



HAL
open science

Évaluation du rôle de la phosphatase acide AcpA dans la virulence de *Francisella tularensis*

Emmanuelle Le Pihive

► To cite this version:

Emmanuelle Le Pihive. Évaluation du rôle de la phosphatase acide AcpA dans la virulence de *Francisella tularensis*. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00366909

HAL Id: tel-00366909

<https://theses.hal.science/tel-00366909>

Submitted on 9 Mar 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I
SCIENCES & GEOGRAPHIE
ÉCOLE DOCTORALE CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
GRENOBLE I

Discipline : Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement
par

Emmanuelle LE PIHIVE

le 12 février 2009

ÉVALUATION DU ROLE
DE LA PHOSPHATASE ACIDE ACPA
DANS LA VIRULENCE
DE *FRANCISELLA TULARENSIS*

JURY :

Pr. Max MAURIN

Pr. Antoine ANDREMONT

Dr. Josée VAISSAIRE

Dr. Jean-Marie PAGÈS

PCS Dominique VIDAL

MC Éric VALADE

Président

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

RESUME

Francisella tularensis est l'agent étiologique de la tularémie, zoonose transmissible à l'Homme par des animaux infectés. Cette bactérie hautement pathogène est classée parmi les agents du risque biologique provoqué en raison de sa transmission par voie respiratoire, de sa faible dose infectieuse, d'un fort taux de létalité et de l'absence de vaccin homologué. Actuellement, peu de données sont connues sur la physiopathologie de la tularémie et sur les mécanismes de virulence de *F. tularensis*. La plupart des études à ce sujet ont été menées chez *F. novicida*, peu pathogène pour l'Homme. Par ailleurs, l'étude de *F. tularensis* a été ralentie par le manque d'outils moléculaires spécifiques. Dans ce travail, nous avons caractérisé chez *F. philomiragia* deux nouveaux plasmides naturels et développé à partir de ceux-ci des vecteurs navettes, utilisables pour la complémentation de mutants et pour le suivi de l'infection *in vitro* et *in vivo*. D'autre part, nous avons développé une méthode de mutagenèse dirigée de *F. tularensis*, qui nous a permis d'obtenir un mutant déficient en phosphatase acide A. L'AcpA, enzyme inhibitrice du stress oxydant des cellules phagocytaires, a été reconnue comme un des facteurs de virulence de *F. novicida* et, par extrapolation, de *F. tularensis*. Pour tester cette hypothèse, nous avons développé un modèle d'infection par voie respiratoire chez la souris. Nous avons ainsi confirmé la faible DL50 de *F. tularensis* et montré que l'AcpA n'est pas impliquée dans sa virulence. L'extrapolation des conclusions de *F. novicida* à *F. tularensis* n'est donc pas justifiée, il s'avère indispensable de disposer de modèles d'études basés sur *F. tularensis*.

Mots clés : Tularémie, *Francisella tularensis*, phosphatase acide, vecteurs navettes.

Laboratoire de rattachement : Laboratoire de Bactériologie, Département de Biologie des Agents Transmissibles, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées « Émile Pardé », 24 Avenue des maquis du Grésivaudan, 38702 La Tronche cedex.

ABSTRACT**Role of the acid phosphatase AcpA in *Francisella tularensis* virulence**

Francisella tularensis is the causative agent of tularemia, zoonotic disease transmitted to humans by contact with infected animals. This highly pathogenic bacterium is listed among potential biowarfare agents because of its transmission by the respiratory route, its low infectious dose, a high rate of lethality and the lack of licensed vaccine. Today, few data are available about the pathophysiology of tularemia and about the virulence mechanisms of *F. tularensis*. Most of the studies have been conducted with *F. novicida*, a weak pathogen in humans. Moreover, *F. tularensis* study has been hampered by the lack of specific genetic tools. In this work, we characterised in *F. philomiragia* two new cryptic plasmids and we developed from them several shuttle vectors useful for mutant complementation and for *in vitro* and *in vivo* infection studies. Then, we developed a directed mutagenesis method of *F. tularensis*, allowing us to obtain an acid phosphatase A-defective mutant. The respiratory burst-inhibiting AcpA was recognized as a virulence factor in *F. novicida*, data further extended to *F. tularensis*. To check this hypothesis, we developed a mouse model of infection by the respiratory route. We thus confirmed the low *F. tularensis* LD50 and we showed that AcpA is not involved in *F. tularensis* virulence. Extension of conclusions obtained in *F. novicida* to *F. tularensis* is not valuable, *F. tularensis*-based models appears mandatory.

Key words : Tularemia, *Francisella tularensis*, acid phosphatase, shuttle vectors.

Laboratory : Laboratoire de Bactériologie, Département de Biologie des Agents Transmissibles du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées Emile Pardé, 24 Avenue des maquis du Grésivaudan, 38700 La Tronche.

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également :

Le Médecin Général Inspecteur Gérard MARTET et le Médecin Chef des Services Éric MULTON de m'avoir accueillie au sein du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées.

Le Pharmacien Chef des Services Dominique VIDAL de m'avoir accueillie au sein du Département de Biologie des Agents Transmissibles et d'avoir accepté d'être mon Directeur de thèse.

Le Médecin en Chef Éric VALADE de m'avoir encadrée au cours de ces trois années avec autant de disponibilité et d'entraîn. J'ai beaucoup appris et j'espère que ce travail apportera autant que ce qu'il m'a apporté.

Le Pharmacien en Chef François THIBAUT d'avoir toujours accueilli mes interrogations avec le sourire en me donnant la « fausse » impression de ne jamais le déranger.

Je vous remercie tous les deux d'avoir corrigé ce manuscrit. Je vous remercie également de votre soutien, de vos conseils avisés lors de la préparation de mes oraux et posters, ainsi que de votre rassurante bienveillance avant ces événements.

Didier BLAHA pour tout ce qu'il a apporté pendant la seconde année de thèse. Merci pour tes conseils et tes encouragements. Cela a vraiment été un plaisir de travailler avec toi, en plus des bons moments que nous avons passé à échaffauder des plans « blagues » destinés à certains membres de l'équipe...

Sylvie CHENAVAS pour son aide et ses conseils au cours de cette dernière année.

Je ne saurais continuer ces remerciements sans faire quelques clins d'œil aux « Personnalités » de l'équipe de bactériologie avec qui j'ai passé plus de trois ans.

Samuel, mon premier collègue de bureau. Notre relation « moqueuse » m'a fait penser à celle que j'ai avec mon frère. Merci pour ta gentillesse et pour ta disponibilité ! Tes conseils d'expert en biologie moléculaire ont été précieux et plein d'enseignements. Et... désolée pour toutes les fois, où je t'ai dérangé pour te demander de m'apporter du matériel au biomodule...

Michèle, ma collègue du bureau d'en face ! Une technicienne redoutable d'efficacité, mais... toujours en râlant ! Au début ça surprend, mais une fois qu'on a mis les pipettes et les cônes par ordre de taille, c'est parti ! ;o) Merci Michèle pour vos bons gâteaux au chocolat et pour les spécialités des Pyrénées (vous savez de quoi je parle...).

Didier RIOU, mon deuxième collègue du bureau d'en face. Merci Didier de ta disponibilité et pour toute les fois où tu m'as aidé ou conseillé, que ce soit pour le travail ou pour... mes petits problèmes de mécanique automobile... Merci à toi et à Danielle de votre gentillesse et pour les repas conviviaux et... copieux à l'Albenc !

Arnaud, merci pour toutes les fois où tu m'as aidé. J'espère que c'est une belle amitié qui a commencé à Grenoble !

Je ne peux oublier la personne qui m'a sûrement fait le plus rire : celui dont le rire généreux et matinal fait écho jusqu'au fond du couloir... Le « Papa de la bactériologie » ou la « Paucodpédia ». Alors merci Jean-Charles de ta bonne humeur communicative, de ta disponibilité et pour toutes les conversations intéressantes que nous avons échangé autour d'un café, je crois qu'on a dû refaire le monde un bon nombre de fois.

Merci au reste de l'équipe du DBAT : Isa pour son aide, Dominique, Paulette, Marie-Ange pour leur disponibilité et leur aide précieuse, Corinne et Annick de m'avoir aidé au cours de mes tâches administratives et toutes les personnes que j'ai sollicitées : Françoise, Yves, Aurélie, Jean-Nicolas, Frédéric, Anne-Laure...

Enfin merci aux stagiaires pour leur aide : Jennifer, Lionel, Marie et Seb.

Tout ceci n'aurait évidemment pas été possible sans mes parents. Merci de votre soutien, tout au long de mon parcours et particulièrement au cours de ces trois dernières années. Merci pour toutes les valeurs que vous nous avez transmises et surtout celle de ne

jamaïs baisser les bras devant les difficultés. Merci à mes frères et sœur, pour leur soutien et leur discrétion. Un remerciement spécial à ma grande sœur, qui a accepté de corriger une partie de ce manuscrit avec son œil expert de professeur de français...

Enfin, merci Alexandre de m'avoir supportée et soutenue pendant ces quelques mois stressants...

A mes parents,
A Francisella pour qui l'exigence aura été un art,

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	12
TABLE DES ILLUSTRATIONS	14
INTRODUCTION	18
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	20
CHAPITRE I – LE RISQUE BIOLOGIQUE PROVOQUE	20
I – Contexte historique et politique	20
II – Classification des agents du risque biologique provoqué	22
III – <i>Francisella tularensis</i> : un agent du risque biologique provoqué	24
CHAPITRE II – LA TULAREMIE ET SON AGENT ETIOLOGIQUE : <i>FRANCISELLA TULARENSIS</i>	26
PARTIE I – LE GENRE <i>FRANCISELLA</i>	27
I – Taxonomie	27
II – Caractères phénotypiques	30
III – Caractères génotypiques	34
PARTIE II – LA TULAREMIE	37
I – Épidémiologie	37
I - 1. La tularémie à travers le monde	37
I - 2. Surveillance de la tularémie humaine en France.....	39
II – La tularémie en clinique humaine	41
II – 1. Manifestations cliniques.....	41
II – 2. Diagnostic de laboratoire	42
II – 2. 1. Diagnostic sérologique	42

II – 2. 2. Diagnostic bactériologique.....	42
II – 2. 3. Diagnostic moléculaire.....	43
II – 3. Traitements.....	45
II – 3. 1. Traitements prophylactique et curatif	45
II – 3. 2. Traitement préventif : la vaccination	46

CHAPITRE III – LES MECANISMES DE VIRULENCE DE *FRANCISELLA TULARENSIS*

I – Réponse des cellules phagocytaires aux infections bactériennes.....	49
I – 1. Généralités.....	49
I – 2. La NADPH oxydase et production de dérivés oxygénés	51
II – Le devenir de <i>Francisella tularensis</i> dans le macrophage	53
III – Rôle des polynucléaires neutrophiles.....	57
IV – Les facteurs de virulence de <i>Francisella tularensis</i>	58
IV – 1. La capsule.....	58
IV – 2. Le lipopolysaccharide	59
IV – 3. L’îlot de pathogénicité de <i>Francisella tularensis</i>	59
IV – 4. Les systèmes de sécrétion	61
IV – 5. Les régulateurs transcriptionnels des facteurs de virulence	63
IV – 6. Les autres gènes impliqués dans la virulence de <i>Francisella tularensis</i>	64
IV – 7. Les phosphatases acides	65
IV – 7. 1. Les caractéristiques biochimiques et structurales de la phosphatase acide AcpA de <i>Francisella</i>	67
IV – 7. 2. Rôle des phosphatases acides dans la virulence de <i>Francisella novicida</i>	71
IV – 7. 2. 1. Rôle de l’AcpA	71
IV – 7. 2. 2. Rôle des quatre phosphatases acides	73
IV – 7. 3. Différences d’expression de l’AcpA chez les espèces de <i>Francisella</i> ...	74

CHAPITRE IV – LES OUTILS POUR LA MANIPULATION GENETIQUE DE <i>FRANCISELLA</i>	78
I – Les techniques de transformation appliquées à <i>Francisella</i>	80
II – Mutagenèse	81
II – 1. Mutagenèse dirigée par échange d'allèles.....	81
II – 2. Mutagenèse aléatoire par l'utilisation de transposons.....	85
III – Les plasmides naturels de <i>Francisella</i> et développement de vecteurs navettes	89
III – 1. L'analyse de séquence du pFNL10	89
III – 2. Les vecteurs navettes réplicatifs chez <i>Francisella</i>	91

OBJECTIFS **96**

TRAVAIL EXPERIMENTAL **98**

CHAPITRE I – ÉTUDE DU ROLE DE LA PHOSPHATASE ACIDE A DANS LA VIRULENCE DE <i>FRANCISELLA TULARENSIS</i> SUBSP. <i>TULARENSIS</i>	98
I – Introduction	98
II – Matériels et méthodes	100
II – 1. Souches, plasmides, amorces et conditions de culture.....	100
II – 2. Dosage enzymatique de l'activité phosphatase acide.....	102
II – 3. Manipulation de l'ADN	103
II – 4. Transformation des bactéries.....	103
II – 5. Construction du vecteur suicide pXL- Δ acpA::Cm et du vecteur pKK214 acpA	104
II – 6. Modèle d'infection expérimentale chez la souris.....	108
II – 7. Analyse des séquences nucléotidiques et protéiques	109

III – Résultats	109
III – 1. Caractérisation <i>in vitro</i> de l'activité phosphatase acide à partir de trois souches du genre <i>Francisella</i>	109
III – 2. Identification d'une mutation dans le gène <i>acpA</i> chez <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>	112
III – 3. Mesure des doses létales 50 de <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> 061/00 et <i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> 278/06.....	116
III – 3. 1. Comparaison de deux méthodes pour le dénombrement de <i>Francisella tularensis</i>	116
III – 3. 2. Développement d'un modèle d'infection expérimentale chez la souris	118
III – 4. Construction et complémentation d'un mutant de <i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> déficient en AcpA.....	119
III – 5. Rôle de l'AcpA dans la virulence de <i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> 278/06 chez la souris	124

CHAPITRE II – IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DE DEUX PLASMIDES NATURELS DE *FRANCISELLA* - CONSTRUCTION DE VECTEURS NAVETTES

I – Introduction	125
II – Matériels et méthodes	127
II – 1. Souches, plasmides, amorces et conditions de culture.....	127
II – 2. Manipulation de l'ADN	128
II – 3. Transformation des bactéries.....	128
II – 4. Construction de la première génération de vecteurs navettes répliatifs chez <i>E. coli</i> et chez <i>Francisella</i> dérivés du pF242 et du pF243	128
II – 5. Construction de la seconde génération de vecteurs navettes dérivés du pF242 et du pF243 contenant le gène codant pour la GFP et/ou un site de clonage multiple.....	132
II – 6. Séquençage et analyse des séquences d'ADN plasmidiques	134

III – Résultats	136
III – 1. Isolation de deux nouveaux plasmides de <i>Francisella philomiragia</i> et analyse de leurs séquences	136
III – 2. Première génération de vecteurs navettes dérivés du pF242 et du pF243..	142
III – 3. Optimisation du milieu de culture pour l'isolement de <i>Francisella</i>	143
III – 4. Efficacité de transformation de la première génération de vecteurs navettes	143
III – 5. Expression de la GFP chez <i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> 278/06.....	146
III – 6. Coexistence de vecteurs dérivés du pF242 et du pF243 dans <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> 061/00	147

DISCUSSION **149**

CONCLUSION **162**

REFERENCES **164**

ANNEXES **185**

ABBREVIATIONS

µg	Microgramme	FDA	Food and Drug Administration
A	Adénosine	FevR	<i>Francisella</i> Effector of Virulence Regulation
Aa	acides aminés	fMLP	<i>N</i> -formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine
ACP	Phosphatase acide	FPI	<i>Francisella</i> Pathogenicity Island
AcpA	Phosphatase acide A	G	Guanosine
ADN	Acide désoxyribonucléique	g	Gramme
AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé	GC	Gélose chocolat
AlkP	Phosphatase alcaline	GFP	Green Fluorescent Protein
Amp	Ampicilline	h	Heures
ARN	Acide ribonucléique	H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
ATCC	American Type Culture Collection	HCl	Acide chlorhydrique
ATP	Adénosine triphosphate	HMP	Hexose-monophosphate
BD	Becton Dickinson	HPA	Health Protection Agency
BET	Bromure d'éthidium	HTH	Helix-turn-helix
BHI	Brain Heart Infusion	Hyg	Hygromycine
BPL	Lipopeptide bactérien	I	Insertion
C	Cytidine	IBBNT	International Bulletin of Bacterial Nomenclature and Taxonomy
CDC	Centers for Diseases Control and Prevention	Ig	Immunoglobuline
Ceph	Céphalosporine	igl	Intracellular Growth Locus
CHA	Cystein Heart Agar	IJSB	International Journal of Systematic Bacteriology
Chim.	Transformation chimique	IJSEM	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
CIP	Collection de l'Institut Pasteur	IL	Interleukine
Cl	Ion chlorure	InVS	Institut de Veille Sanitaire
ClO⁻	Ion hypochlorite	IP₃	Phosphatidylinositol 1,4,5-triphosphate
Cm	Chloramphénicol	IS	Insertion sequences
CNR	Centre National de Référence	KCl	Chlorure de potassium
Conjug	Conjugaison	Km	Kanamycine
CRSSA	Centre de Recherche du Service de Santé des Armées	LB	Luria Bertani
Cryo.	Cryotransformation	LIC	Leading-strand initiation and control
D	Délétion	LPS	Lipopolysaccharide
Da	Dalton	LVS	Live Vaccine Strain
DAG	Diacylglycérol	LZ	Leucine zipper
DBAT	Département de Biologie des Agents Transmissibles	M	Molaire
DL50	Dose létale 50%	MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
<i>dso</i>	double-strand origin	MglA	Macrophage Growth Locus
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique	MgSO₄	Sulfate de magnésium
Electro.	Electroporation	MLVA	Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	MM	Masse molaire
EMEA	Agence européenne du médicament	MPO	Myéloperoxydase

