Yang W. *et al.* Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature* (2005). **433**:531–537.
75. Arifuzzaman M., Maeda M., Itoh A., Nishikata K. *et al.* Large-scale identification of protein-protein interaction of *Escherichia coli* K-12. *Genome Res* (2006). **16**:686–691.
76. Motojima-Miyazaki Y., Yoshida M. and Motojima F. Ribosomal protein L2 associates with *E. coli* HtpG and activates its ATPase activity. *Biochem Biophys Res Commun* (2010). **400**:241–245.
77. Yosef I., Goren M.G., Kiro R., Edgar R. *et al.* High-temperature protein G is essential for activity of the *Escherichia coli* clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas system. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011). **108**:20136–20141.
78. Grudniak A.M., Pawlak K., Bartosik K. and Wolska K.I. Physiological consequences of mutations in the *htpG* heat shock gene of *Escherichia coli*. *Mutat Res* (2013). **745-746**:1–5.
79. Inoue T., Shingaki R., Hirose S., Waki K. *et al.* Genome-wide screening of genes required for swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* (2007). **189**:950–957.
80. Press M.O., Li H., Creanza N., Kramer G. *et al.* Genome-scale co-evolutionary inference identifies functions and clients of bacterial Hsp90. *PLoS Genet* (2013). **9**:e1003631.
81. Street T.O., Zeng X., Pellarin R., Bonomi M. *et al.* Elucidating the Mechanism of Substrate Recognition by the Bacterial Hsp90 Molecular Chaperone. *J Mol Biol* (2014). doi:10.1016/j.jmb.2014.04.001.
82. Li H. and Sourjik V. Assembly and stability of flagellar motor in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* (2011). **80**:886–899.
83. Sato T., Minagawa S., Kojima E., Okamoto N. *et al.* HtpG, the prokaryotic homologue of Hsp90, stabilizes a phycobilisome protein in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Mol Microbiol* (2010). **76**:576–589.
84. Vivien E., Megessier S., Pieretti I., Cociancich S. *et al.* *Xanthomonas albilineans* HtpG is required for biosynthesis of the antibiotic and phytotoxin albicidin. *FEMS Microbiol Lett* (2005). **251**:81–89.

85. Washio K., Lim S.P., Roongsawang N. and Morikawa M. Identification and characterization of the genes responsible for the production of the cyclic lipopeptide arthrofactin by *Pseudomonas* sp. MIS38. *Biosci Biotechnol Biochem* (2010). **74**:992–999.
86. Roongsawang N., Washio K. and Morikawa M. Diversity of nonribosomal Peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *Int J Mol Sci* (2010). **12**:141–172.
87. Saito M., Watanabe S., Yoshikawa H. and Nakamoto H. Interaction of the molecular chaperone HtpG with uroporphyrinogen decarboxylase in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Biosci Biotechnol Biochem* (2008). **72**:1394–1397.
88. Tanaka N. and Nakamoto H. HtpG is essential for the thermal stress management in cyanobacteria. *FEBS Lett* (1999). **458**:117–123.
89. Hossain M.M. and Nakamoto H. Role for the cyanobacterial HtpG in protection from oxidative stress. *Curr Microbiol* (2003). **46**:70–76.
90. Versteeg S., Mogk A. and Schumann W. The *Bacillus subtilis* *htpG* gene is not involved in thermal stress management. *Mol Gen Genet MGG* (1999). **261**:582–588.
91. Mann M.S., Dragovic Z., Schirmacher G. and Lütke-Eversloh T. Over-expression of stress protein-encoding genes helps *Clostridium acetobutylicum* to rapidly adapt to butanol stress. *Biotechnol Lett* (2012). **34**:1643–1649.
92. Dang W., Hu Y. and Sun L. HtpG is involved in the pathogenesis of *Edwardsiella tarda*. *Vet Microbiol* (2011). **152**:394–400.
93. Choi S., Jang K., Choi S., Yun H.-J. *et al.* Identification of the *Vibrio vulnificus* *htpG* gene and its influence on cold shock recovery. *J Microbiol Seoul Korea* (2012). **50**:707–711.
94. García-Descalzo L., Alcazar A., Baquero F. and Cid C. Identification of *in vivo* HSP90-interacting proteins reveals modularity of HSP90 complexes is dependent on the environment in psychrophilic bacteria. *Cell Stress Chaperones* (2011). **16**:203–218.
95. Weiss D.S., Brotcke A., Henry T., Margolis J.J. *et al.* *In vivo* negative selection screen identifies genes required for *Francisella virulence*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007). **104**:6037–6042.
96. King A.M., Pretre G., Bartpho T., Sermswan R.W. *et al.* High-Temperature Protein G Is an Essential Virulence Factor of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* (2014). **82**:1123–1131.
97. Kumar M. and Sourjik V. Physical map and dynamics of the chaperone network in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* (2012). **84**:736–747.
98. Nakamoto H., Fujita K., Ohtaki A., Watanabe S. *et al.* Physical interaction between bacterial heat shock protein (Hsp) 90 and Hsp70 chaperones mediates their cooperative action to refold denatured proteins. *J Biol Chem* (2014). **289**:6110–6119.
99. Jackson S.E. Hsp90: structure and function. *Top Curr Chem* (2013). **328**:155–240.
100. Jhaveri K., Taldone T., Modi S. and Chiosis G. Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers. *Biochim Biophys Acta* (2012). **1823**:742–755.
101. Luheshi L.M. and Dobson C.M. Bridging the gap: from protein misfolding to protein misfolding diseases. *FEBS Lett* (2009). **583**:2581–2586.

