

Analyse du protéome de *Pseudomonas fluorescens* par la technique d'électrophorèse bidimensionnelle

Résumé

La bactérie *Pseudomonas fluorescens* possède des protéomes différents selon la température utilisée lors de sa culture. Des protéines différentes sont donc exprimées dans deux conditions, via un stress thermique. Une comparaison de leurs protéomes après extraction, permettrait de savoir quelles sont les protéines les plus régulées dans le protéome. La méthode d'analyse protéomique est classique : extraction de la majorité des protéines de la bactérie, en fonction du stress thermique imposé, une isoélectrofocalisation, une séparation des protéines par SDS-PAGE, une analyse en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, et enfin une recherche bio-informatique par la banque de données MASCOT.

INTRODUCTION

Pseudomonas fluorescens est une bactérie à Gram négatif en forme de bâtonnet. Elle est mobile et peut produire un pigment vert fluorescent, la Pyoverdine. Sa température de croissance optimale se situe entre 25 et 30 degrés Celsius bien qu'elle puisse se développer à 37°C, ce qui la rend potentiellement pathogène pour l'Homme [2]. Elle peut se retrouver dans le sol, l'eau ou encore à la surface des plantes. C'est une bactérie aérobie, qui possède la capacité de former des biofilms (communauté multicellulaire adhérant entre eux et à une surface, et marquée par la sécrétion d'une matrice exo polymérique adhésive et protectrice) leur permettant de coloniser des points d'eau, ou l'alimentation [3].

Le but de ce TP est d'étudier les protéomes de la bactérie *Pseudomonas fluorescens* dans des conditions différentes, une condition témoin et une condition en stress thermique. La culture de la condition témoin se fera dans un milieu LB à 28°C tandis que la deuxième culture se fera à 37°C mettant les bactéries en conditions de stress thermique. L'étude des protéines produites par l'organisme dans des conditions données permet de fournir des informations sur les mécanismes mis en place par celui-ci pour s'adapter à son environnement. Ainsi, les protéines produites différemment par *Pseudomonas fluorescens* dans les deux conditions de culture seront extraites, purifiées puis séparées et analysées sur gel par la technique d'électrophorèse

bidimensionnelle. Elle permet de séparer une large gamme de protéines en fonction de leur point isoélectrique puis en fonction de leur taille. Après l'analyse d'images, les protéines pourront être digérées par la trypsine puis analysées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight). Les données protéiques pourront ensuite être analysées bio informatiquement et être comparées à la base de données MASCOT.

MATÉRIELS ET MÉTHODES^[1]

Culture bactérienne

Deux cultures overnight sont réalisées à partir des bactéries *Pseudomonas fluorescens* Pf5 dans un milieu de culture LB, puis placées dans deux conditions respectives : 28°C et 37°C. L'absorbance des deux conditions est relevée à une longueur d'onde de 600 nanomètres grâce à un spectrophotomètre Fisher Bioblock spectrometer 1200P. Cette densité optique (DO) à 600 nm permet de calculer la concentration bactérienne puisqu'une unité de DO à 600nm équivaut à une concentration à $1,5 \cdot 10^6$ bactéries dans la cuve de spectrométrie.

Obtention d'un extrait protéique

Préparation des échantillons

Les culots bactériens ont été isolés du milieu de culture par une première centrifugation (7', 4°C, 8000 rpm) (*Thermo electron corporation Jouan MR1812*) et resuspendus dans 5 ml de tampon de lavage (Tris base (50mM, annexe 1)). Les échantillons sont conservés dans la glace entre chaque manipulation. Le mélange est encore centrifugé pendant 7 minutes à 8000 rpm. Les deux tubes sont ensuite rassemblés dans un 1 mL de tampon de lavage et avec 1 mL d'inhibiteur de protéase. Le lavage a permis d'éliminer les interférants du milieu.

Extraction protéique - Lyse cellulaire

Les bactéries sont ensuite lysées par une alternance de cycles de froids (30 secondes dans un carboglace) et de cycles chaud (5 minutes à 37°C) effectuées 3 fois. L'échantillon est ensuite broyé avec des billes. Il a fallu 770 mg de billes pour le tube. L'échantillon a été vortexé pendant 1 minute puis placé dans la glace pendant 1 minute. Cette opération est reproduite 5 fois. L'échantillon a ensuite été centrifugé pendant 5 minutes à 10 000 rpm pour récupérer le surnageant.