MUP	Méthylumelliferyl phosphate
NAD	Nicotinamide-adénine-dinucléotide
NADP	Nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate
NaOH	Hydroxyde de sodium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCTC	National Collection of Type Cultures
NF-κB	Nuclear factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	Monoxyde d'azote
NSB	Niveau de Sécurité Biologique
Nt	Nourseothricine
O₂	Oxygène
O₂^{·-}	Ion superoxyde
ONO₂⁻	Péroxynitrite
ORF	Open Reading Frame
OTAN	Organisation du Traité de l'Atlantique Nord
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
Pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>pdp</i>	Pathogenicity Determinant Protein
pI	pH isoélectrique
PIP₂	Phosphatidylinositol 4,5-diphosphate
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol myristate acétate
PRRs	Pattern Recognition Receptors
ROS	Reactive Oxygen Species
SDN	Société Des Nations
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SGDN	Secrétariat Général de la Défense Nationale
SOD	Superoxyde dismutase
SSA	Service de Santé des Armées
subsp.	Subspecies (sous-espèce)
T	Thymidine
Tc	Tétracycline
TE	Tris EDTA
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TSS	Transformation storage solution
UFC	Unité-formant-colonie
VNTR	Variable Number Tandem Repeat

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

- Figure 1.** Aspect des colonies de *Francisella philomiragia*, de *Francisella novicida* et de *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* à partir d'un isolement sur gélose chocolat enrichie (AES) – **p. 33.**
- Figure 2.** Distribution mondiale des cas d'infections causées par les sous-espèces *tularensis*, *holarctica* et *mediasiatica* et par *F. novicida* – **p. 38.**
- Figure 3.** Répartition géographique des cas sporadiques de tularémie humaine en métropole française par département de domicile – **p. 40.**
- Figure 4.** Principaux mécanismes induits lors de l'activation du macrophage par un pathogène – **p. 50.**
- Figure 5.** Réactions enzymatiques impliquées dans la production de dérivés oxygénés au cours du stress oxydant dans les cellules phagocytaires – **p. 51.**
- Figure 6.** Mécanisme d'activation de la NADPH oxydase par le *N*-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP) – **p. 53.**
- Figure 7.** Phagocytose de *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* LVS – **p. 54.**
- Figure 8.** Phagocytose de *Listeria monocytogenes* dans les macrophages J774 – **p. 54.**
- Figure 9.** Phagocytose de *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, de *Shigella flexneri* et de *Legionella pneumophila* par des macrophages dérivés de monocytes humains – **p. 55.**
- Figure 10.** Infection de macrophage de souris J774A.1 par *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* LVS – **p. 56.**
- Figure 11.** *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 en microscopie électronique à transmission – **p. 58.**
- Figure 12.** Organisation de l'îlot de pathogénicité de *Francisella* (FPI) – **p. 60.**
- Figure 13.** Visualisation par microscopie électronique à transmission d'un pili de *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 – **p. 62.**
- Figure 14.** Hydrolyse d'un phosphomonoester catalysée par une phosphatase – **p. 65.**
- Figure 15.** Structure secondaire de l'AcpA de *Francisella novicida* – **p. 69.**
- Figure 16.** Hydrolyse de la phosphatidylcholine en choline et en acide phosphatidique catalysée par une phospholipase C – **p. 69.**
- Figure 17.** Relevé de mortalité des souris BALB/c après inoculation par voie intrapéritonéale de *F. novicida* sauvage, déficient en AcpA et déficient en AcpA et complémenté avec le pKK214(*groEL-acpA*) (d'après Mohapatra et coll. 2007) – **p. 72.**
- Figure 18.** Activités phosphatases mesurées à partir d'extraits cellulaires de *F. novicida* et de six mutants (d'après Mohapatra et coll. 2008) – **p. 73.**
- Figure 19.** Schéma de la mutagenèse par échange d'allèles à partir d'un gène muté par insertion d'une cassette de résistance à un antibiotique – **p. 83.**
- Figure 20.** Schéma de la mutagenèse par échange d'allèles à partir d'un gène muté par délétion – **p. 84.**
- Figure 21.** Plasmide suicide pPV – **p. 85.**

- Figure 22.** Carte du plasmide pFNL10 (3 990 pb) – **p. 90.**
- Figure 23.** Hydrolyse par l’AcpA du 6,8-difluoro-4-méthylumbelliferyl phosphate (DiMUP) en 6,8-difluoro-7-hydroxyl-4-méthyl coumarine et en phosphate – **p. 102.**
- Figure 24.** Construction du vecteur suicide pXL- Δ acpA::Cm – **p. 106.**
- Figure 25.** Construction du vecteur pKK214-acpA – **p. 107.**
- Figure 26.** Courbes de croissance et évolution de l’activité phosphatase acide dans les surnageants de culture et dans les extraits intracellulaires de *F. novicida* 244/05, de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 et de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 – **p. 110.**
- Figure 27.** Alignement de séquences du gène *acpA* de *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS et de *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 – **p. 113.**
- Figure 28.** Prédiction des séquences protéiques à partir des gènes *acpA* de *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 et de *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS – **p. 113.**
- Figure 29.** Alignement de séquences de la région 5’ du gène *acpA* de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 – **p. 114.**
- Figure 30.** Mesure de l’activité phosphatase acide à partir de surnageants de culture de 36 souches de la sous-espèce *holarctica* – **p. 115.**
- Figure 31.** Alignement de séquences de la région 5’ des gènes *acpA* de souches de *F. tularensis* – Comparaison entre les sous-espèces *tularensis* et *holarctica* – **p. 116.**
- Figure 32.** Vérification du mutant M10 Δ acpA::Cm par PCR – **p. 121.**
- Figure 33.** Courbes de croissance et suivi de l’activité phosphatase acide dans le surnageant de culture et dans les extraits intracellulaires de la souche sauvage *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06, du mutant M10 Δ acpA et du mutant complétement M10 Δ acpA(pKK214-acpA) – **p. 123.**
- Figure 34.** Comparaison des courbes de survie de souris Swiss infectées par *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 et par le mutant M10acpA – **p. 124.**
- Figure 35.** Construction de la première génération de vecteurs navettes dérivés du pF242 et du pF243 répliatifs chez *E. coli* et chez *Francisella* – **p. 131.**
- Figure 36.** Construction du pF242-gfp-Km et du pF242-gfp-MCS-Km – **p. 135.**
- Figure 37.** Migration par électrophorèse en gel d’agarose 0,8%-BET des plasmides isolés à partir de *F. philomiragia* ATCC 25016 (ligne 1) et *F. philomiragia* ATCC 25017 (ligne 2) – **p. 136.**
- Figure 38.** Cartes des plasmides isolés à partir de *F. philomiragia* ATCC 25016 et *F. philomiragia* ATCC 25017 – **p. 137.**
- Figure 39.** Efficacité d’électroporation et efficacité de cryotransformation avec les vecteurs de première génération introduit dans *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 – **p. 144.**
- Figure 40.** Isolement sur gélose chocolat de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 (A) et de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 (pF242-gfp-MCS-Km) (B) – **p. 147.**
- Figure 41.** Électrophorèse sur gel d’agarose 0,8%-BET des vecteurs pF242-Km (6 043 pb) et pF243-Cm (7 037 pb) après linéarisation par l’enzyme de restriction *SphI* – **p. 148.**

TABLEAUX

- Tableau 1.** Catégories des agents biologiques critiques pour la santé publique – p. 23.
- Tableau 2.** Position taxonomique des espèces du genre *Francisella* – p. 27.
- Tableau 3.** Caractères phénotypiques de différenciation entre les espèces et les sous-espèces appartenant au genre *Francisella* – p. 31.
- Tableau 4.** Caractères phénotypiques de différenciation entre les trois biotypes de *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* – p. 31.
- Tableau 5.** Milieux nutritifs décrits pour la culture du genre *Francisella* – p. 32.
- Tableau 6.** Génomes des espèces du genre *Francisella* séquencés ou en cours de séquençage – p. 34.
- Tableau 7.** Cas de tularémie humaine enregistrés en métropole française de 2002 à 2008 – p. 40.
- Tableau 8.** Les différentes formes cliniques de la tularémie – p. 41.
- Tableau 9.** Marqueurs chromosomiques permettant la détection moléculaire du genre *Francisella* par PCR – p. 44.
- Tableau 10.** Marqueurs chromosomiques permettant la discrimination des espèces du genre *Francisella* par PCR – p. 45.
- Tableau 11.** Antibiotiques et posologies utilisés pour le traitement prophylactique de la tularémie – p. 46.
- Tableau 12.** Caractéristiques des principaux sous-groupes de phosphatases acides (ACPs) – p. 66.
- Tableau 13.** Comparaison des activités phosphatase acide mesurées à partir de plusieurs souches de *Francisella* – p. 74.
- Tableau 14.** Récapitulatif des facteurs de virulence identifiés chez les souches du genre *Francisella* – p. 76-77.
- Tableau 15.** Mutants de *Francisella novicida* construits par échange d'allèles – p. 87.
- Tableau 16.** Mutants de *Francisella tularensis* (subsp. *holarctica* et *tularensis*) construits par échange d'allèles – p. 88.
- Tableau 17.** Régions codantes du pFNL10 – p. 90.
- Tableau 18.** Plasmides et vecteurs navettes répliatifs chez *Francisella* – p. 92.
- Tableau 19.** Souches bactériennes utilisées au cours de la première étude – p. 100.
- Tableau 20.** Plasmides et amorces utilisés au cours de la première étude – p. 101.
- Tableau 21.** Détermination de la concentration bactérienne de la suspension mère de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 – p. 117.
- Tableau 22.** Comparaison des méthodes de dénombrement par inclusion et par étalement – p. 117.
- Tableau 23.** Évaluation de la DL50 de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 - Tableaux de Reed et Muench – p. 118.
- Tableau 24.** Valeurs de DL50 obtenues graphiquement à J7 par la méthode de Reed et Muench pour *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et pour *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 – p. 119.
- Tableau 25.** Activité enzymatique phosphatase acide mesurée dans les surnageants de culture de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 et des trois mutants sélectionnés déficient en AcpA – p. 120.
- Tableau 26.** Souches bactériennes et plasmides utilisés au cours de la seconde étude – p. 127.
- Tableau 27.** Première génération de vecteurs navettes dérivés du pF242 et du pF243 et amorces utilisés dans la seconde étude – p. 129.

- Tableau 28.** Seconde génération de vecteurs navettes dérivés du pF242 et du pF243 – **p. 132.**
- Tableau 29.** Analyse des régions codantes du pF242 de *F. philomiragia* ATCC 25016 – **p. 138.**
- Tableau 30.** Caractérisation par alignement de séquence de la réplicase prédite et codée par F242_0002 – **p. 139.**
- Tableau 31.** Identification de la région *nic* hypothétique du pF242 – **p. 140.**
- Tableau 32.** Analyse des régions codantes du pF243 de *F. philomiragia* ATCC 25017 – **p. 140.**
- Tableau 33.** Caractérisation par alignement de séquence de la réplicase prédite et codée par F243_0006 – **p. 142.**
-

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Francisella tularensis est l'agent étiologique de la tularémie. Cette maladie atteint les petits mammifères terrestres et aquatiques tels que les rongeurs, les lièvres et les castors. Elle peut se transmettre accidentellement à l'Homme lors d'un contact avec des animaux infectés. L'incidence de la tularémie sur la santé publique est faible et est rencontrée notamment chez les chasseurs, chez les agriculteurs et chez les gardes forestiers qui sont susceptibles d'être en contact avec l'agent infectieux.

Francisella tularensis est une bactérie transmissible par voie respiratoire. L'inhalation d'une dizaine de bactéries suffit à provoquer une maladie sévère chez l'Homme, pour laquelle aucun vaccin homologué n'est disponible. Ce potentiel infectieux important a encouragé certains pays à développer, au cours du XX^{ème} siècle, des applications offensives basées sur l'utilisation de cette bactérie. Ainsi, *Francisella tularensis* est aujourd'hui classée parmi les agents du risque biologique agressif de haute priorité, au même titre que les agents pathogènes responsables de la variole, de la peste, du charbon et du botulisme ¹.

Le laboratoire de bactériologie du département de biologie des agents transmissibles du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées « Émile Pardé » a pour objectif d'étudier *Francisella tularensis*, d'identifier ses facteurs de virulence, de mieux comprendre la physiopathologie de la tularémie et de proposer des applications diagnostiques et thérapeutiques. Les résultats présentés dans ce manuscrit constituent les premiers travaux de recherche du laboratoire de bactériologie sur cette thématique

Après une revue bibliographique sur le risque biologique, sur la tularémie, sur les mécanismes de virulence de *Francisella tularensis* et sur les outils moléculaires développés

pour la manipulation génétique de la bactérie, les résultats de ce travail seront présentés en deux parties.

La première partie porte sur l'évaluation du rôle la phosphatase acide AcpA dans la virulence de la sous-espèce la plus pathogène pour l'Homme, *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*.

La deuxième partie porte sur l'identification et la caractérisation de deux nouveaux plasmides naturels de *Francisella*, qui nous ont servi pour la construction de deux générations de vecteurs navettes répliatifs chez *E. coli* et chez *Francisella*.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I

Le risque biologique provoqué

I – Contexte historique et politique

Au cours de l'histoire, les stratèges de guerre ont très tôt discerné la vulnérabilité d'un ennemi affaibli par la maladie. Aussi, les armes biologiques ont-elles été utilisées bien avant de connaître l'existence même des microbes : dès l'an 300 avant J.C., les Grecs polluaient les puits et les sources d'eau potable de leurs ennemis avec des cadavres d'animaux. Par la suite, les Romains et les Perses ont utilisé la même tactique. En 1155, au cours de la bataille de Tortona, Barberousse infecta les puits avec des cadavres de soldats. Au XIV^{ème} siècle, lors du siège de Caffa, les catapultes permirent aux Tatars de projeter des cadavres pestiférés à l'intérieur de la cité.

Le développement de la bactériologie au cours du XIX^{ème} et au début du XX^{ème} siècle permettra, d'élargir considérablement le spectre des agents utilisables dans le monde, incluant entre autres, ceux provoquant le cholera, la peste, la morve et le charbon.

Bien que considérées comme contraire à l'honneur, ces pratiques ont toujours existé. Les premiers textes codifiant la prohibition des « poisons » au cours de la guerre moderne sont édités au XIX^{ème} siècle avec le *Lieber Code*, suivi de la Déclaration de Bruxelles en 1874. En 1925, après la Première Guerre mondiale, la Société Des Nations (SDN) entame des négociations qui aboutissent au « Protocole de Genève » ratifié par quarante pays, dont la France. Les pays signataires s'engagent alors moralement à ne plus utiliser d'armes chimiques et biologiques, chacun émettant toutefois des réserves quant à un possible droit de riposte avec le même type d'armes que celles qui pourraient servir à les attaquer. La Convention de 1972, ratifiée par 130 pays, se focalise sur les armes biologiques, interdisant leur mise au point, leur fabrication et leur stockage à des fins militaires, mais autorisant néanmoins des

études sur les agents biologiques à des fins pacifiques. Ce dernier texte n'imposant aucun contrôle du respect de l'application des termes de cette convention, certaines transgressions ont émergé : en avril et mai 1979, une épidémie inhabituelle de charbon pulmonaire survint à Sverdlovsk en URSS après l'explosion d'un bâtiment militaire. L'origine exacte de cette épidémie, longtemps niée par les autorités soviétiques, a été reconnue en 1992 par le Président Eltsine. Par ailleurs, selon un rapport du Département de la Défense américaine, les Irakiens ont également avoué la fabrication de 90 000 litres de toxine botulinique, 8 300 litres de charbon et de quantités significatives d'aflatoxine².

Les armes biologiques du fait de leur faible coût de production sont aisément accessibles par de nombreux pays. D'autre part, certains groupes idéologistes motivés par des actions bioterroristes peuvent également y avoir accès, ce qui préoccupe les pouvoirs publics. L'histoire témoigne de quelques actes bioterroristes dès le début des années 1980. L'utilisation de *Salmonella typhimurium* par la secte Rajneeshee en 1984 dans la ville d'Oregon aux États-Unis provoquera 751 cas d'infections. Au cours de l'année 1990, la secte Aum, ayant effectué des travaux sur *Bacillus anthracis*, aurait quant à elle perpétré trois tentatives d'attentats biologiques, sans résultat, au cœur de la ville de Tokyo. Quelques semaines après les attentats du 11 septembre 2001, des cas de charbons pulmonaire et cutané, causant la mort de cinq victimes, sont apparus aux États-Unis par le biais de courriers contaminés par des spores de *Bacillus anthracis*. En France, durant cette même période, 4 000 alertes au colis piégé au charbon ont été signalées. Aucune d'entre elles n'a été avérée^{3,4}.

Aux États-Unis, les événements de 2001 ont particulièrement marqué les esprits et ont conduit la communauté internationale à mettre en place des mesures pour faire face à la menace terroriste. En France, un plan gouvernemental d'intervention face aux menaces et actes de terrorisme de type nucléaire, radiologique, biologique ou chimique a été mis en place : il s'agit du plan Biotox – Piratox. Ce dernier, déclenché par le Premier Ministre et le Secrétariat Général de la Défense Nationale (SGDN) est le fruit d'une action coordonnée interministérielle impliquant les Ministères de la Défense, de l'Intérieur et de la Santé.

Parmi les acteurs du Ministère de la Défense intervenant dans le plan Biotox – Piratox figure le Service de Santé des Armées (SSA) qui intervient à plusieurs niveaux : ses laboratoires, dont le Centre de Recherches du Service de Santé des Armées « Émile Pardé » (CRSSA), sont spécialisés dans la prise en charge et l'analyse des colis suspects ; les hôpitaux

militaires interviennent dans le diagnostic et dans la prise en charge des patients civils et militaires.

L'activité d'expertise des laboratoires du SSA implique la réalisation de recherches fondamentales et appliquées sur les agents du risque biologique provoqué, dont la manipulation nécessite des infrastructures adaptées, tels que des laboratoires de niveau de sécurité biologique 3 (NSB3). Ces recherches aboutissent d'une part, au développement de méthodes d'identification des agents biologiques dans la mesure du possible applicables sur le terrain, et d'autre part, à la proposition d'actions préventives et thérapeutiques.