102. Neckers L. and Tatu U. Molecular chaperones in pathogen virulence: emerging new targets for therapy. *Cell Host Microbe* (2008). **4**:519–527.
103. Angel S.O., Matrajt M. and Echeverria P.C. A review of recent patents on the protozoan parasite HSP90 as a drug target. *Recent Pat Biotechnol* (2013). **7**:2–8.
104. Veri A. and Cowen L.E. Progress and prospects for targeting Hsp90 to treat fungal infections. *Parasitology* (2014). doi:10.1017/S0031182013002072.
105. Tenaillon O., Skurnik D., Picard B. and Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* (2010). **8**:207–217.
106. Kaper J.B., Nataro J.P. and Mobley H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* (2004). **2**:123–140.
107. Nougayrède J.-P., Homburg S., Taieb F., Boury M. *et al.* *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* (2006). **313**:848–851.
108. Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Unsal-Kaçmaz K. and Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* (2004). **73**:39–85.
109. Cuevas-Ramos G., Petit C.R., Marcq I., Boury M. *et al.* *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010). **107**:11537–11542.
110. Secher T., Samba-Louaka A., Oswald E. and Nougayrède J.-P. *Escherichia coli* producing colibactin triggers premature and transmissible senescence in mammalian cells. *PLoS One* (2013). **8**:e77157.
111. Olier M., Marcq I., Salvador-Cartier C., Secher T. *et al.* Genotoxicity of *Escherichia coli* Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. *Gut Microbes* (2012). **3**:501–509.
112. Marcq I., Martin P., Payros D., Cuevas-Ramos G. *et al.* The Genotoxin Colibactin Exacerbates Lymphopenia and Decreases Survival Rate in Mice Infected With Septicemic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* (2014). doi:10.1093/infdis/jiu071.
113. Walsh C.T. Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility. *Science* (2004). **303**:1805–1810.
114. Johnson J.R., Johnston B., Kuskowski M.A., Nougayrède J.-P. *et al.* Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* *pks* genomic island. *J Clin Microbiol* (2008). **46**:3906–3911.
115. Putze J., Hennequin C., Nougayrède J.-P., Zhang W. *et al.* Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members of the family *Enterobacteriaceae*. *Infect Immun* (2009). **77**:4696–4703.
116. Fischbach M.A. and Walsh C.T. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chem Rev* (2006). **106**:3468–3496.
117. Henderson B., Allan E. and Coates A.R.M. Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection. *Infect Immun* (2006). **74**:3693–3706.
118. Gophna U. and Ron E.Z. Virulence and the heat shock response. *Int J Med Microbiol IJMM* (2003). **292**:453–461.

119. Ochman H. and Selander R.K. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* (1984). **157**:690–693.
120. Datsenko K.A. and Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000). **97**:6640–6645.
121. Zhou K., Zhou L., Lim Q. 'En, Zou R. *et al.* Novel reference genes for quantifying transcriptional responses of *Escherichia coli* to protein overexpression by quantitative PCR. *BMC Mol Biol* (2011). doi:10.1186/1471-2199-12-18.
122. Audebert M., Riu A., Jacques C., Hillenweck A. *et al.* Use of the γ H2AX assay for assessing the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell lines. *Toxicol Lett* (2010). **199**:182–192.
123. Martin P., Marcq I., Magistro G., Penary M. *et al.* Interplay between Siderophores and Colibactin Genotoxin Biosynthetic Pathways in *Escherichia coli*. *PLoS Pathog* (2013). **9**:e1003437.
124. Homburg S., Oswald E., Hacker J. and Dobrindt U. Expression analysis of the colibactin gene cluster coding for a novel polyketide in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* (2007). **275**:255–262.
125. Dubern J.-F., Lagendijk E.L., Lugtenberg B.J.J. and Bloemberg G.V. The heat shock genes *dnaK*, *dnaJ*, and *grpE* are involved in regulation of putisolvin biosynthesis in *Pseudomonas putida* PCL1445. *J Bacteriol* (2005). **187**:5967–5976.
126. Gehring A.M., Bradley K.A. and Walsh C.T. Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry (Mosc)* (1997). **36**:8495–8503.
127. Lambalot R.H., Gehring A.M., Flugel R.S., Zuber P. *et al.* A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol* (1996). **3**:923–936.
128. Copp J.N. and Neilan B.A. The phosphopantetheinyl transferase superfamily: phylogenetic analysis and functional implications in cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* (2006). **72**:2298–2305.
129. Chaudhuri R.R. and Henderson I.R. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infect Genet Evol* (2012). **12**:214–226.
130. Hudson T.J. Genome variation and personalized cancer medicine. *J Intern Med* (2013). **274**:440–450.
131. Minagawa S., Kondoh Y., Sueoka K., Osada H. *et al.* Cyclic lipopeptide antibiotics bind to the N-terminal domain of the prokaryotic Hsp90 to inhibit the chaperone activity. *Biochem J* (2011). **435**:237–246.