Dosage protéique de Bradford

Le dosage protéique permet de connaître la quantité de protéine dans notre extrait brut afin d'égaler la quantité lors des prochaines manipulations. Une gamme d'étalonnage de sérum bovin d'albumine (BSA) entre 0 et 1 mg/mL est réalisée comme indiqué dans l'annexe 2. Chaque point de la gamme ainsi que les extraits bruts sont dosés à raison de 33 µL additionné de 1 mL de réactif de Bradford (*SIGMA-ALDRICH®*, n°B6916). La quantité est déterminée par l'absorbance à 595 nm après 5 minutes d'incubation à température ambiante.

Précipitation protéique

Les protéines sont ensuite concentrées dans 4 volumes d'acétone pour 1 volume d'échantillon puis placées à -20°C.

La suspension protéique a ensuite été centrifugée pendant 20 minutes à 4°C à 13 000 rpm puis re-suspendue dans 300 µL de tampon de réhydratation (urée 7 M, thio-urée 2M, CHAPS 4% (w/v), DTT 50 mM, ampholytes 0,1%, pH8).

Caractérisation des protéines

Isoélectrofocalisation

Les strips (ReadyStrip™ IPG Strips, 7cm, gradient pH 4-7, Coomassie strain) permettent une isoélectrofocalisation des protéines de l'extrait brut. Elles sont tout d'abord placées dans un premier bain de tampon d'équilibration (voir annexe 4) supplémenté avec 2% de DTT pendant 5 minutes sous agitation. Celui-ci permet de conditionner la strip comme un échantillon de SDS-PAGE en réduisant les ponts-disulfures. Elles sont ensuite placées dans un second bain de tampon d'équilibration additionné de 2.5% d'iodoacétamide, un agent alkylant permettant de prévenir la reformation des ponts disulfures. Les strips équilibrées sont ensuite rincées avec du tampon d'électrophorèse.

Electrophorèse SDS-PAGE

Un gel d'acrylamide 12% (annexe 5) est coulé sur le support. Une fine couche de 500µL d'isopropanol est ajoutée au-dessus afin de lisser le gel.

La strip conditionnée pour une électrophorèse SDS-PAGE est glissée au-dessus du gel très précautionneusement. Enfin une fine couche d'agar est coulée au-dessus de la strip afin de la maintenir contre le gel permettant la séparation des protéines. Cet assemblage de gel est ensuite plongé dans le tampon d'électrophorèse et soumis à un ampérage de 25mA par gel.

Révélation et analyse

Après migration, les gels sont révélés par un bain de tampon de coloration au Bleu de Coomassie. Les spots protéiques contenant au minimum 100 ng de protéines seront alors colorés en bleu, proportionnellement à leur concentration. Les spots exprimés différemment dans les conditions de culture à 37°C et 28°C seront ensuite repérés et isolés par digestion

trypsique et analysés en MALDI-TOF MS pour obtenir la masse des différents fragments et les comparer à la base de données du logiciel MASCOT.

RÉSULTATS

Culture bactérienne

La culture bactérienne est estimée par l'absorbance à 600nm. En effet, une unité de DO à 600nm équivaut à une concentration à $1,5 \cdot 10^6$ bactéries/mL. Les cultures overnight sont diluées au 10ème afin de lire l'absorbance. La culture bactérienne à 37°C a une absorbance de 0,330 soit une absorbance réelle de 3,300. La culture à 28°C a une absorbance à 0,274 soit une absorbance réelle de 2,74. La concentration bactérienne est de $4,950 \cdot 10^6$ bactéries/mL pour la condition de culture à 37°C et la concentration est de $4,110 \cdot 10^6$ bactéries/mL pour la culture à 28°C.

Dosage protéique de Bradford

Une fois l'extraction protéique réalisée, la quantité de protéines présentes dans le tube est trouvée à l'aide de la méthode de Bradford. Pour cela, il nous a fallu faire une gamme étalon de BSA standard. Les mesures obtenues (annexe 3) ont permis de tracer le graphique présenté en figure 1 :