II – Classification des agents du risque biologique provoqué

En 1999, les agents biologiques critiques pour la santé publique ont été classés selon trois catégories, A, B et C ([Tableau 1](#))⁵, par un comité d'experts des « Centers for Diseases Control and Prevention » (CDC). Cet ensemble de centres d'études, dont le siège réside à Atlanta, forme aux États-Unis l'agence gouvernementale principale en matière de protection de la santé et de la sécurité publique. Ces centres travaillent en partenariat avec les autres pays et surveillent l'émergence de maladies infectieuses, dont celles associées au bioterrorisme.

Francisella tularensis a été classé dans la catégorie A. Les agents pathogènes de cette catégorie sont de haute priorité. Leur utilisation aurait un impact majeur sur la santé publique et provoquerait une désorganisation des structures économiques et sociales. Ils sont faciles à produire et à disséminer. Ils présentent une létalité importante et sont transmissibles par voie respiratoire.

L'utilisation des agents de catégorie B aurait un impact moins important sur la santé publique. Ils sont faciles à disséminer, présentent une morbidité modérée et une faible létalité. Ils nécessitent la mise en œuvre de procédures de diagnostic et d'un système de surveillance approprié.

La catégorie C regroupe tous les agents qui ne présentent pas de hauts risques, mais qui pourraient être modifiés pour favoriser une dissémination de masse. Ils sont donc disponibles, faciles à produire et l'utilisation de ce type d'agents pourrait engendrer une mortalité élevée.

Les CDC demeurent les seuls à avoir hiérarchisé en catégories la liste des agents présentant un risque biologique ; cette classification est par conséquent souvent prise comme référence. Toutefois, cette liste est également régulièrement mise à jour par d'autres organismes nationaux, européens ou internationaux.

Tableau 1. Catégories des agents biologiques critiques pour la santé publique ⁵

Agents biologiques	Maladies
Catégorie A	
<i>Variola</i>	Variole
<i>Bacillus anthracis</i>	Charbon
<i>Yersinia pestis</i>	Peste
<i>Clostridium botulinium</i>	Botulisme
<i>Francisella tularensis</i>	Tularémie
Filovirus et Adenovirus (ex : <i>virus Ebola</i> , <i>virus Lassa</i>)	Fièvres hémorragiques
Catégorie B	
<i>Coxellia burnetii</i>	Fièvre Q
<i>Brucella</i> spp.	Brucellose
<i>Burkholderia mallei</i>	Morve
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Mélioïdose
<i>Alphavirus</i>	Encéphalite
<i>Rickettsia prowazekii</i>	Typhus
Toxines (ex : Ricine, Enterotixine B de <i>S. aureus</i>)	Syndromes toxiques
<i>Chlamydia psittaci</i>	Psittacose
Agents menaçants pour la sécurité alimentaire (<i>Salmonella</i> spp. <i>E. coli</i> O157:H7)	Syndromes digestifs
Agents transmissibles par l'eau (ex : <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i>)	Syndromes digestifs
Catégorie C	
Agents émergents (ex : <i>virus Nipah</i> , hantavirus)	Fièvres hémorragiques

En France, la classification de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS), basée sur celle des CDC, est complétée par les agents biologiques présentant des spécificités épidémiologiques nationales.

Le mode privilégié de dispersion des agents biologiques en cas d'utilisation agressive est la voie aérienne. Parmi l'ensemble des agents pris en considération par l'AFSSAPS,

certaines présentent des caractéristiques communes, notamment celle d'être dispersés par aérosols de particules inférieures à 5 µm de diamètre. Demeurant en suspension dans l'air pendant plusieurs heures, ces aérosols sont inhalés et pénètrent alors jusqu'aux alvéoles pulmonaires. La contamination par voie respiratoire présente certaines caractéristiques dont une incubation très brève, un tableau clinique différent de la maladie naturelle avec une prédominance de symptômes pulmonaires non spécifiques et une évolution rapide conduisant à un taux de mortalité élevée. Ainsi, l'AFSSAPS met à disposition sur son site Internet une série de fiches « Biotox » renseignant les modalités de la prise en charge thérapeutique pour un certain nombre d'agents biologiques. Ces fiches ont pour objectif de fournir une réponse médicale rapide associée à des traitements spécifiques adaptés à une transmission par voie aérienne ⁶.

La « Health Protection Agency » (HPA) en Angleterre et l'Agence Européenne du médicament (EMA) répertorient les agents du risque biologique sur la base de la classification des CDC et établissent des recommandations concernant les agents des catégories A, B ou C.

Au niveau international, l'Organisation du Traité de l'Atlantique Nord (OTAN) fournit également une liste d'agents du risque biologique, associée aux informations cliniques pour le diagnostic des maladies. A cette liste s'ajoute un ensemble de données opérationnelles dont, les formes de dissémination, les possibilités de transmission interhumaine, les niveaux infectieux, les temps d'incubation, la durée de l'infection, les niveaux de létalité et les traitements disponibles ⁷.

Le groupe « Australia », réunissant une quarantaine de pays, met quant à lui à disposition sur son site Internet une liste d'agents du risque biologique. Cette organisation a pour objectif d'harmoniser les activités d'exportation entre les différents pays, d'éviter la fabrication illicite d'armes chimiques et biologiques et de lutter contre l'usage des armes de destructions massives.

III - *Francisella tularensis* : un agent du risque biologique provoqué

La tularémie et son agent étiologique ont été étudiés en Californie de 1911 à 1924. La tularémie, d'abord décrite chez les lapins et les écureuils, a ensuite été reconnue comme une maladie sévère, voire mortelle, chez l'Homme. L'apparition en Europe et en Union Soviétique de cas d'infection consécutive à l'ingestion d'eau contaminée, et aux États-Unis, de cas associés à une épizootie, révéla le potentiel infectieux de la bactérie dans les années 1930 et

1940. *Francisella tularensis* présentant alors un risque pour la santé publique, des études ont été entreprises pour prévenir la maladie, identifier son origine, ainsi que les réservoirs et les vecteurs de la bactérie ¹.

Francisella tularensis est apparue très tôt comme un agent potentiel du risque biologique provoqué. Étudiée par les unités de recherche japonaises opérant en Mandchourie entre 1932 et 1945 dans le but de développer des armes biologiques ⁸, cette bactérie a également intéressé l'Union Soviétique. Dans un ouvrage, Alibek ⁹ impliqué dans le développement d'armes biologiques, a suggéré que les dizaines de milliers de cas de tularémie dénombrés parmi les soldats soviétiques et allemands au front Est de l'Europe au cours de la Seconde Guerre mondiale, seraient le résultat d'une utilisation intentionnelle de son agent infectieux. Lui-même infecté par la bactérie lors d'un incident de laboratoire, Alibek s'administra rapidement un traitement antibiotique et cet événement resta sans conséquences. Les recherches sur la tularémie, dans un cadre militaire, se sont poursuivies après la Seconde Guerre mondiale. Dans les années 1950 et 1960, l'Armée américaine a développé des munitions afin de disséminer *F. tularensis* par aérosolisation. Dans le cadre de certaines expériences, des volontaires acceptèrent d'être infectés par des aérosols ¹⁰. Simultanément, des études sur la physiopathologie de la tularémie et sur le développement de vaccins et de traitements antibiotiques ont été initiées ^{11, 12}. A la fin des années 1960, *F. tularensis* faisait partie des nombreux agents du risque biologique militaire stockés par l'Armée américaine. Selon Alibek ⁹, l'Union Soviétique continua ses recherches jusque dans les années 1990 et développa des souches de *F. tularensis* résistantes aux antibiotiques et aux vaccins.

En 1969, un comité d'experts de l'Organisation Mondiale de la Santé estima que la dispersion par aérosols de 50 kg d'une souche virulente de *F. tularensis* au-dessus d'une ville peuplée de cinq millions d'habitants ferait 250 000 victimes, dont 19 000 morts. La maladie persisterait sur place pendant plusieurs semaines. Les individus vaccinés ne seraient que partiellement protégés. Selon ce modèle, les CDC estimèrent que la prise en charge de 100 000 personnes infectées coûterait 5,4 milliard de Dollars ¹³.

CHAPITRE II

La tularémie et son agent étiologique : *Francisella tularensis*

Introduction

La tularémie est une zoonose rencontrée dans l'hémisphère Nord. Elle peut être transmise à l'Homme par diverses voies de contamination. Son agent étiologique, *Francisella tularensis*, est une bactérie très virulente pouvant causer des épizooties. La maladie a été caractérisée pour la première fois en 1912, dans le Comté de Tulare en Californie. A cette époque, Mac Coy, Chapin, Lamb, Francis, Parker et Spencer isolèrent la bactérie à partir de petits mammifères, des écureuils et des lapins, présentant des signes de la peste. La maladie, alors nommée « pseudopeste du rongeur », a ensuite été reliée aux manifestations cliniques humaines connues sous le nom de « fièvre de la mouche du cerf, du daim, du bœuf », qui deviendra par la suite la tularémie ^{14, 15}.

Au cours des vingt années qui ont suivies, *Francisella tularensis* a été isolée en Amérique du Nord, au Japon, en Russie, ainsi qu'en Europe. En France, la bactérie a été isolée dans les années 1940 et depuis la maladie se manifeste sporadiquement chez l'Homme et chez l'animal ¹⁵.

La position taxonomique de *Francisella tularensis* est longtemps restée incertaine. L'étude des caractères phénotypiques et génotypiques de la bactérie conduiront finalement à la création de la famille des *Francisellaceae*, dans laquelle sont regroupées aujourd'hui les espèces du genre *Francisella*.

Actuellement, face à la morbidité importante de cette bactérie, une surveillance mondiale de la tularémie est assurée chez les animaux sauvages et chez l'Homme, afin de déceler l'émergence de foyers infectieux. Les procédures de diagnostic de la maladie et de

prise en charge thérapeutique des patients sont définies par les autorités nationales et les organisations internationales. Elles font également l'objet d'études visant à proposer de nouvelles méthodes de diagnostic, de nouvelles voies thérapeutiques et de nouveaux vaccins.

Dans ce chapitre seront présentés les caractéristiques du genre *Francisella*, ainsi que l'épidémiologie, les manifestations cliniques de la maladie chez l'Homme et enfin les méthodes de diagnostic et le traitement de la tularémie.

PARTIE I – LE GENRE *FRANCISELLA*

I - Taxonomie

La désignation du genre bactérien « *Francisella* » fait honneur à Edward Francis qui a été l'un des premiers microbiologistes à avoir étudié la tularémie dans les années 1920 et 1930. Le nom de l'espèce « *tularensis* » et le nom de la maladie sont liés au Comté de Tulare, localité où la maladie a été décrite pour la première fois.

Le [Tableau 2](#) ci-dessous résume la position taxonomique des bactéries appartenant au genre *Francisella*.

Tableau 2. Position taxonomique des espèces du genre *Francisella*

Domaine	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Thiotrichales</i>
Famille	<i>Francisellaceae</i>
Genre	<i>Francisella</i>
Espèces	<i>tularensis</i> <i>novicida</i> <i>philomiragia</i> <i>piscicida</i>
Sous-espèces de <i>F.tularensis</i>	<i>tularensis</i> (type A, biovar <i>tularensis</i>) <i>holarctica</i> (type B, biovar <i>palaeartica</i>) <i>mediasiatica</i>

La position taxonomique du genre *Francisella* est longtemps restée incertaine. *Francisella tularensis* a d'abord été nommée *Bacterium tularensis* par Edward Francis. Dans les années 1920, des études sérologiques ont permis de classer cette bactérie parmi le genre *Pasteurella*, puis elle a temporairement été classée parmi le genre *Brucella* ¹⁶. Cependant, en 1966 des études d'hybridation ADN-ADN ont indiqué que ce nouveau genre bactérien n'était lié ni aux genres *Pasteurella* et *Yersinia*, ni aux entérobactéries ¹⁷. Ces résultats ont été confirmés en 1994 par l'analyse de séquence de l'ADN ribosomal 16S, qui n'a révélé aucun lien entre le genre *Francisella* et les autres genres bactériens déjà décrits ¹⁸. La proposition de former le genre *Francisella* avec comme seule espèce *Francisella tularensis* a été formulée en 1947 par Dorofe'ev ¹⁹.

Francisella est le seul genre de la famille des *Francisellaceae*. Au sein des *Gammaproteobacteria*, la famille la plus proche des *Francisellaceae* est celle des *Piscirickettsiaceae* qui comprend la bactérie intracellulaire *Piscirickettsia salmonis* responsable de septicémies chez le poisson ²⁰. Les organismes les plus proches d'un point de vue phylogénétique sont des bactéries intracellulaires obligatoires, telles que : *Wolbachia persica*, isolée de la tique *Argas persicus* et deux endosymbiotes de tiques qui n'ont pas encore été nommés ²¹.

Après les années 1950, la taxonomie des différentes sous-espèces de *Francisella tularensis* a évolué avec la classification de la maladie en fonction du tableau clinique, de l'épidémiologie ou de la source d'infection. Les travaux d'Olsufiev et collaborateurs ont permis de mettre en évidence en 1959 deux agents étiologiques présentant une virulence différente chez les lièvres ²². Les isolats retrouvés uniquement en Amérique du Nord, très pathogènes et provoquant des formes sévères de la maladie chez l'Homme, ont été regroupés sous l'appellation « biovar *tularensis* » ou « type A », par la suite nommée *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* ²³. Les isolats retrouvés en Europe, en Asie et en Amérique du Nord et présentant une virulence moins importante, ont été regroupés sous l'appellation « biovar *palaeartica* » ou « type B », par la suite nommée *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* ²³. D'après certains caractères phénotypiques, dont la sensibilité à l'érythromycine, la sous-espèce *holarctica* a ensuite été divisée en trois biotypes ²⁴. Enfin, les isolats retrouvés en Asie Centrale et en Russie ont été regroupés parmi la sous-espèce *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*.

La position taxonomique de l'espèce *Francisella novicida* est encore discutée. La souche type a été isolée en 1951 à partir d'un échantillon d'eau dans l'État de l'Utah aux États-Unis. Elle a d'abord été rattachée au genre *Pasteurella*²⁵, puis transférée dans le genre *Francisella* en 1959²² sous l'appellation *Francisella novicida*. En 1989, suite à des expériences d'hybridation ADN-ADN et d'après les caractères biochimiques de *Francisella novicida*, Hollis et collaborateurs suggèrent de reclasser cette bactérie parmi les sous-espèces de *Francisella tularensis*²⁶. Cette proposition a été soutenue par une analyse de l'ADN ribosomal 16S de *Francisella novicida* qui s'est révélée être identique à celui de *Francisella tularensis*¹⁸.

Sur la base de ces deux études, l'existence de la sous-espèce *novicida* a été acceptée par la communauté scientifique et a également été reprise par Sjöstedt dans la dernière édition du manuel de microbiologie Bergey's Manual of Microbiology²¹. Pourtant, l'existence de cette sous-espèce n'a jamais été validée par les trois journaux internationaux officiels suivants : le Bulletin International de la Nomenclature et de la Taxonomie Bactérienne (International Bulletin of Bacterial Nomenclature and Taxonomy – IBBNT), le Journal International de Systématique Bactérienne (International Journal of Systematic Bacteriology – IJSB) et le Journal International de Systématique et d'Evolution Microbienne (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology – IJSEM)^{27, 28}. Ainsi, aujourd'hui la dénomination exacte de ces isolats est *Francisella novicida* et non *Francisella tularensis* subsp. *novicida*.

La troisième espèce du genre *Francisella* est assez peu décrite dans la littérature. Il s'agit de *Francisella philomiragia*, dans un premier temps nommée *Yersinia philomiragia*. La première souche a été isolée d'un rat musqué moribond dans le Nord de l'État de l'Utah en 1959²⁹. En 1960, quatre autres isolats issus d'échantillons d'eau ont été caractérisés et regroupés parmi le genre *Yersinia* selon des critères de parenté de leur ADN avec *Yersinia pestis* (24%)¹⁷ et de ressemblance morphologique avec cette même bactérie, dans les tissus d'animaux infectés. Ce résultat n'a pas pu être vérifié³⁰ et la position taxonomique de ces isolats est restée incertaine jusqu'en 1989³¹. D'après des analyses d'hybridation ADN-ADN et d'après la composition en acides gras de la paroi cellulaire de *Yersinia philomiragia*, Hollis et collaborateurs ont alors proposé de transférer cette bactérie vers le genre *Francisella*²⁶. Cette proposition a été validée par l'IBBNT, IJSB et l'IJSEM.

En 2007, une nouvelle bactérie a été isolée en Norvège à partir d'un cabillaud d'élevage. Ses caractéristiques moléculaires et phénotypiques ont révélées son appartenance à une nouvelle espèce du genre *Francisella*, dénommée *Francisella piscicida*^{32,33}.

II – Caractères phénotypiques

La famille des *Francisellaceae* est constituée de courts bacilles ou cocco-bacilles non-sporulés, immobiles, à Gram négatif. Leur taille est variable en fonction de l'espèce considérée : de 0,2 à 0,7 µm × 0,2 µm pour *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*, *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* et 0,7 × 1,7 µm pour *Francisella novicida*, *Francisella philomiragia* et *Francisella piscicida*. A la coloration de Gram, les bactéries apparaissent faiblement colorées.

Le [Tableau 3](#) et le [Tableau 4](#) présentent les caractères phénotypiques différentiels entre les espèces et sous-espèces appartenant au genre *Francisella*^{21, 32, 33}, ainsi qu'entre les trois biotypes de la sous-espèce *holarctica*.

Cette famille de bactéries est exigeante. Ceci concerne particulièrement les sous espèces *tularensis*, *holarctica* et *mediasiatica*, dont la culture est plus fastidieuse que celle des espèces *novicida* et *philomiragia*.

Les milieux de cultures utilisés contiennent du sérum ou du sang complet et sont souvent enrichis avec de la cystéine ou avec un mélange nutritif, tel que l'IsoVitaleXTM (Becton Dickinson, France) ou le PolyViteXTM (AES, France) permettant une meilleure croissance de la bactérie ([Tableau 5](#)). Les espèces *novicida*, *philomiragia* et *piscicida* sont les seules ne nécessitant pas de complément en cystéine pour leur croissance. Les mélanges nutritif, tel que l'IsoVitaleXTM ou le PolyViteXTM, initialement conçus pour la culture des espèces d'*Haemophilus* et de *Neisseria*, fournissent le facteur V (nicotinamide-adénine-dinucléotide, NAD), des vitamines, des acides aminés, des coenzymes, du dextrose, des ions ferriques et d'autres facteurs favorisant la croissance des espèces exigeantes.