ABSTRACT

Role of the Hsp90_{Ec} molecular chaperone in *Escherichia coli* virulence

The *pks* genomic island, encoding the non-protein genotoxin colibactin, is present in some *E. coli* strains. These genotoxic bacteria also produce siderophores, iron-uptake systems belonging to the same chemical family. We recently highlighted a critical interplay between the biosynthetic pathways of colibactin and siderophores in *E. coli* during sepsis, and we report here an additional connection between these virulence factors.

Heat shock proteins are ubiquitous and conserved molecular chaperones that assist in protein folding during stress conditions, acting together with proteases to regulate protein homeostasis. Hsp90_{Ec}, also called HtpG, is the prokaryotic analog of the eukaryotic Heat shock protein 90. Experiments performed with a *htpG* mutant allowed us to demonstrate that Hsp90_{Ec} is involved in biosynthesis of colibactin and siderophores. We also showed that ClpQ participate in colibactin production in concert with Hsp90_{Ec}. Furthermore, a genotoxic *E. coli* strain disrupted for *htpG* gene displays attenuated virulence in a murine model of sepsis.

Taking together, these results demonstrate an additional interplay between colibactin and siderophores synthesis, and highlight the complex regulatory interaction of virulence features with different functions. Identification of the key points of these networks is not only essential for the understanding of *E. coli* virulence, but also an attractive and promising target for the development of anti-virulence therapy strategies.

TITRE :

RÔLE DE LA PROTÉINE CHAPERON Hsp90_{Ec} DANS LA VIRULENCE DE *Escherichia coli*

RÉSUMÉ en français :

L'îlot génomique *pks*, codant la colibactine, une génotoxine non protéique, est présent chez certaines souches de *E. coli*. Ces bactéries génotoxiques produisent également des sidérophores, systèmes de recapture du fer appartenant à la même famille chimique. Nous avons récemment mis en évidence un lien étroit entre les voies de biosynthèse de colibactine et de sidérophores chez *E. coli* durant un sepsis, et nous rapportons ici une connexion additionnelle dans la synthèse de ces facteurs de virulence.

Les protéines de choc thermique sont des chaperons moléculaires ubiquitaires et hautement conservées, participant au repliement des protéines en conditions de stress, et qui agissent de concert avec des protéases pour maintenir l'homéostasie protéique. Hsp90_{Ec}, également appelée HtpG, est l'analogue procaryote de la protéine *Heat shock protein 90* eucaryote. Grâce à une souche mutée pour le gène *htpG*, nous avons démontré que Hsp90_{Ec} est nécessaire à la biosynthèse de colibactine et de sidérophores. Nous avons également mis en évidence que la protéase ClpQ participe à la production de colibactine conjointement à Hsp90_{Ec}. Enfin, une souche de *E. coli* génotoxique mutée pour le gène *htpG* présente une virulence atténuée dans un modèle murin de sepsis.

La protéine chaperon Hsp90_{Ec} est donc un régulateur clé supplémentaire dans la synthèse de métabolites secondaires chez *E. coli*. La mise en évidence de ces différents niveaux de connexions dans la régulation de la production de facteurs de virulence est essentielle pour la compréhension de la pathogénicité de *E. coli*. De la prise en compte de ces connexions pourrait dépendre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

TITRE et RÉSUMÉ en anglais :

voir au recto de la dernière page de la thèse

DISCIPLINE administrative :

PHARMACIE – BIOLOGIE MÉDICALE

MOTS-CLÉS :

Escherichia coli – Virulence – Stress – Hsp90 – HtpG – Colibactine – Sidérophore

INTITULÉ et ADRESSE de LABORATOIRE :

Laboratoire de Bactériologie-Hygiène
Institut Fédératif de Biologie
CHU de Toulouse – Hôpital Purpan
330, av. de Gde-Bretagne, TSA40031
31059 Toulouse Cedex 9, France

Centre de Physiopathologie Toulouse-Purpan
Inserm UMR1043 – CNRS UMR5282
INRA USC1360 – Université Toulouse III
CHU de Toulouse – Hôpital Purpan – BP3028
31024 Toulouse Cedex 3, France

DIRECTEUR de thèse :

Monsieur le Professeur Eric OSWALD