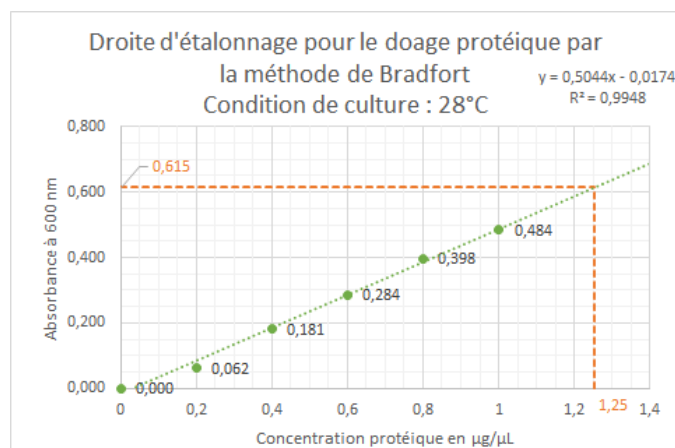
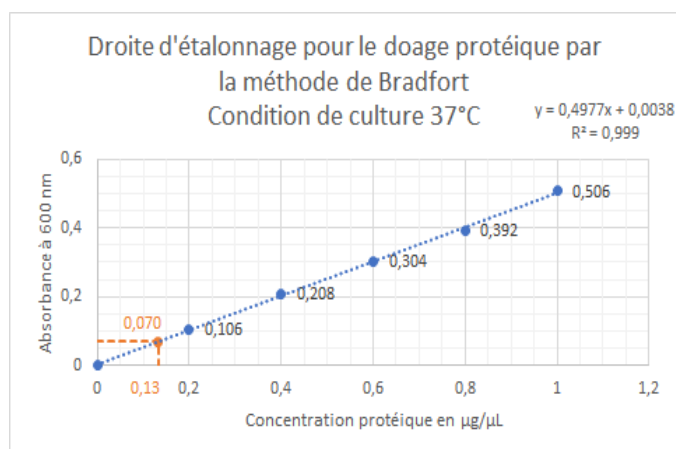
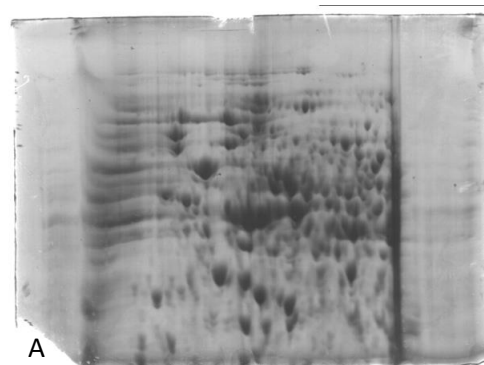


Figure 1 : Gamme étalon de la DO₅₉₅ en fonction de la concentration protéique de la gamme standard de BSA. Sur laquelle les valeurs de DO₅₉₅ des lysats A1 (graphique 1) et A2 (graphique 2) ont été reportés.

En reportant les valeurs de DO à 600 nm mesurées pour le lysat A1 à 37°C sur la gamme étalon de BSA standard, la concentration protéique obtenue est de 0.133 µg/µL. Pour le lysat A2 à 28°C, la concentration protéique est de 1,25µg/µL. L'échantillon A1 faisant 600 µL, la concentration de protéine dans notre tube est donc de 79.8 µg/600µL. L'échantillon A2 faisant 1 mL, il y a donc 125,37µg/1000µL de concentration en protéines.

Electrophorèse 2D

Le but de cette étude a été de caractériser les différences entre les protéomes des bactéries *Pseudomonas fluorescens* selon deux températures de culture. Les protéines produites et extraites ont donc subi une IEF (Isoélectrofocalisation) puis une électrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Après migration, les protéines ainsi séparées ont été révélées grâce à la coloration des gels au Bleu de Coomassie comme le présente la figure 2 ci-dessous.



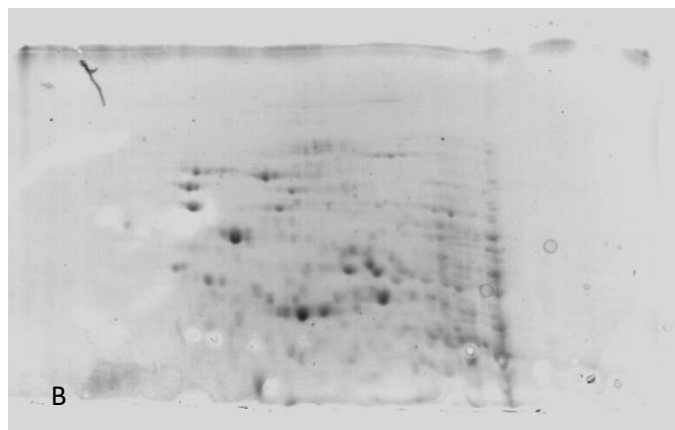


Figure 2 : Gels d'électrophorèse bidimensionnelle pH 4-7, acrylamide 12%. **A**, la condition A2 de 28°C et **B**, la condition A1 de 37°C.