Tableau 3. Caractères phénotypiques de différenciation entre les espèces et les sous-espèces appartenant au genre *Francisella*^{21, 32, 33}.

	<i>F. t.</i> subsp. <i>tularensis</i>	<i>F. t.</i> subsp. <i>holarctica</i>	<i>F. t.</i> subsp. <i>mediasiatica</i>	<i>F.</i> <i>novicida</i>	<i>F.</i> <i>philomiragia</i>	<i>F.</i> <i>piscicida</i>
Taille	<0,5 µm	<0,5 µm	<0,5 µm	<0,5 µm	<0,5 µm	<0,5 µm
Mobilité	–	–	–	–	–	–
Capsule	+	+	+	–	ND ^a	ND
Coloration de Gram	–	–	–	–	–	–
Catalase ^b	+	+	+	+	+	+
Oxydase	–	–	–	–	+	–
Indole	–	–	–	–	+	+
Uréase	–	–	–	–	–	–
Réduction des nitrates	–	–	–	–	–	–
Gélatinase	–	–	–	–	+	–
Température optimale de croissance, en °C	37	37	37	37	25 ou 37	20
Croissance sur Mac Conkey ^c	–	–	–	R	R	R
Aérobic, microaérophile	+	+	+	+	+	+
Besoins en cystéine	+	+	+	–	–	–
Production d'H ₂ S sur milieu supplémenté en cystéine	+	+	+	+	+	faible
β-lactamase	+	+	–	+	+	+
<i>Fermentation des sucres :</i>						
Maltose	+	+	–	R	+	+
Lactose	–	–	–	–	–	–
Saccharose	–	–	–	+	+	+ ^d
D-Glucose	+	+	–	+	R	+
Glycerol	+	–	+	R	–	–
Citrulline uréidase	+	–	+	+	ND	ND
Agglutination avec l'antisérum de <i>F. tularensis</i>	+	+	+	faible	–	–

^a ND, non déterminé.^b Catalase faiblement positive.^c Croissance sur gélose Mac Conkey retardée (R) pour les souches capables de pousser, nécessite 3 à 7 jours d'incubation.^d Fermentation faible du saccharose par *F. piscicida*.**Tableau 4. Caractères phénotypiques de différenciation entre les trois biotypes de *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*^{24, 34}**

	Biotype I	Biotype II	Biotype III (<i>biovar Japonica</i>)
Érythromycine	Sensible	Résistant	Sensible
Glucose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Glycérol	–	–	+

Tableau 5. Milieux nutritifs décrits pour la culture du genre *Francisella*

Milieux de culture décrits dans la littérature	Références
Milieu de Francis	35, 36
Milieu de Mc Coy et Chapin	35, 36
Gélose BCYE (buffer charcoal yeast extract)	35, 36
Milieu de Tayer-Martin	35, 36
Milieu glucose-cystéine-peptone	35, 36
Gélose cystine-cœur-sang-1% d'hémoglobine (Cystine heart blood agar)	37
Gélose infusion cœur-cerveille (Brain heart infusion agar)	37
Gélose Mueller-Hinton - 2% IsoVitalex – 0,025% pyrophosphate de fer (Mueller-Hinton agar)	38
Gélose glucose-cystéine-cœur-sang (Glucose cystein heart blood agar)	21
Gélose chocolat enrichie	39
Bouillon Mueller-Hinton modifié – 0,1% glucose- 2% IsoVitalex TM – 0,025% pyrophosphate de fer	38
Gélose T-medium	40
Bouillon de Chamberlain	41
Mueller Hinton - 10% sang cuit - PolyViteX TM	42

Milieux de culture commerciaux	Fournisseurs
Glucose cystein agar	BBL
Cystein heart agar	Difco
Gélose chocolat enrichie	AES
Gélose chocolat PolyViteX TM	Biomerieux
Gélose chocolat IsoVitaleX TM	BD*
Gélose chocolat PVS	Biorad

* Becton Dickinson

Les bactéries du genre *Francisella* sont aérobies strictes et leur croissance est facilitée par une incubation en atmosphère micro-aérophile (5% de CO₂). Les colonies apparaissent après 3 à 4 jours d'incubation à 37°C. Elles sont convexes, opaques, lisses, brillantes et de couleur blanche à crème en fonction de l'espèce considérée. Leur taille varie de 1 à 3 mm. Les colonies de *Francisella philomiragia* ont un aspect muqueux caractéristique (Figure 1)

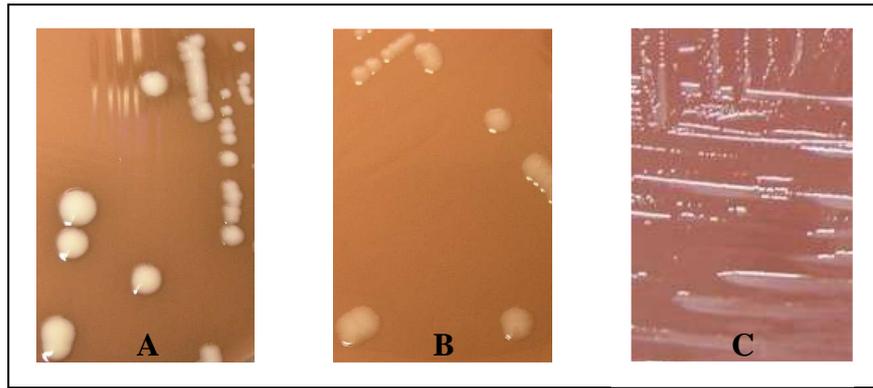


Figure 1. Aspect des colonies de *Francisella philomiragia* (A), de *Francisella novicida* (B) et de *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* (C) à partir d'un isolement sur gélose chocolat enrichie (AES), après 72 heures d'incubation à 37°C.

Les espèces du genre *Francisella* assimilent un nombre limité de sucres, avec une lente production d'acide sans production de gaz. Toutes les sous-espèces de *F. tularensis*, exceptée la sous-espèce *mediasiatica*, produisent de l'acide à partir du D-glucose et du maltose. L'assimilation du glycérol et la présence de la citrulline uréidase sont deux caractères distinctifs entre les sous-espèces *tularensis* et *holarctica*⁴³. L'assimilation du saccharose est spécifique des espèces *novicida*, *philomiragia* et *piscicida*. *F. philomiragia* est la seule espèce oxydase et gélatinase positive. La production d'indole est caractéristique des espèces *philomiragia* et *piscicida*²¹.

Les formes virulentes de *Francisella tularensis* sont entourées d'une capsule de 0,02 à 0,04 µm d'épaisseur qui peut être éliminée à l'aide d'une solution hypertonique. La capsule et la paroi des bactéries du genre *Francisella* ont une composition en lipides inhabituellement élevées pour des bactéries à Gram négatif : elles sont constituées d'acide gras à longues chaînes carbonées (C₁₈ à C₂₆) saturées ou mono-insaturées et de deux types d'acides gras hydroxylés (C_{16:0 3OH} et C_{18:0 3OH})^{26, 44}.

III – Caractères génotypiques

Le séquençage du génome des espèces du genre *Francisella* est récent. La séquence génomique de la souche *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 a été déposée en 2004⁴⁵. Depuis, les séquences génomiques de nombreuses autres souches sont en cours de détermination (Tableau 6).

Tableau 6. Génomes des espèces du genre *Francisella* séquencés ou en cours de séquençage^a

Séquençage complet du génome				
Souche	Taille du génome (pb)	Numéro Genbank	Année	Référence
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> SCHU S4	1 892 919	AJ749949	2004	45
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> LVS	1 895 994	AM233362	2006	/
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>novicida</i> U112	1 910 031	CP000439	2006	46
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> FSC198	1 892 616	AM286280	2006	47
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> OSU18	1 895 727	CP000437	2006	48
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>mediasiatica</i> FSC147	1 893 886	CP000915	2007	/
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> FTNF002-00	1 890 909	CP000803	2007	/
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> WY96-3418	1 898 476	CP000608	2007	49
<i>F. philomiragia</i> ATCC 25017	2 045 775	CP000937	2007	/
Séquençage incomplet du génome				
Souche	Taille du génome (pb)	Numéro Genbank	Année	Référence
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> 257	1 886 241	AAUD00000000	2006	/
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> FSC200	1 790 358	AASP00000000	2006	/
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>novicida</i> GA99-3548	1 845 491	ABAH00000000	2007	/
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>novicida</i> GA99-3549	1 897 440	AAZF00000000	2007	/
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> FSC022	1 858 527	AAZD00000000	2007	/
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> FSC033	1 844 205	AAZE00000000	2007	/
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>novicida</i> FTE	1 888 472	ABSS00000000	2008	/
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>novicida</i> FTG	1 843 928	ABXZ00000000	2008	/
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> MA00-2987	1 868 750	ABRI00000000	2008	/

^a Informations issues de la base de données GenBank

Les données issues du séquençage du génome de ces souches sont importantes pour l'étude du genre *Francisella*. L'analyse des séquences a permis de mieux comprendre le lien phylogénétique entre les différentes sous-espèces, d'identifier certains gènes pouvant être impliqués dans la virulence ou dans le métabolisme de la bactérie et de mettre en évidence des différences dans la structure et dans l'organisation des génomes.

En fonction des espèces, la taille des génomes varie de $1,5.10^6$ à $2,0.10^6$ pb et le pourcentage G+C varie de 33% à 36% ²¹. Le faible pourcentage G+C est une caractéristique du genre *Francisella*.

La première séquence génomique analysée a été celle de la souche *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4, isolée à partir d'un cas clinique humain de tularémie dans l'État de l'Ohio en 1941 ⁴⁵. Elle contient 1 804 régions codantes, dont 302 spécifiques au genre *Francisella*. Plus de 10% des gènes contiennent des mutations par insertion, par délétion ou par substitution. Ils correspondent en majorité à des protéines impliquées dans le transport, dans le métabolisme de l'ADN ou dans la synthèse d'acides aminés. Ainsi, 54% des voies métaboliques de la bactérie sont interrompues, ce qui peut expliquer l'exigence nutritionnelle de la bactérie. L'interruption d'une voie d'assimilation du sulfate due à la mutation d'un gène codant pour l'adenylylsulfate kinase expliquerait le besoin en cystéine pour la croissance de *Francisella tularensis*.

La deuxième séquence génomique analysée a été celle de la souche *F. tularensis* subsp. *holarctica* OSU18 isolée à partir d'un castor mort de la tularémie en 1978 dans l'État de l'Oklahoma. Elle contient 1 934 régions codantes et présente 99% d'identité avec la séquence génomique de la souche *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 ⁴⁸. Comme pour cette souche, plus de 10% des gènes sont mutés.

Malgré des compositions en acides nucléotidiques proches, les séquences de ces deux souches présentent des arrangements différents. Certaines régions encadrées par des séquences répétées ne sont pas disposées aux mêmes endroits sur le génome. Ces régions répétées constituent des séquences d'insertion (IS) qui favorisent les phénomènes de recombinaisons homologues et de réarrangements génomique. Ces événements semblent se produire plus fréquemment pour les souches de la sous-espèce *tularensis*, dont les génomes présentent un polymorphisme important ^{47, 49}. Ces variations caractérisées sur des isolats de la sous-espèce *tularensis*, provenant de zones géographiques différentes des États-Unis, se traduisent par des inversions et des translocations de séquences ⁴⁹. Leur analyse a conduit à la création de deux sous populations : la sous population A.I, rencontrée dans le Centre-Sud des États-Unis et la sous population A.II, retrouvée dans les régions montagneuses de l'Ouest ^{50, 51}. Ces deux sous populations auraient évoluées séparément en fonction de leur

distribution géographique caractérisée par des hôtes et des vecteurs appartenant à des espèces différentes.

Enfin, l'analyse de la séquence génomique de la souche *F. novicida* U112 a montré une identité de 97,8% avec la souche *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS (Live Vaccine Strain) et de 98,1% avec la souche *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4⁴⁶. Les génomes des souches SCHU S4 et LVS contiennent plus de zones dupliquées par rapport au génome de la souche U112. Des séquences d'insertion ont été mises en évidence dans le génome de la souche U112. Cependant, ce dernier a subi moins de réarrangements chromosomiques et seulement 1% de ses gènes sont mutés.

Jusqu'à présent, ces analyses ont révélé un niveau de conservation important entre les génomes des différentes espèces de *Francisella* malgré leurs différences phénotypiques, leurs différences de virulence et leur large distribution géographique. Cette conservation importante est probablement due au caractère intracellulaire des bactéries⁵². Les génomes des souches appartenant aux sous-espèces *tularensis* et *holarctica* contiennent beaucoup plus de gènes mutés, ce qui provoque l'interruption de nombreuses voies métaboliques, comparativement au génome de *F. novicida* faiblement pathogène pour l'Homme. Une corrélation entre la perte de l'information génétique due aux réarrangements chromosomiques et la présence de séquences d'insertion a déjà été démontré chez certaines bactéries pathogènes, comme *Yersinia pestis*⁵³, *Bordetella*⁵⁴, *Burkholderia*⁵⁵ et *Mycobacterium leprae*⁵⁶. Ces phénomènes de recombinaison sont caractéristiques des pathogènes virulents ou émergents lors de processus d'adaptation. L'interruption des voies métaboliques rend ces organismes peu résistants dans l'environnement, mais les rend extrêmement bien adaptés à leur hôte dans lequel certaines fonctions métaboliques ne sont pas indispensables. *Francisella tularensis* semble s'être adaptée en perdant des gènes nécessaires à son métabolisme et en dupliquant une partie de ses gènes de pathogénicité nécessaires à l'expression de sa virulence et donc à sa survie chez l'hôte.

PARTIE II – LA TULAREMIE

I - Épidémiologie

I - 1. La tularémie à travers le monde

Après sa première description en 1911 chez les rongeurs dans le Comté de Tulare, la maladie a été diagnostiquée dans d'autres régions du monde, où de nombreuses études ont tenté de déterminer le cycle épidémiologique de la bactérie. Une des caractéristiques de *Francisella tularensis* réside dans sa capacité à infecter une grande variété d'animaux terrestres et aquatiques, laquelle facilite sa dissémination dans l'environnement. La maladie touche particulièrement les lagomorphes et les rongeurs sauvages. Les ruminants et les carnivores ont également été identifiés comme hôtes de la bactérie^{57, 58}. Parmi les arthropodes, certaines espèces de tiques (*Ixodidae*, *Dermacentor*), de taons (*Tabanidae*) et de moustiques (*Aedes*, *Culex*, *Anopheles*) sont susceptibles d'être infectées et de jouer le rôle de vecteur de la maladie. Seuls les rongeurs et les tiques sont considérés comme réservoirs de la bactérie. Les lapins et les lièvres sont des vecteurs, mais ne constituent pas un réservoir dans la mesure où ils ne peuvent pas, à eux seuls, maintenir une population de bactéries et un cycle épidémiologique^{59, 60}. L'infection chez l'Homme est accidentelle : la contamination peut se produire essentiellement par contact cutané (manipulation d'un animal malade ou mort) ou par piqûre d'arthropodes, mais également par inhalation de poussières ou débris végétaux et par ingestion d'eau, de fruits ou de légumes contaminés. Cette maladie touche plus fréquemment les chasseurs, les forestiers et les cultivateurs^{35, 60, 61} pour lesquels elle constitue une maladie professionnelle. Aucune transmission interhumaine n'a été décrite.

Les cas humains de tularémie présentent une répartition mondiale irrégulière (Figure 2). La maladie a essentiellement été décrite dans l'hémisphère Nord, un seul cas d'infection ayant été constaté en Australie⁶². Les deux principales sous-espèces responsables des infections sont la sous-espèce *tularensis*, localisée en Amérique du Nord, et la sous-espèce *holarctica*, rencontrée dans tout l'hémisphère Nord. La sous-espèce *mediasiatica* et *F. novicida* sont peu fréquemment associées à des infections humaines, même si des isolats désignés *novicida*-like ont été identifiés comme agents étiologiques de maladies sévères^{26, 62, 63}. Bien que l'espèce *philomiragia* ne soit pas considérée comme

pathogène pour l'Homme, quelques cas d'infections opportunistes ont été constatés essentiellement aux États-Unis ^{26, 64-67}.

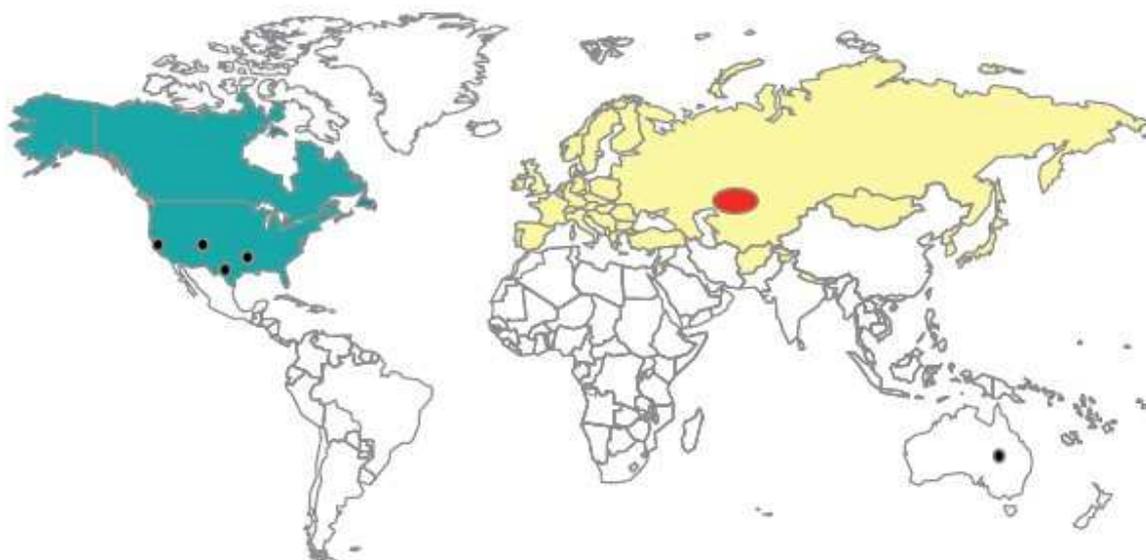


Figure 2. Distribution mondiale des cas d'infections causées par les sous-espèces *tularensis* et *holarctica* (■), *holarctica* (■), *mediasiatica* (■) et par *F. novicida* (■) ⁵⁸

Aux États-Unis, les lapins de l'espèce *Sylvilagus* extrêmement sensible à cette bactérie ont souvent été associés à la transmission de la tularémie à l'Homme, tout comme les tiques et la mouche du cerf (*Chrysops discalis*), vecteurs principaux de la sous-espèce *tularensis* ⁶¹. Entre 1914 et 1945, 14 000 cas humains ont été recensés ⁶⁸, avec un pic de 2 291 cas en 1939.

En Europe Centrale, le lièvre constitue le vecteur principal de la sous-espèce *holarctica*, mais la bactérie a également été retrouvée chez l'écureuil, le lapin et le campagnol. Dans des régions traversées par des ruisseaux, des étangs, des lacs et des rivières, les infections dues à la sous-espèce *holarctica* ont été associées aux moustiques et aux mammifères aquatiques, comme le rat musqué, le castor et le rat d'eau.

En Europe de l'Est, des cas cliniques ont régulièrement été décrits en Russie, au Kazakhstan et au Turkménistan. En Russie, les mouches et les moustiques, notamment la mouche du cerf, jouent un rôle important dans la transmission de la maladie.

En Europe de l'Ouest, la maladie se propage rarement à l'Homme. Une seule épidémie, probablement consécutive à une importation de lièvres sauvages, a été enregistrée en Espagne en 1990 ^{69, 70}. En France, depuis 2003, une trentaine de cas sont

décrits en moyenne chaque année. En Scandinavie, la maladie est également présente⁷¹. En effet, la Suède, particulièrement affectée par la tularémie, enregistre depuis 1931, des centaines de cas chaque année⁷². Ainsi, plus de 300 cas annuels ont été enregistrés en 1953, en 1967, en 1970, en 1981, en 2000 et en 2003 avec 698 cas d'infections⁷³.

La maladie est également présente dans le Nord de la Chine⁷⁴ et au Japon⁷⁵.

Le mode de contamination des insectes piqueurs n'est à ce jour pas connu. L'hypothèse retenue est une contamination à un stade larvaire par de l'eau souillée par les excréments des castors et des rats musqués infectés⁶⁸. La bactérie libérée dans l'environnement pourrait survivre trois mois dans la boue ou dans l'eau⁷⁶. Ce phénomène est probablement lié à la capacité de la bactérie à infecter les amibes^{77,78}.

La grande diversité des hôtes, l'étendue de leur distribution et l'irrégularité de leur répartition en zones endémiques rend complexe l'étude épidémiologique des différentes sous-espèces de *Francisella tularensis*. Par ailleurs, l'émergence et la persistance de la maladie semblent dépendre des changements climatiques qui conditionnent l'évolution des espèces. L'émergence de la maladie varie également en fonction de l'activité humaine. L'exode rural engendrant l'essor des agglomérations urbaines, ainsi que la diminution des professions agricoles a certainement contribué à la diminution du nombre de cas mondiaux de tularémie depuis les années 1940. Par ailleurs, l'importation de produits dérivés d'animaux infectés est susceptible d'engendrer l'émergence d'épidémies comme cela a été le cas en Espagne dans les années 1990. Enfin, les périodes de guerre sont propices à l'émergence de la maladie : en Europe pendant la Seconde Guerre Mondiale ou plus récemment, au Kosovo, la dégradation des conditions d'hygiène a entraîné l'augmentation de la population des rongeurs et a ainsi permis la propagation de la bactérie⁷⁹.

I - 2. Surveillance de la tularémie humaine en France

En France, la tularémie est inscrite sur la liste des maladies à déclaration obligatoire depuis octobre 2002, afin de surveiller l'émergence de zones endémiques ou l'apparition d'une nouvelle souche éventuellement liée à une utilisation malveillante⁶⁰. Les cas sont recensés à partir des fiches de déclaration obligatoire adressées à l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) et à partir des diagnostics réalisés par le Centre National de Référence

(CNR) de la tularémie. Pour chaque signalement, des informations cliniques et biologiques sont recueillies par la Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales ou par l'InVS.

En France, entre 2002 et 2007, le nombre de cas de tularémie n'excédait pas 50 par an. Au cours du premier semestre 2008, 72 cas ont été déclarés (Tableau 7). Au cours des six dernières années, la zone géographique la plus touchée a été le Grand Ouest (Figure 3) avec plus de dix cas recensés dans les Deux-Sèvres et l'Indre-et-Loire et jusqu'à dix cas recensés en Vendée, dans la Vienne et dans le Maine-et-Loire. Pendant cette même période, moins de dix cas ont également été déclarés en Alsace, dans la Meuse, en Isère et dans le Tarn.

Tableau 7. Cas de tularémie humaine enregistrés en métropole française de 2002 à 2008 (d'après les données de l'InVS) ⁸⁰

Années	Nombres de cas enregistrés
2002-2003	25
2004	21
2005	23
2006	24
2007	47
1 ^e semestre 2008	72

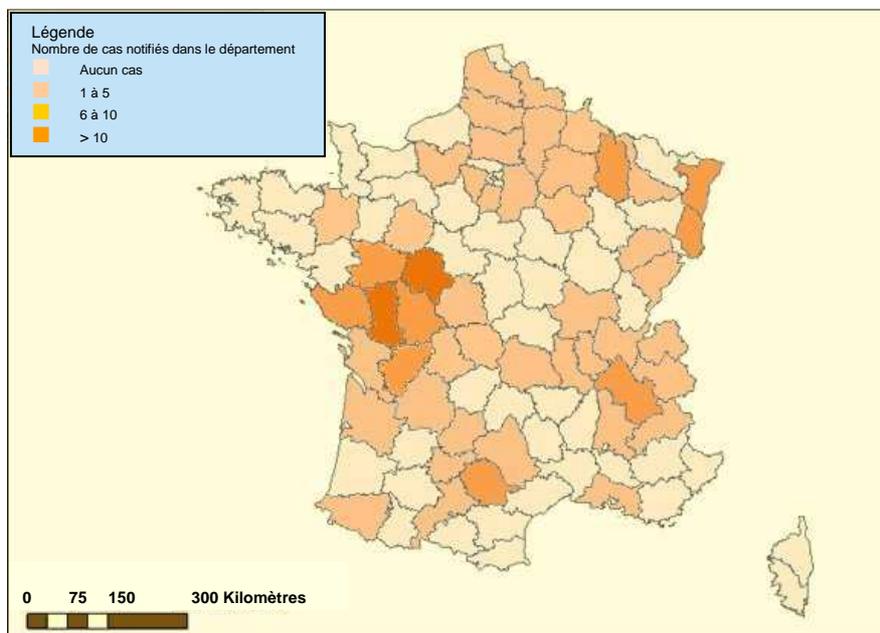


Figure 3. Répartition géographique des cas sporadiques de tularémie humaine en métropole française par département de domicile – Octobre 2002 à mai 2008 (d'après les données de l'InVS) ⁸⁰

II – La tularémie en clinique humaine

II – 1. Manifestations cliniques

Chez l'Homme, la période d'incubation de la tularémie dure de trois à huit jours. La maladie se manifeste par une fièvre ondulante, des frissons, une asthénie, des douleurs articulaires, des céphalées et des vomissements. Il existe différentes formes cliniques de la maladie qui dépendent de la voie d'entrée de la bactérie dans l'organisme (Tableau 8)¹⁵. La sous-espèce *tularensis* provoque des formes sévères avec un taux de létalité de 5 à 15% en l'absence de traitement. La sous-espèce *holarctica* provoque des formes moins sévères avec un taux de létalité d'environ 1% en l'absence de traitement¹.

Tableau 8. Les différentes formes cliniques de la tularémie¹⁵

Forme clinique	Description
Ulcéro-ganglionnaire	Forme la plus fréquente (80% des cas). Transmission consécutive à un contact avec des animaux infectés ou à une piqûre d'insecte. Ulcération au point d'inoculation de l'agent, associée à une adénopathie du ganglion drainant.
Ganglionnaire	Adénopathie régionale sans ulcère.
Oculo-ganglionnaire	Forme rare (moins de 5% des cas). Transmission consécutive à un contact de matériels contaminés avec la conjonctive (éclaboussures, frottement avec des mains contaminées). Lésion unilatérale touchant la paupière inférieure. Conjonctivite purulente parfois accompagnée d'un œdème péri-orbital et d'une adénopathie satellite.
Oro-pharyngée	Forme peu fréquente. Transmission consécutive à l'ingestion d'aliments contaminés (animaux malades, légumes souillés par des déjections d'animaux malades). Angine accompagnée d'une adénopathie cervicale. Possibilité d'évolution vers une forme digestive.
Digestive	Forme rare. Consécutive à l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminée. Gastro-entérite et toxémie. Lésions ulcéreuses du tube digestif accompagnées d'adénites cervicales, pharyngées et mésentériques.
Typhoïdique	Forme septicémique très peu fréquente parfois consécutive à la forme digestive.
Atypiques	Méningites, endocardites, péricardites, pleurésies, péritonites, insuffisances rénales et hépatites.
Pulmonaire	Forme très peu fréquente naturellement. Serait prépondérante dans le cas d'une utilisation agressive et intentionnelle. Transmission consécutive à l'inhalation d'aérosols. Pneumonie avec toux sèche, dyspnée et douleurs thoraciques. Pleurésie accompagnée d'adénopathies péri-hilaires.

II – 2. Diagnostic de laboratoire

Dans le cadre d'examens bactériologiques, la manipulation directe des micro-organismes présente un risque pour le personnel et nécessite des équipements adaptés, tel qu'un laboratoire de niveau de sécurité biologique 3 (NSB3) pour la sous-espèce *tularensis* (Arrêté du 18/07/94). Pour ces raisons, le diagnostic sérologique est privilégié en routine.

II – 2. 1. Diagnostic sérologique

Le diagnostic indirect de la maladie, basé sur la recherche d'anticorps spécifiques dirigés contre *Francisella tularensis*, présente l'avantage d'être moins risqué pour le manipulateur car il évite la mise en culture des micro-organismes. Il est réalisé en première intention et permet de diagnostiquer la majorité des cas en France (70 à 90%). L'antigène est constitué d'une suspension de *Francisella tularensis* stabilisée avec du phénol ou du formol (Becton Dickinson, Difco USA, Bioveta ; Rép. Tchèque). Il peut être utilisé soit pour la réalisation d'un test de dépistage sur lame ou pour la détermination du titre d'anticorps en tube. Les agglutinines (IgM) apparaissent 10 jours après l'infection et atteignent leur titre maximal au bout de deux mois. L'analyse est réalisée sur deux échantillons de sérum : le premier, au début de l'infection et le deuxième, trois semaines plus tard. Une augmentation du titre d'un facteur 4 confirme le diagnostic ⁸¹. Le diagnostic sérologique de *Francisella* est spécifique et présente très peu de réactions croisées et de faux positifs ⁸². Des tests ELISA ont été développés à partir de plusieurs antigènes ^{83, 84}, dont le lipopolysaccharide d'une souche atténuée de *F. tularensis* subsp. *holartica* ⁸⁵, mais aucun test n'a été commercialisé.

II – 2. 2. Diagnostic bactériologique

L'analyse bactériologique peut être réalisée à partir de différents prélèvements pathologiques selon la forme clinique de la tularémie. Il peut s'agir d'écouvillonnages de lésions cutanées, de ponctions ou de biopsies ganglionnaires, d'expectorations, de rinçages pharyngés, de pus de conjonctive ou d'hémocultures. Les prélèvements sont analysés rapidement ou sont stockés à 4°C en cas d'analyse différée ⁸¹.

L'examen bactériologique direct des prélèvements, après coloration de Gram, est difficile compte tenu de la petite taille de la bactérie. La coloration de May-Grünwald Giemsa est mieux adaptée à l'observation de la bactérie en microscopie optique ⁸¹.

L'isolement de *F. tularensis* conduit à un diagnostic de certitude. Néanmoins, sa réussite est conditionnée par la rapidité du traitement des prélèvements et par la nature des milieux de culture ⁸⁶. En pratique, les isolements, réalisés sur des géloses chocolat enrichies avec de l'IsoVitaleXTM (BD) ou du PolyViteXTM (Biomérieux, AES) sont incubés et contrôlés au minimum pendant 10 jours à 37°C en aérobiose ³⁵. Les colonies peuvent apparaître au bout de 48 heures. Les cultures en milieux liquides sont réalisées avec des bouillons thioglycolate, cœur-cerveille (Brain Heart Infusion) ou trypticase soja complétés avec 2% d'IsoVitaleXTM.

Les caractères positifs d'orientation sont l'oxydase négative, la catalase faiblement positive, la nitrate réductase négative et l'uréase négative. Certaines galeries commerciales, de type API[®] (bioMérieux, Genève), conduisent à de fausses identifications de type *Haemophilus influenzae* ou *Actinobacillus* spp.. Certains caractères biochimiques, dont la fermentation de quelques sucres, la présence de l'uréase et de la β -galactosidase, peuvent être révélés à l'aide d'une galerie API[®] NH (bioMérieux, France). Depuis peu, l'identification en quelques heures est possible à l'aide d'automates (Vitek-2[®] et Phoenix[®]). L'agglutination sur lame ou en tube à l'aide d'un immun-sérum spécifiquement dirigé contre *Francisella tularensis* confirmera le diagnostic (Difco - BD) ⁸¹.

II – 2. 3. Diagnostic moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire permettent d'obtenir rapidement une identification présomptive de la bactérie à partir de séquences spécifiques de son ADN génomique. La principale méthode utilisée est la réaction en chaîne de la polymérase (Polymerase Chain Reaction - PCR) qui peut être réalisée directement sur des échantillons biologiques infectés (écouvillonnage, pus, biopsies), sans nécessité de mise en culture préalable, avec une extraction d'ADN adéquate. Elle permet de cibler spécifiquement l'agent infectieux recherché, présent en faible quantité parfois dans un milieu complexe poly-contaminé. Compte tenu de la culture fastidieuse et de la pathogénicité de *Francisella tularensis*, les méthodes d'identification moléculaires sont

particulièrement adaptées à cette bactérie, puisqu'elles évitent la manipulation directe de cultures bactériennes. Toutefois, leur utilisation en routine est limitée en raison de leurs coûts élevés et des problèmes liés à la standardisation des techniques entre les laboratoires.

Plusieurs marqueurs génétiques ont été caractérisés et permettent d'identifier et de discriminer les espèces du genre *Francisella* (Tableau 9 et Tableau 10). Les cibles pour l'identification du genre *Francisella* sont les gènes *fopA* ou *tul4*, qui encodent des protéines membranaires ⁸⁷⁻⁹¹, le gène qui code pour une protéine de 23kDa ⁹² et la séquence d'insertion *ISFtu2* ⁹³. Les cibles pour la discrimination des espèces sont la séquence Ft-M19 ^{51, 94}, la séquence d'insertion *ISFtu2* ⁹⁵, le gène *pdpD* ⁹⁶ et la région RD1 ⁵².

Des études cliniques ont montré l'intérêt de la PCR pour le diagnostic des formes ulcéro-ganglionnaire, oro-pharyngée et oculo-ganglionnaire de la maladie ^{89, 90, 97-100}. L'utilisation de PCR multiplexe pour la détection simultanée d'agents du risque biologique, présents dans un même échantillon, dont *Francisella tularensis*, a également été décrite ^{101, 102}.

Tableau 9. Marqueurs chromosomiques permettant la détection moléculaire du genre *Francisella* par PCR ⁸¹

Marqueurs chromosomiques	<i>F. tularensis</i>			<i>F. novicida</i>	Référence
	<i>tularensis</i>	<i>holarctica</i>	<i>mediasiatica</i>		
<i>ISFtu2</i>	+	+	+	+	93
<i>23kDa</i>	+	+	+	+	92
<i>tul4 (17kDa)</i>	+	+	+	+	91
<i>fopA</i>	+	+	+	+	103

Tableau 10. Marqueurs chromosomiques permettant la discrimination des espèces du genre *Francisella* par PCR ¹⁰⁴

Marqueurs chromosomiques	Taille du produit PCR (paires de bases)				
	<i>F. tularensis</i>			<i>F. novicida</i>	<i>F. philomiragia</i>
	<i>tularensis</i>	<i>holarctica</i>	<i>mediasiatica</i>		
Ft-M19 ⁵¹	250	220	–	250	–
<i>ISFtu2</i> ⁹⁵	390	1249	nt	nt	nt
<i>pdpD-2</i> ⁹⁶	136	–	nt	280	nt
RD1 ⁵²	1522	924	1453	3322	nt

– : pas d'amplification

nt : non testé

Une analyse basée sur l'amplification de courtes séquences génomiques répétées (VNTR – Variable Number Tandem Repeat ou MLVA – Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis) permet de discriminer les isolats en fonction de leur origine et ainsi d'améliorer les recherches épidémiologiques ⁵¹. Cette analyse est basée sur la présence de 25 régions répétées sur le génome de *Francisella*. Le nombre de répétitions et leur position sur le génome varient en fonction de la souche.

Des études épidémiologiques moléculaires sont également possibles en réalisant, à partir de l'ADN génomique, des profils de macrorestriction d'isolats par électrophorèse en champs pulsés.

II – 3. Traitements

II – 3. 1. Traitements prophylactique et curatif

Malgré les efforts destinés à améliorer la prise en charge thérapeutique, l'issue de la tularémie causée par *Francisella tularensis* peut être fatale ou conduire à des complications et à de longues périodes de convalescence. Actuellement, il n'y a pas de vaccin disponible contre la tularémie ; un traitement antibiotique précoce et approprié est donc essentiel ¹⁰⁴.