Nous pouvons constater que les protéines sont plus concentrées dans la condition A2 à 28°C (A) et beaucoup plus faible dans la condition A1 à 37 °C (B). Cela semble normal puisque *Pseudomonas fluorescens* se développe plus facilement à 28°C. Les mêmes protéines sont globalement présentes dans les deux conditions cependant la concentration est nettement plus grande dans la condition A2 à 28°C. Les gels étant de qualités assez faible, il est difficile d'identifier les protéines présentes ou non dans les deux conditions.

Après analyse différentielle des gels, comparant les profils protéiques des bactéries en condition A1 (37°C) et en condition A2 (28°C), les spots où les profils d'expression diffèrent ont été sélectionnés, digérés, isolés et analysés. Les masses des peptides de chaque spot, déduites des spectres, et leurs séquences correspondantes sont exposées dans le tableau 1. Ces données ont ensuite été comparées avec celles de la base de données Mascot, ce qui a permis l'identification de chacune des protéines.

SPOT	Masse des fragments	Condition	Protéine correspondante identifiée
1	2797.2358 1933.8675 1614.7394 1413.7696 1324.6718 1312.7470	Présence à 28°C (A2)	Type VI secretion system tube protein Hcp [Pseudomonas]
2	2945.5036 2575.3204 2487.1932 2096.1386 1923.9480 1616.8543 1502.8213 1246.6711 987.4795 779.5389 524.2827	Présence à 28°C (A2)	Type VI secretion system tip protein VgrG [Pseudomonas sp. RIT288]
3	4121.9745 3228.6277 2052.0091 1785.9089 1307.6590 1161.5317 975.5357 695.3358 675.4035 604.3664 532.3089	Présence à 28°C (A2)	Flagellin [Pseudomonas fluorescens]
4	3460.6518 2330.0380 2169.1549 1882.9392 1605.7503 1570.8151 1128.6259 952.4404 890.4651 723.3573 694.3002 548.3555	Présence à 28°C (A2)	Type VI secretion system contractile sheath large subunit [Pseudomonas sp. GM80]
5	3763.9653 3585.6842 2088.0046 1373.6404 1119.5541	Présence à 28°C (A2)	Pectate lyase

	827.4297 731.3794 500.2463		
--	----------------------------------	--	--

SPOT	Masse des fragments	Condition	Protéine correspondante identifiée
6	2362.1078 1496.9158 1244.6481 1064.5371 994.5428 760.3948 557.2864	Présence à 37°C (A1)	Sigma factor AlgU negative regulatory protein [Pseudomonas]
7	3594.6528 3147.6432 2291.1455 1586.8226 1363.7328 1284.7133 1003.4843 972.4897 619.3562	Surexpression à 28°C (A2)	Phosphocholine-specific [Pseudomonas protegens Cab57]

Tableau 1 : Masses peptidiques des spots, obtenues en MALDI-TOF MS, et correspondances Mascot : séquences peptidiques et protéine identifiée [6].

Dans la condition A2 des protéines impliquées dans la sécrétion sont présentes. C’est le cas des protéines du système de sécrétion de type VI, avec notamment la présence d’HCP et de VgrG. De plus à 28°C, ces bactéries sont pourvues de flagelles comme le montre la présence de flagelline, un constituant des flagelles. Il y a production de pectate lyase impliquées dans la lyse des membranes cellulaires cibles [4]. Enfin dans cette même condition, il a été montré une surexpression de phospholipase C, impliquée dans de nombreuses voies métaboliques [5]. Dans la deuxième condition à 37°C, il y a expression d’un facteur de régulation du gène AlgU impliquée dans la synthèse de l’alginate, un polysaccharide composant la matrice des biofilms [7].