Francisella tularensis est sensible *in vitro* à de nombreux antibiotiques comme les aminosides (streptomycine, gentamicine) utilisés historiquement dans le traitement de la tularémie. Actuellement, les fluoroquinolones telles que la ciprofloxacine, l'ofloxacine ou la lévofloxacine, sont utilisées en traitement de première intention. Le traitement

de 10 à 14 jours, mais peut être prolongé sur 3 mois jusqu'à la disparition de la réaction ganglionnaire.

On distingue le traitement antibiotique prophylactique post-exposition destiné aux patients ayant pu être exposés à *F. tularensis* et le traitement antibiotique curatif destiné aux patients atteints de la tularémie.

Le [Tableau 11](#) présente les posologies des principaux antibiotiques recommandées pour le traitement prophylactique de la tularémie (selon l'AFSSAPS).

Tableau 11. Antibiotiques et posologies utilisés pour le traitement prophylactique

Antibiotiques	Posologies
Ciprofloxacine	Adulte : 1 g / jour en 2 prises Enfant moins de 15 ans : 20 à 30 mg / kg / jour en 2 prises
Ofloxacine	800 mg / jour en 2 prises
Lévofloxacine	500 mg / jour en 1 prise
Doxycycline ^a	Adulte : 200 mg / 24h en 2 prises Enfant moins de 15 ans : 4 mg / kg / jour en 2 prises

^a traitement alternatif

Le traitement curatif est donné par voie intraveineuse aux mêmes doses que le traitement prophylactique, puis est relayé par le traitement *per os*, lorsque l'état du patient le permet.

Francisella tularensis ne présente pas de résistance naturelle aux antibiotiques utilisés en thérapeutique, tels que les aminoglycosides, la tétracycline, le chloramphenicol et les quinolones. Cependant, elle est naturellement résistante aux pénicillines et aux céphalosporines^{38, 42, 105, 106}. Certaines souches isolées en Europe présentent également une résistance à l'érythromycine non utilisée en thérapeutique.

II – 3. 2. Traitement préventif : la vaccination

Au début du XX^{ème} siècle, devant l'incidence de la maladie, en particulier aux États-Unis et en Union Soviétique, les études pour le développement d'un vaccin contre la tularémie ont commencé dès le début des recherches sur *Francisella*. Des travaux

conduits au cours des années 1930 et 1940 en Union Soviétique ont permis de développer des vaccins à partir de bactéries vivantes atténuées, lesquels semblaient fournir une protection efficace contre la maladie ¹⁰⁷. Les premières vaccinations chez l'homme ont été réalisées en 1942 à partir d'une souche atténuée non virulente ¹⁰⁸, fournissant alors une protection contre l'agent infectieux pendant une période de six mois après vaccination. Après son emploi sur plusieurs milliers d'individus, cette souche a été perdue. Ultérieurement, l'efficacité de plusieurs souches atténuées, dont la « souche 15 » a été évaluée. La vaccination de 950 personnes situées dans une zone endémique a permis de diminuer le taux d'infection dans cette région de 4,3% à 0,36% ¹⁰⁸.

En Russie, plus de 60 millions d'individus ont été immunisés, entre les années 1946 et 1960, grâce à des vaccins vivants atténués ¹⁰⁹. En 1949, les scientifiques soviétiques recommandaient un rappel annuel, puis un rappel tous les 5 ans, afin d'assurer une protection efficace contre la maladie ⁶¹. En 1956, l'un de ces vaccins vivants atténués a été exporté aux États-Unis. Une fois la bactérie isolée, elle a été dénommée *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* LVS pour « Live Vaccine Strain »¹¹⁰. L'évaluation de son efficacité a montré que la souche LVS diminuait l'incidence de la tularémie acquise par voie respiratoire mais n'avait pas d'effet sur la tularémie ulcéro-ganglionnaire ¹¹¹.

La souche LVS, ainsi que d'autres souches atténuées, ont été utilisées pour immuniser des groupes d'individus à risque, comme le personnel de laboratoire. Néanmoins, la souche LVS n'a jamais obtenu de licence par l'Administration Américaine des Denrées Alimentaires et des Médicaments (Food and Drug Administration - FDA), seule habilitée à autoriser la commercialisation des médicaments sur le territoire des États-Unis d'Amérique. En effet, la souche LVS ne protège pas tous les individus vaccinés, son histoire est incertaine et les mutations ayant conduit à son atténuation sont inconnues ⁶¹. En outre, il semble que dans certaines conditions, la culture de la souche LVS puisse conduire à l'obtention d'un variant faiblement immunogène ¹¹⁰.

CHAPITRE III

Les mécanismes de virulence de *Francisella tularensis*

Introduction

Francisella tularensis est une bactérie intracellulaire facultative capable de coloniser les cellules eucaryotes de l'hôte, comme les macrophages et les polynucléaires neutrophiles, mais aussi d'autres cellules non phagocytaires, telles que les hépatocytes et les cellules épithéliales alvéolaires¹¹²⁻¹¹⁴. De nombreuses études ont permis d'identifier des gènes clés impliqués dans la survie intracellulaire de la bactérie. Leurs mutations ont souvent été corrélées à une perte, ou à une atténuation, de la virulence de la bactérie chez la souris. Cependant, les fonctions exactes de ces gènes ne sont pas clairement élucidées et les mécanismes moléculaires mis en œuvre par la bactérie dans la cellule infectée sont mal connus.

Comme chez de nombreux pathogènes intracellulaires, tels que *Coxiella burnetti*¹¹⁵, *Legionella pneumophila*¹¹⁶ ou *Listeria monocytogenes*¹¹⁷, la virulence de *Francisella tularensis* repose sur sa capacité à survivre et à se multiplier dans les cellules phagocytaires. Elle empêche la formation du phagolysosome, s'échappe de la vacuole phagosomale, puis atteint le cytoplasme dans lequel les conditions sont propices à sa croissance. Le passage dans le cytoplasme est une étape essentielle à l'expression de la virulence de *Francisella tularensis*.

L'objectif de ce chapitre est d'introduire la première étude de la thèse consacrée à l'évaluation du rôle de la phosphatase acide AcpA dans la virulence de *F. tularensis* subsp. *tularensis*. Après un rappel sur les principaux mécanismes impliqués dans la réponse des cellules phagocytaires aux infections bactériennes, le devenir de *Francisella tularensis* dans les macrophages sera présenté. Par la suite, les éléments structuraux ou génomiques identifiés

jusqu'à présent pour leur implication dans la croissance intracellulaire ou dans la virulence de la bactérie, seront successivement évoqués.

I – Réponse des cellules phagocytaires aux infections bactériennes

I – 1. Généralités

La réponse immunitaire innée regroupe un ensemble de mécanismes de défense non spécifiques contre les pathogènes déployé par l'hôte immédiatement ou quelques heures après l'exposition à un antigène. Ces mécanismes de défense sont mis en œuvre notamment dans les cellules phagocytaires, comme les macrophages et les polynucléaires neutrophiles. Ces derniers représentent la proportion la plus importante des leucocytes (65%) et constituent la première ligne de défense contre les invasions bactériennes. Leur action bactéricide est plus efficace que celle des macrophages, du fait d'une dégranulation plus rapide et de la présence d'enzymes lysosomales spécifiques ¹¹⁸.

L'activation des cellules phagocytaires est déclenchée *via* des récepteurs spécifiques qui reconnaissent un ensemble de structures microbiennes conservées, tels que le lipopolysaccharide (LPS) chez les bactéries à Gram négatif ou les acides téichoïques chez les bactéries à Gram positif. Les récepteurs sont appelés « Pattern Recognition Receptors » (PRRs) et les structures bactériennes reconnues sont nommées « Pathogen Associated Molecular Patterns » (PAMPs). Parmi les PRRs, il existe les récepteurs « Toll-like » (TLR), dont le TLR2 et le TLR4 qui reconnaissent, entre autres et respectivement, les lipopeptides bactériens (BPL) et le LPS ¹¹⁹. L'activation des récepteurs PRRs déclenche des cascades de réactions enzymatiques intracellulaires conduisant à la production de cytokines pro inflammatoires et à la phagocytose.

La production de cytokines pro inflammatoires, tels que le facteur de nécrose tumorale (Tumor Necrosis Factor α - TNF α) et les interleukines 1 et 6 (IL-1, IL-6) stimule la réaction inflammatoire et la réponse immunitaire spécifique (Figure 4). Elle résulte en partie de l'activation des voies du facteur transcriptionnel NF- κ B et des protéines kinase activées par les mitogènes (Mitogen Activated Protein Kinases - MAP Kinases).

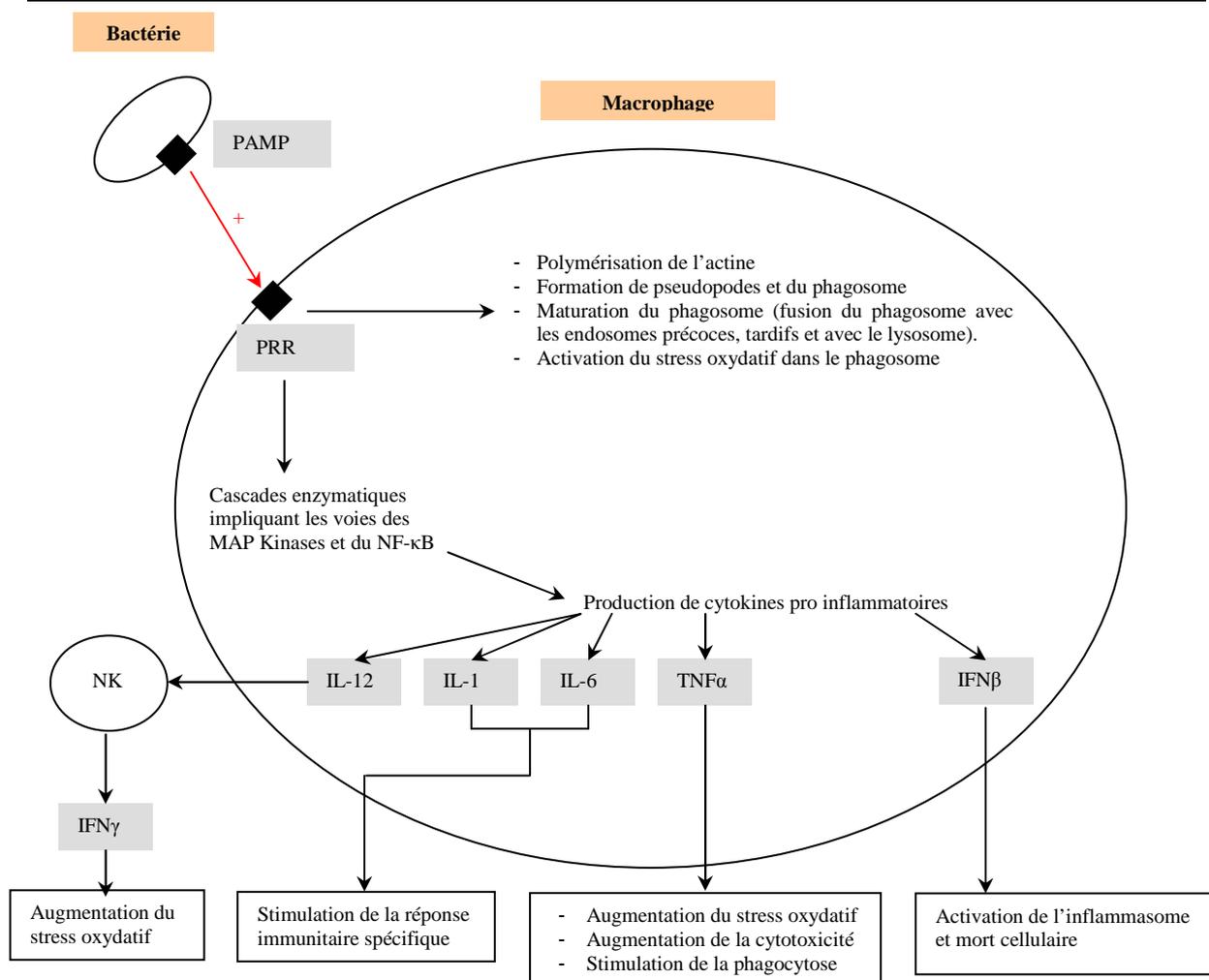


Figure 4. Principaux mécanismes induits lors de l'activation du macrophage par un pathogène. PRR, Pattern Recognition Receptors ; PAMP, Pathogen Associated Molecular Patterns; TLR, Toll-Like Receptor ; IL, Interleukine ; TNFα, Tumor Necrosis Factor α ; IFN, interféron ; NK, lymphocytes T Natural Killer cytotoxiques ; MAP Kinases, Mitogen Activated Protein Kinases.

Suite à la phagocytose, la maturation du phagosome entraîne la destruction des bactéries. Deux principaux mécanismes interviennent : la production de dérivés oxygénés (Reactive Oxygen Species - ROS), *via* le déclenchement du stress oxydant, aussi dénommée flambée respiratoire (respiratory burst) et la libération d'enzymes bactéricides ou de peptides cytotoxiques provenant des lysosomes¹²⁰.

Dans le macrophage, la maturation du phagosome débute par une acidification importante consécutive à l'incorporation dans la membrane de pompes à protons. La composition du milieu interne du phagosome est ensuite modifiée par des interactions successives entre ce dernier et des endosomes précoces, des endosomes tardifs et des

lysosomes jusqu'à former le phagolysosome. Dans ce dernier, les molécules oxydantes, les peptides antibactériens et les hydrolases acides lysosomales conduiront à la destruction de la bactérie ¹²¹⁻¹²³. Chaque étape de fusion avec les endosomes ou avec les lysosomes est induite et caractérisée par le recrutement de marqueurs spécifiques à la surface des endosomes ^{124, 125}.

I – 2. La NADPH oxydase et production de dérivés oxygénés

L'activation des PRRs par les PAMPs déclenche le stress oxydant dans les macrophages et dans les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles. Ce phénomène caractérisé par une consommation importante d'oxygène et de glucose par la cellule ¹²⁰ conduit à la production rapide d'espèces réactives de l'oxygène.

Il y a principalement quatre enzymes qui sont impliquées dans ce mécanisme oxydatif ¹²⁶ : la Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate oxydase (NADPH oxydase), la superoxyde dismutase, la myéloperoxydase et les NO synthases (Figure 5).

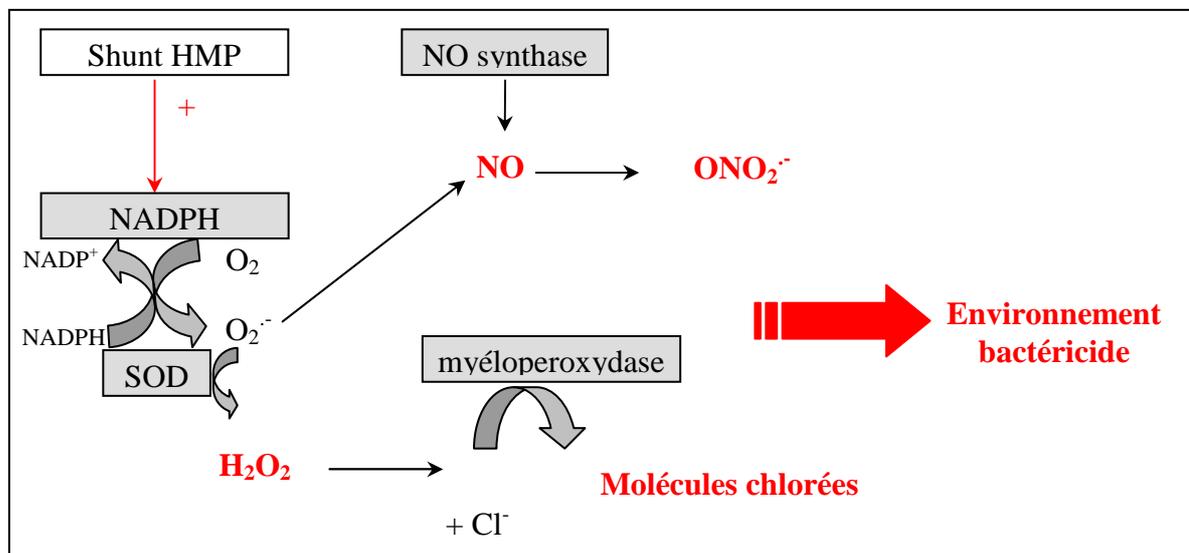


Figure 5. Réactions enzymatiques impliquées dans la production de dérivés oxygénés au cours du stress oxydant dans les cellules phagocytaires. La NADPH-oxydase est activée par le shunt des hexose-monophosphates (HMP) et catalyse la transformation de l'oxygène (O₂) en ion superoxyde (O₂⁻) en présence de NADPH. La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à partir de l'ion superoxyde. La myéloperoxydase (MPO) catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène et des ions chlorures (Cl⁻) en espèces chlorées oxydantes (ion hypochlorite - ClO⁻, chlorures d'amines). Les NO synthases catalysent la formation de monoxyde d'azote (NO), lequel agit avec l'ion superoxyde pour former le peroxyde nitrite (ONO₂⁻)

La NADPH oxydase est l'élément clé de la production de l'ion superoxyde. Son activation nécessite l'assemblage de différentes sous-unités réparties dans le cytoplasme et dans la membrane cellulaire. Le flavocytochrome b_{558} est un hétérodimère formé de deux glycoprotéines (*gp91phox*, *gp22phox*) et la protéine G Rap1A qui sont situés dans la membrane cytoplasmique. Lors de l'activation de la cellule, les protéines *p67phox*, *p47phox*, *p40phox*, et Rac2 localisées dans le cytoplasme sont recrutées vers la membrane cytoplasmique, où elles s'associent au flavocytochrome b_{558} ¹²⁷ (Figure 6). Le recrutement des protéines *phox* nécessite la phosphorylation de *p47phox* par la protéine kinase C^{127, 128}.

Le lieu de production de l'ion superoxyde dépend de la nature de la stimulation des cellules phagocytaires. Une stimulation par des molécules solubles induit l'assemblage de la NADPH oxydase dans la membrane cytoplasmique et une production d'ion superoxyde à l'extérieur de la cellule. Des particules, telles que les bactéries, induisent la formation de l'enzyme dans la membrane du phagosome et une production de molécules oxydantes à l'intérieur de celui-ci¹²⁹⁻¹³¹.

Les protéines du complément et les *N*-formyl méthionyl peptides, tel que le *N*-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP), font partie des stimulants solubles. Les fMLP correspondent à la partie N-terminale de protéines bactériennes et sont couramment utilisés afin d'activer expérimentalement le stress oxydant de macrophages ou de polynucléaires neutrophiles en culture^{132, 133} (Figure 6).

Le phorbol myristate acétate (PMA), analogue structural du DAG, permet également de déclencher expérimentalement la flambée respiratoire^{134, 135} en activant directement la NADPH oxydase *via* la protéine kinase C et sans passer par la voie impliquant le phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP₂) et le phosphatidylinositol 1,4,5-triphosphate (IP₃).

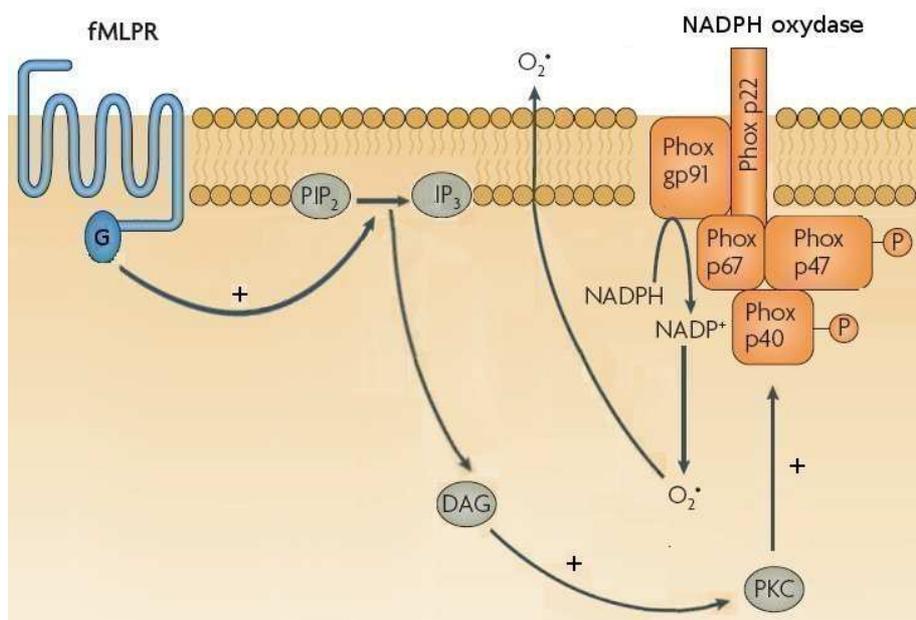


Figure 6. Mécanisme d'activation de la NADPH oxydase par le *N*-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP). L'activation des récepteurs du fMLP (fMLPR) des cellules phagocytaires active une phospholipase C (PLC), *via* une protéine G (G). La phospholipase C catalyse la transformation du phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP₂) en phosphatidylinositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG). Le DAG conduit à l'activation de la protéine kinase C (PKC), impliquée dans la phosphorylation de p47*phox* et de p40*phox*, nécessaire à l'activation de la NADPH oxydase et à la production des ions superoxydes ¹²⁰.

II – Le devenir de *Francisella tularensis* dans le macrophage

De nombreuses études ont été menées afin de mieux comprendre les interactions entre les cellules phagocytaires et *F. tularensis* au cours de l'infection ^{136, 137}. La majorité d'entre elles ont été réalisées à partir de cultures cellulaires de macrophages, lesquels constituent la niche principale de la bactérie *in vivo* ¹³⁷. Ainsi, les différentes étapes de l'infection intracellulaire par *F. tularensis* commencent à être connues, même si les mécanismes moléculaires sont encore mal compris.

La phagocytose de *F. tularensis* par les macrophages est induite par des déterminants bactériens de nature hydrocarbonée (LPS, composants de la capsule...) qui interagissent avec les récepteurs présents à la surface de la cellule. L'infection de macrophages en culture est facilitée par la présence de sérum frais contenant des facteurs du complément ^{125, 138}. Elle est en partie dépendante de l'opsonisation de la bactérie par le facteur C3 (Figure 7).

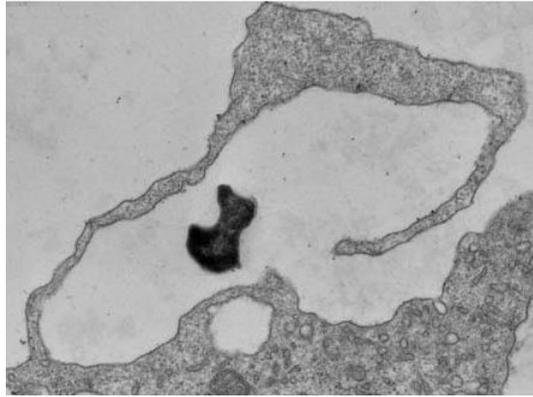


Figure 7. Phagocytose de *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* LVS pré-opsonisée avec 10% de sérum frais humain par des macrophages dérivés de monocytes humains ¹³⁸.

L'implication des opsonines dans la phagocytose de *F. tularensis* est caractéristique d'un mécanisme de capture passif « zipper mechanism ». Ce dernier, décrit notamment chez *Listeria monocytogenes* (Figure 8), est caractérisé par une interaction forte entre les adhésines ou les opsonines présentes à la surface de la bactérie et les récepteurs présents à la surface du macrophage. Au cours de ce mécanisme, un réarrangement modéré du cytosquelette conduit à la formation de petits pseudopodes serrés autour de la bactérie ¹³⁹.



Figure 8. Phagocytose de *Listeria monocytogenes* par les macrophages J774 ¹⁴⁰.

Clemens et collaborateurs ont montré que *F. tularensis* était entourée par de larges pseudopodes formant des boucles asymétriques cours de la phagocytose ¹³⁸ (Figure 7). La formation de larges pseudopodes est généralement spécifique d'un mécanisme actif de pénétration dans le macrophage appelé « trigger mechanism ». Ce dernier, caractérisé par un réarrangement important du cytosquelette de la cellule, a été décrit chez *Shigella flexneri*, chez *Salmonella typhimurium* ¹³⁸ et chez *Legionella pneumophila* ¹⁴¹ (Figure 9).

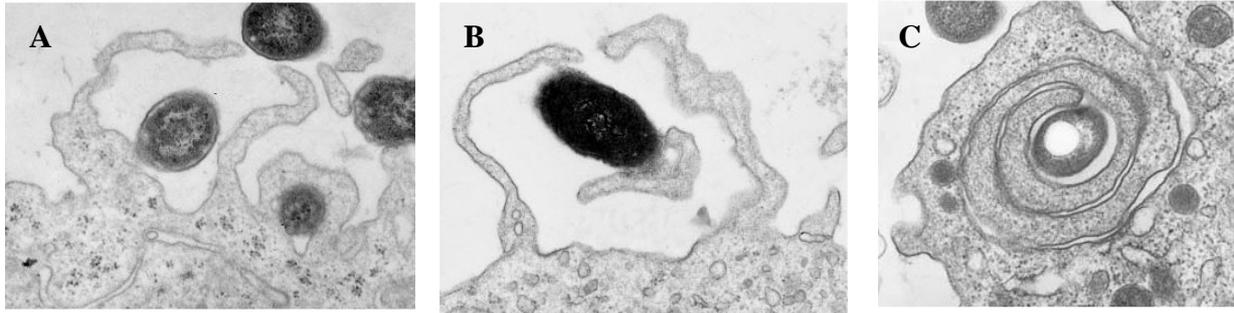


Figure 9. Phagocytose de *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* (A)¹³⁸, de *Shigella flexneri* (B)¹³⁸ et de *Legionella pneumophila*¹⁴¹ par des macrophages dérivés de monocytes humains.

D'après ces différentes études, les facteurs impliqués dans le mécanisme de phagocytose de *F. tularensis* par le macrophage ne sont pas encore bien définis. Malgré le rôle important joué par les opsonines du sérum frais au cours de la capture de la bactérie, il n'est pas exclu que des protéines effectrices impliquée dans le réarrangement du cytosquelette et dans la pénétration active de la bactérie soient transloquées dans la cellule hôte à l'aide de systèmes de sécrétions bactériennes de types III ou IV, comme c'est la cas chez *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* ou *Legionella pneumophila*¹³⁹.

Plusieurs mécanismes de défense développés par *Francisella* afin de survivre dans le macrophage ont été caractérisés. La bactérie inhibe la production d'ions superoxydes par les cellules phagocytaires¹⁴² et empêche l'assemblage de la NADPH oxydase¹⁴³. La maturation des phagosomes contenant la bactérie est incomplète : elle est interrompue après la fusion avec les endosomes tardifs^{125, 144}, lesquels ne fusionnent pas avec les lysosomes. D'après Chon et collaborateurs¹⁴⁵, l'acidification des endosomes précoces induirait l'expression, ou l'activation, de facteurs bactériens nécessaires à la rupture de la membrane du phagosome, cette dernière engendrant une augmentation du pH à l'intérieur de la vacuole, une perte des marqueurs endosomaux¹²⁵ et la libération de la bactérie dans le cytoplasme du macrophage. Dans le cytoplasme, la bactérie se multiplie (Figure 10)¹⁴⁴ et inhibe la production de cytokines pro inflammatoires par le macrophage, dont l'IL-1, le TNF α , l'IL-6 et l'IL-12^{146, 147}. Les mécanismes impliqués dans cette inhibition sont mal connus : ils seraient consécutifs à un blocage des voies de signalisation du NF- κ B et des MAP kinases lorsque la bactérie est présente dans le cytoplasme.

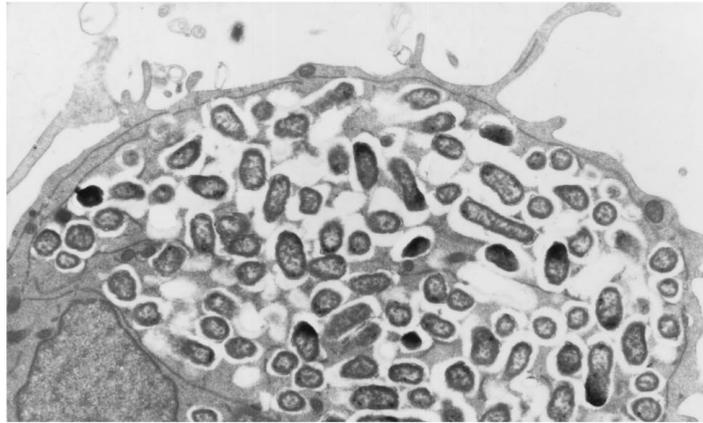


Figure 10. Infection de macrophage de souris J774A.1 par *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* LVS. Présence de nombreuses bactéries dans le cytoplasme de la cellule ¹⁴⁴.

Francisella tularensis déclenche ensuite la mort programmée de la cellule. L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire naturelle qui ne provoque pas d'inflammation, état caractérisé par la formation de vacuoles apoptotiques qui seront à leur tour phagocytées. Deux mécanismes induits par *Francisella tularensis* conduisant à l'apoptose ont été décrits ^{148, 149} : le premier implique la voie intrinsèque de l'apoptose caractérisée entre autres par l'activation des caspases 3 et 9 ; le deuxième implique la voie de l'inflammasome caractérisée par l'activation de la caspase 1 et par la production de cytokines proinflammatoires IL-1 β et l'IL18. D'après une revue récente, la mort provoquée par l'activation de l'inflammasome ne correspond pas à un mécanisme d'apoptose mais de pyroptose ¹⁵⁰. Contrairement à l'apoptose, la pyroptose est un mécanisme de mort inflammatoire, caractérisée par la production de cytokines proinflammatoires et par un rejet de la bactérie à l'extérieur de la cellule.

Les facteurs impliqués dans l'activation de ces deux voies de mort cellulaire ne sont pas encore définis. Dans les deux cas, le déclenchement de la mort programmée de la cellule est conditionné par la présence de la bactérie dans le cytoplasme, puisque les cellules phagocytaires infectées par des mutants séquestrés dans les phagosomes survivent ^{144, 149, 151, 152}.

D'après ces données, il est probable que l'apoptose du macrophage soit bénéfique à la bactérie. En effet, ce mécanisme ne déclenche pas de réaction inflammatoire, la formation de vacuoles apoptotiques renfermant la bactérie et destinées initialement à être phagocytées facilite la dissémination de la bactérie dans les autres cellules phagocytaires. *A contrario*, le mécanisme de mort cellulaire consécutive à l'activation de l'inflammasome est probablement

bénéfique à l'hôte. En effet, ce mécanisme déclenche une réaction inflammatoire qui conduit à une mort rapide du macrophage et au rejet de la bactérie qui l'expose au milieu extérieur et aux défenses de l'hôte. En outre, Weiss et collaborateurs ont récemment suggéré que la bactérie serait capable de retarder l'activation de l'inflammasome, et consécutivement la mort de la cellule ainsi que la stimulation du système immunitaire ¹⁵³.

III – Rôle des polynucléaires neutrophiles

Peu d'études ont été réalisées sur les polynucléaires neutrophiles. Pourtant, ces derniers ont malgré tout un rôle important dans la réponse inflammatoire au cours de la phase aiguë des infections bactériennes ¹⁵⁴; certains pathogènes bactériens du macrophage sont détruits par les polynucléaires neutrophiles, comme *Listeria monocytogenes* ¹⁵⁵, *Shigella flexneri* ¹⁵⁶, ¹⁵⁷ ou *Mycobacterium tuberculosis* ¹⁵⁸.

Le rôle des polynucléaires neutrophiles dans la défense de l'hôte contre la tularémie est controversé. Sjostedt et collaborateurs ont démontré à partir de souris infectées par voie intradermique ou par voie intraveineuse que ces cellules étaient essentielles pour la défense de l'hôte contre une infection par *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS ¹⁵⁹. Tandis que, Conlan et collaborateurs ¹⁶⁰ ont, quant à eux, montré à partir de souris infectées avec cette même souche par voie respiratoire, que les polynucléaires neutrophiles n'étaient pas essentiels à la défense de l'hôte contre la maladie. Plus récemment, Lindgren et collaborateurs ¹⁶¹ ont montré avec cette même bactérie inoculée à des souris par voie intradermique que la production d'espèces réactives d'oxygène et d'espèces réactives de l'azote était essentielle pour la défense de l'hôte contre l'infection.

D'après ces données, la nature des cellules recrutées est différente selon la voie d'inoculation de *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS. Les polynucléaires neutrophiles, dont les défenses antibactériennes reposent sur la production d'espèces réactives de l'oxygène, jouent probablement un rôle important dans la prise en charge de l'infection par voie intradermique et intraveineuse avec cette bactérie, mais ne semblent pas être impliqués dans le contrôle de l'infection par voie respiratoire.

Par ailleurs, Hall et collaborateurs ¹⁶² ont démontré en 2008 que la nature des cellules phagocytaires recrutées dans les poumons de souris, après une infection par inhalation, était différente entre *F. novicida* et l'espèce *F. tularensis* (subsp. *holarctica* LVS et subsp. *tularensis* SCHU S4): *F. novicida* recrute et infecte de manière plus importante les

polynucléaires neutrophiles comparativement aux souches de l'espèce *F. tularensis* et *F. novicida*. Cette caractéristique de *F. novicida* pourrait être liée à la nature de son LPS, dont les propriétés immuno-stimulatrices induiraient un recrutement important des polynucléaires neutrophiles contrairement au LPS de *F. tularensis*¹⁶³.

IV – Les facteurs de virulence de *Francisella tularensis*

IV – 1. La capsule

Francisella tularensis possède une capsule de nature polysaccharidique qui la protège de l'effet bactéricide du sérum^{144, 164, 165} (Figure 11). Les déterminants bactériens de la capsule sont impliqués dans l'activation du macrophage¹⁶⁴. Il a été montré que l'augmentation de la taille de la capsule de la souche LVS, par des cultures successives sur le milieu de Chamberlain, était associée à une augmentation de la virulence de la bactérie chez la souris¹⁶⁶ et des données récentes suggèrent que la synthèse de la capsule soit réprimée dans le macrophage¹⁴⁴. Cependant, aucune étude vraiment détaillée sur la composition de la capsule ou sur la régulation de sa synthèse *in vivo* ou *in vitro* n'a été réalisée.

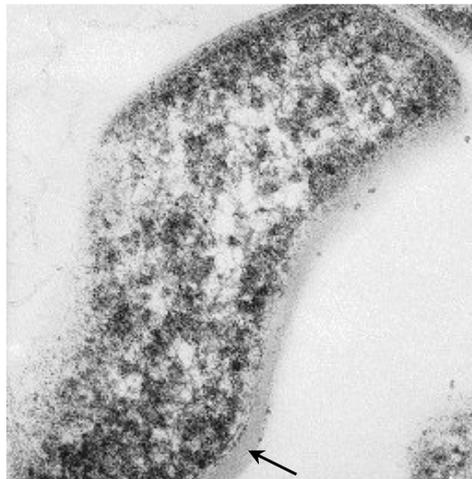


Figure 11. *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 en microscopie électronique à transmission. Grossissement $\times 100K$; la flèche pointe la capsule de la bactérie (Service de microscopie du CRSSA – MC Gentilhomme, MC Valade).

IV – 2. Le lipopolysaccharide

Le lipopolysaccharide (LPS) est une endotoxine et un composant essentiel de la paroi des bactéries à Gram négatif. Il fait partie des PAMPs et active le macrophage par interaction avec les récepteurs TLR4¹¹⁹.

Contrairement aux autres bactéries à Gram négatif, le LPS de *Francisella tularensis* n'est pas endotoxique et n'active pas les cellules *via* les récepteurs TLR4. Il induit la production d'IL-1 et de TNF α , dans les macrophages murins, à un niveau 1 000 fois inférieur à celui induit par le LPS d'*E. coli*^{163, 167-169}. Des études récentes ont identifié des différences structurales entre le LPS d'*E. coli* et celui de *Francisella* qui pourraient expliquer la faible bioactivité de ce dernier^{170, 171}.

Les antigènes O du LPS de *F. tularensis* subsp. *tularensis* et *F. tularensis* subsp. *holarctica* sont identiques, mais l'antigène O du LPS de *F. novicida* est différent¹⁷²⁻¹⁷⁵, ce qui implique des propriétés antigéniques différentes entre ces espèces.