Discussion

Pseudomonas fluorescens Pf5 est une bactérie saprophyte se développant préférentiellement dans des températures situées entre 20 et 30°C. En effet il a été observé lors de cette étude par électrophorèse bidimensionnelle que dans cet intervalle de température, à 28°C, les bactéries développaient des systèmes de virulence comme le système de sécrétion de type VI leur permettant d’exporter des protéines ou de l’ADN au sein des cellules cibles. De même elles semblent développer des facteurs d’invasion puisqu’elles présentent de la flagelline, un composant les flagelles assurant la mobilité ainsi que la propagation des bactéries. De plus, elles produisent des pectates lyase et des phospholipases C, des enzymes permettant de lyser les membranes cellulaires. Cependant à des températures plus élevées, ici 37°C, les bactéries en condition de stress ne produisent plus les facteurs de virulences précédemment énoncés mais surexpriment un facteur sigma AlgU leur permettant de réguler la production de l’alginate et donc la production de matrice de biofilm.

Afin d’aller plus loin dans la caractérisation des protéomes, les expériences devraient être reproduites dans les mêmes conditions, à des temps ou des températures de culture graduels. Ainsi, les réponses observées pourraient confirmer et/ou compléter les mécanismes mis en place par les bactéries.

Conclusion

La caractérisation des mécanismes mis en place par *Pseudomonas fluorescens* Pf5 dans différentes conditions de culture, pouvant être retrouvées dans son environnement, est importante pour établir des systèmes de lutte contre cette souche bactérienne. Ainsi, sa capacité à établir des biofilms ayant été identifiée, un système de lutte basé sur des inhibiteurs du quorum sensing pourrait être envisagé.

Références

- [1] Proteomic Analysis of the *Enterococcus faecalis* V583 Strain and Clinical Isolate V309 under Vancomycin Treatment. Xuesong Wang and al. Journal of proteome research. October 9,2009. Disponible en ligne : <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr901216e>
- [2] *Pseudomonas fluorescens*, Wikipédia. Visualisé le 28/03/2019. Disponible en ligne : https://fr.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_fluorescens
- [3] *Pseudomonas fluorescens*, BiologyWise. Visualisé le 28/03/2019. Disponible en ligne : <https://biologywise.com/pseudomonas-fluorescens>
- [4] Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. Environ Microbiol Rep. 2014 Oct; 6(5): 427–440. Disponible en ligne : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25646533>
- [5] Titball,RW. “Bacterial Phospholipases C.” Microbiological Reviews 57.2 (1993): 347–366. Print. Disponible en ligne : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372913/pdf/microrev00025-0063.pdf>
- [6] MASCOT, Matrix Science. Visualisé le 28/03/2019. Disponible en ligne : http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF
- [7] The algT (algU) Gene of *Pseudomonas Aeruginosa*, a Key Regulator Involved in Alginate Biosynthesis, Encodes an Alternative Sigma Factor (sigma E). Hersherberger, CD et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92.17 (1995): 7941–7945. Disponible en ligne : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC41262/>

ANNEXE 1: Tampon tris de lavage 1X

Préparation d'un tampon tris à 50mM à partir d'un tampon à 0.5M. Il faut diluer au 1/10ème.

ANNEXE 2 : Gamme d'étalonnage pour le dosage protéique de Bradford.

$[BSA]_f$ (µg/µL)	V_{BSA_i}	$[BSA]_i$	$V_{solvant}$
1 µg/µL	100	1 µg/µL	0 µL
0,8 µg/µL	80 µL	1 µg/µL	20 µL
0,6 µg/µL	60 µL	1 µg/µL	40 µL (ou qsp 100µL)
0,4 µg/µL	40 µL	1 µg/µL	60 µL (100 qsp)
0,2 µg/µL	20 µL	1 µg/µL	80 µL (100 qsp)

ANNEXE 3 : Absorbance de la gamme étalon et de l'échantillon

Echantillons (mg/ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1	A1
Absorbance à 600nm	0	0.106	0.208	0.304	0.392	0.506	0.07

Annexe 4 : Composition du tampon d'équilibration:

6 M Urée (7.2 g)
0,225 M Tris (0.225 M, pH 8,8) (3.33mL)
4% SDS (0.8g)
20 % Glycérol (4 mL)
qq graines de Bleu de Bromophénol
20 ml qsp H₂O

Annexe 5 : Composition du gel d'acrylamide SDS PAGE 12%

12% Acrylamide/ bis (40%) (3mL)
2,5 ml Tris (1,5 M, pH 8,8)
1% SDS (10%) (100µL) 50 µL APS (10%)
5 µL TEMED
10 mL qsp H₂O