L'antigène O est impliqué dans la survie intracellulaire et dans la virulence chez la souris de *F. novicida* et de la souche LVS¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. Son rôle varie selon les espèces : il est impliqué dans la résistance de *F. novicida* contre l'effet bactéricide du sérum, mais joue un rôle dans la survie intracellulaire de la sous-espèce *tularensis*^{178, 179}.

Le LPS de *Francisella* subit des variations de phase modulées par la séquence d'insertion *ISFtu1*. Ces variations de phases sont caractérisées par une modification de la structure de l'antigène O, qui affecte les propriétés antigéniques du LPS, et par une modification de la structure du lipide A, qui modifie la production de monoxyde d'azote par les macrophages. Ainsi, les variations de phases du LPS de *Francisella* influent sur la croissance et la survie de la bactérie dans le macrophage¹⁸⁰⁻¹⁸².

IV – 3. L'îlot de pathogénicité de *Francisella tularensis*

Par analyse de la séquence génomique de la souche SCHU S4, Nano et collaborateurs ont identifié un îlot de pathogénicité porteur de gènes impliqués dans la croissance intracellulaire et dans la virulence de la bactérie⁹⁶. Cette région, nommée FPI pour « *Francisella* Pathogenicity Island », est constituée de 25 gènes et présente une taille de 33,9 kb (Figure 12). Cet îlot, très conservé d'une espèce à l'autre, est présent en double copie sur le génome de *F. tularensis* et en simple copie sur le génome de *F. novicida*¹⁸³. La régulation des gènes de l'îlot est régie par au moins trois régulateurs transcriptionnels^{184, 185}, par des stress oxydatifs⁹² et par une limitation en fer^{186, 187}.

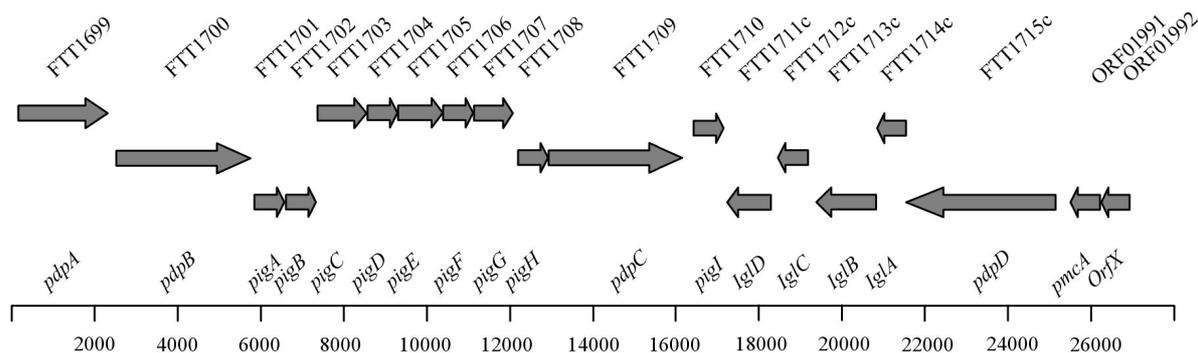


Figure 12. Organisation de l'îlot de pathogénicité de *Francisella* (FPI) (d'après Nano et coll. ¹⁸³). La désignation des gènes, d'après l'annotation du génome de la souche *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4, apparaît au-dessus et les noms des gènes attribués d'après les travaux publiés apparaissent en dessous des flèches.

Les gènes portés par le FPI n'ont pas tous fait l'objet d'études ; néanmoins, les rôles de certains d'entre eux ont été caractérisés.

Les gènes *igl* pour, « Intracellular Growth Locus », sont regroupés sur l'opéron *iglABCD* qui encode quatre protéines : IglA, IglB, IglC et IglD. L'implication de cet opéron dans la croissance intracellulaire de la bactérie a été démontré chez *F. novicida* ^{186, 188-194} et chez les sous-espèces *holarctica* ^{92, 144, 195, 196} et *tularensis* ¹⁹⁷.

La protéine IglC a été la plus étudiée et son rôle dans la croissance intracellulaire et dans la virulence de la bactérie a été démontrée avec *F. novicida* à l'aide de modèles d'infections expérimentales chez la souris *in vitro* et *in vivo* ^{144, 194, 197}. Une étude a également démontré l'implication de cette protéine dans la croissance intracellulaire et dans la survie de la bactérie dans l'amibe *Acanthamoeba castellanii* ¹⁹¹.

Le mécanisme d'action de la protéine IglC commence à être connu. Cette protéine est produite par la bactérie après son entrée dans le macrophage ⁹² et est essentielle à l'évasion de *Francisella* du phagosome. En effet, la mutation du gène *iglC* empêche la libération de la bactérie du phagosome, lequel poursuit alors une maturation normale vers le phagolysosome, conduisant ainsi à la destruction de la bactérie. La protéine IglC est impliquée dans l'inhibition des voies du NF- κ B et des MAP kinases lorsque la bactérie est dans le cytoplasme. Cette inhibition provoque une faible production de TNF α et d'IL-1 par les macrophages infectés et une atténuation de la réponse inflammatoire ¹⁴⁷.

L'implication des gènes *pdp*, pour « Pathogenicity Determinant Protein », dans la croissance intracellulaire et dans la virulence de la bactérie a été démontrée à l'aide de modèles d'infections expérimentales chez la souris *in vitro* et *in vivo*, après la mutation des gènes *pdpA*, *pdpD*^{96, 149, 193} et *pdpB*^{185, 198} chez *F. novicida*.

Ludu et collaborateurs¹⁹³ suggèrent que l'expression du gène *pdpD* est liée à celle des gènes *iglA*, *iglB* et *iglC*. En effet, l'augmentation de la production de la protéine PdpD provoque celle des autres protéines. Les protéines IglA, IglB et PdpB feraient partie d'un système de sécrétion nécessaire à la migration de la protéine PdpD et de la protéine IglC vers la membrane externe de la bactérie.

Les souches de la sous-espèce *holarctica* présentent une mutation au niveau du gène *pdpD* sur les deux copies de l'îlot⁹⁶, ce qui pourrait être l'un des éléments expliquant la différence de virulence entre cette sous-espèce et la sous-espèce *tularensis*.

L'îlot de pathogénicité de *Francisella* est très conservé d'une espèce à l'autre et, lorsqu'il est dupliqué, les deux copies sont identiques entre elles¹⁸³. Les différences identifiées jusqu'à présent entre les espèces sont les suivantes : une mutation dans l'opéron *anmk-pdpD* chez la sous-espèce *holarctica*, une insertion de 48 codons dans le gène *pdpD* de *F. novicida* et la présence de deux codons stop dans le gène *anmK* de la sous-espèce *tularensis*¹⁹³.

IV – 4. Les systèmes de sécrétion

Les bactéries sécrètent de nombreuses protéines présentant diverses fonctions. Ces protéines peuvent contribuer à la biosynthèse de pili ou de flagelles, à l'acquisition de nutriments ou à la biosynthèse de pompes à efflux. La sécrétion de ces protéines à la surface bactérienne implique un transport à travers la membrane interne, le périplasme, puis la membrane externe. Ce transport est assuré par des systèmes de sécrétion. Six systèmes ont été décrits : les systèmes de sécrétion de type I, II, III et IV, les systèmes de sécrétion de type V et les systèmes de sécrétion à deux partenaires¹⁹⁹.

L'analyse de la séquence génomique de la souche SCHU S4 a révélé la présence de gènes orthologues codant pour des systèmes de sécrétion de type IV nécessaires à la sécrétion et à la synthèse de pili⁴⁵. Les gènes *pil* de *Francisella* sont groupés en opérons.

Plusieurs désignations ont été proposées pour ces gènes^{45, 200-202} : *pilNOPQ*, *pilFG* (ou *pilBC*), *pilT*, *pilD*, *pilE₁E₂E₃E₄E₅* (ou *pilAEVE₄E₅*).

La présence de pili et l'implication des gènes *pilT* et *pilF* dans leur synthèse ont été démontrées chez *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS^{200, 201} (Figure 13). Ces études ont également permis de démontrer l'implication des pili dans la virulence de la bactérie chez la souris lors d'une infection par voie intradermique.

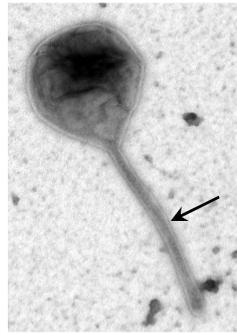


Figure 13. Visualisation par microscopie électronique à transmission d'un pili (flèche) de *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* 278/06. (Service de microscopie du CRSSA – MC Gentilhomme, MC Valade).

Au début des études, les chercheurs supposaient que la protéine PilE₁ était une des sous unités principales de la piline²⁰³, mais il semblerait que cette première hypothèse soit fautive. En effet, chez la plupart des souches de la sous-espèce *holarctica*, dont la souche LVS, les gènes *pilE₁*, *pilE₂* et *pilE₃* sont mutés. La protéine PilE₁ n'aurait pas une fonction structurale, mais serait plutôt impliquée dans la sécrétion des protéines de *Francisella*^{202, 203}.

Par ailleurs, il a été démontré à partir de souches de la sous-espèce *holarctica* que la protéine PilE₁ est nécessaire à la dispersion de la bactérie dans les tissus à partir du point d'inoculation et à sa virulence lors d'une infection par voie sous-cutanée chez la souris²⁰³. Cependant, des résultats opposés ont été obtenus avec *F. novicida*, pour laquelle la mutation des gènes *pilE1* et *pilG* a augmenté la virulence chez la souris lors d'une infection par voie sous-cutanée²⁰². L'explication de ces résultats opposés serait liée à la protéine PepO sécrétée par *F. novicida*, mais dont les gènes sont mutés chez les sous-espèces *holarctica* et *tularensis*. Il s'agirait d'une métalloprotéase impliquée dans la vasoconstriction des vaisseaux sanguins de l'hôte²⁰². Ainsi, l'expression de la protéine PepO par *F. novicida*, favorisant la vasoconstriction des vaisseaux, limiterait la dissémination de la bactérie à partir du point d'infection. La protéine PilE₁ et les protéines PilF, PilG, PilQ, seraient impliquées dans la sécrétion de la protéine PepO. Ainsi, la mutation du gène *pilE₁* de

F. novicida impliquerait un défaut de sécrétion de la protéine PepO, évitant la vasoconstriction des vaisseaux sanguins et favorisant la dissémination de la bactérie. Au contraire, la mutation du gène *pile₁* chez les sous-espèces *holarctica* et *tularensis* n'aurait pas de conséquences sur la vasoconstriction des vaisseaux puisqu'elles ne produisent pas la protéine PepO, mais cette mutation pourrait influencer la sécrétion d'autres facteurs de virulence.

D'après ces hypothèses, la mutation du gène *pepO* chez les sous-espèces *holarctica* et *tularensis* pourrait être une perte évolutive, expliquant leur différence de virulence avec *F. novicida*.

Des études suggèrent qu'il existe également des systèmes de sécrétion de type I chez *Francisella*²⁰⁴. Selon Gil et collaborateurs²⁰⁴, les produits des gènes *tolC* et *ftlC* sont des protéines membranaires impliquées dans l'efflux des antibiotiques et dans la voie de sécrétion de type I, comme la protéine TolC d'*E. coli*. Cette étude a démontré l'implication de la protéine TolC dans la virulence de la souche LVS.

IV – 5. Les régulateurs transcriptionnels des facteurs de virulence

Trois régulateurs transcriptionnels ont été identifiés, dont la protéine MglA (Macrophage Growth Locus), la protéine PmrA et la protéine FevR (*Francisella* Effector of Virulence Regulation).

La protéine MglA a fait l'objet de nombreuses études et son rôle dans la croissance intracellulaire et dans la virulence de la bactérie, à l'aide de modèles d'infections expérimentales chez la souris *in vitro* et *in vivo*, a été montré chez *F. novicida*^{184, 190, 191} et chez *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4¹⁹⁴. Une étude a également montré l'implication de cette protéine dans la croissance intracellulaire de *F. novicida* dans les amibes⁷⁷.

Le gène *mglA*, situé sur l'opéron *mglAB*, est exprimé pendant la phase exponentielle de croissance. La protéine MglA présente 20% d'identité avec la protéine SspA d'*E. coli*, laquelle est un régulateur transcriptionnel de gènes exprimés en réponse à un stress nutritionnel^{184, 205, 206}. La protéine MglA régule l'expression d'une centaine de gènes, dont ceux présents sur l'îlot de pathogénicité^{96, 185, 191, 207} et joue un rôle important dans l'évasion de la bactérie du phagosome et dans la virulence de la bactérie^{92, 149, 194}. Ces résultats

corroborent le fait que cette protéine régule l'expression de gènes présents sur le FPI, dont les protéines IglC et PdpD, elles-même impliquées dans l'évasion de la bactérie du phagosome, dans la croissance intracellulaire et dans la virulence de la bactérie chez la souris. En dehors des gènes présents sur le FPI, la protéine MglA régule l'expression du gène *cds2* et du gène noté FTT0989, lesquels sont également impliqués dans la croissance intracellulaire et dans la virulence de la bactérie ¹⁸⁵.

Récemment, un gène codant pour une protéine désignée SspA a été identifié sur le génome de la souche SCHU S4 ⁴⁵. Charity et collaborateurs ont démontré chez *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS que les protéines MglA et SspA interagissent entre elles pour initier la transcription de facteurs de virulence de la bactérie ²⁰⁸.

Le deuxième régulateur transcriptionnel identifié chez *F. novicida* est codé par le gène *pmrA* ²⁰⁹. Mohapatra et collaborateurs ont démontré que la protéine PmrA de *F. novicida* régule l'expression de 65 gènes, dont certains gènes présents sur de l'îlot de pathogénicité.

Enfin, une étude récente a permis d'identifier un troisième régulateur transcriptionnel chez *Francisella*, codé par le gène *fevR*. Brotcke et collaborateurs ²¹⁰ ont démontré à l'aide de modèles d'infections expérimentales chez la souris *in vitro* et *in vivo* que le gène *fevR* était impliqué dans la virulence et dans la croissance intracellulaire de *F. novicida*. Il régule l'expression de facteurs de virulence, dont certains sont présents sur l'îlot de pathogénicité. L'expression du gène *fevR* est elle-même régulée positivement par la protéine MglA.

IV – 6. Les autres gènes impliqués dans la virulence de *Francisella*

Les gènes *tul4* ¹⁹⁰, *minD* et l'opéron *valAB* sont impliqués dans la survie de la bactérie dans le macrophage et dans la virulence chez la souris ^{211, 212}. La protéine MinD aurait un rôle de pompe pour les ions toxiques, contribuant ainsi à la survie de la bactérie dans le macrophage ²¹¹. L'opéron *valAB* coderait pour des protéines de transport du système de sécrétion de type I et serait impliqué dans la résistance de la bactérie contre l'effet bactéricide du sérum ²¹², ainsi que dans l'assemblage du LPS ²¹³.

Gray et collaborateurs ont montré que la croissance intracellulaire de la bactérie dans le macrophage était affectée par la mutation de trois gènes, présentant des homologies avec l'alanine racémase, la protéase ClpB et une enzyme de biosynthèse des purines ¹⁸⁹.

Le gène *dsb* (disulfide bond formation) est impliqué dans la survie de la bactérie dans le cytoplasme et dans la virulence chez la souris^{198, 214, 215}.

Les gènes *katG* et *sodB* codant pour une catalase-péroxydase et pour une superoxyde dismutase jouent un rôle dans la résistance de la bactérie au peroxyde d'hydrogène et dans la virulence de la bactérie^{216, 217}.

Le gène FTT0918 codant pour une protéine membranaire aux fonctions inconnues est impliqué dans la virulence de *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4¹⁹⁷ chez la souris infectée par voie intradermique. Le gène FTT0918 de la souche vaccinale LVS présente une mutation spontanée, qui pourrait être un des facteurs expliquant l'atténuation de cette bactérie par rapport à *F. tularensis* subsp. *tularensis*²¹⁸.

Les gènes *pur* sont impliqués dans la biosynthèse des purines et leurs mutations ont conduit à l'atténuation de la virulence de *F. novicida* et de *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS chez la souris infectée par voie intrapéritonéale^{219, 220}. Bien que ces gènes ne soient pas directement des facteurs de virulence, ils sont nécessaires à la synthèse des acides nucléiques et participent au développement de la bactérie.

Les gènes FTT0748 et FTT0584 sont impliqués dans la virulence de *F. novicida* et retarderaient l'activation de l'inflammasome et la mort du macrophage.

L'opéron *fslABCD*, dont l'expression est sous le contrôle du répresseur Fur a été mis en évidence chez la souche *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 et chez *Francisella novicida*^{186, 221-223}. Cet opéron est impliqué dans la production de sidérophores nécessaires à la capture du fer par la bactérie. Les sidérophores sont considérés comme des facteurs de virulence des bactéries intracellulaires²²⁴.

IV – 7. Les phosphatases acides

Les phosphatases acides (ACPs), regroupées sous le code EC 3.1.3.2, sont des enzymes qui catalysent à pH acide (pH 5 à 6) l'hydrolyse des phosphomonoesters (Figure 14).

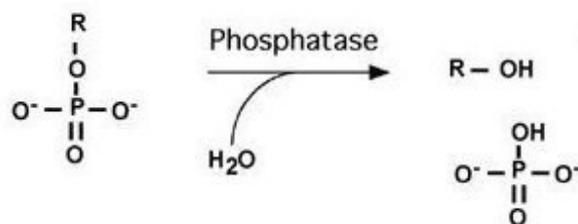


Figure 14. Hydrolyse d'un phosphomonoester catalysée par une phosphatase. R : radical.

Ces enzymes, décrites et caractérisées chez des organismes eucaryotes ²²⁵ et procaryotes, sont impliquées dans l'assimilation de phosphate inorganique ou dans des fonctions métaboliques, telles que des mécanismes de régulation, de production d'énergie ou de transduction de signaux intracellulaires. La famille des phosphatases acides (EC 3.1.3.2) est constituée de nombreux sous-groupes ²²⁶ classés selon leur spécificité de substrats, leur poids moléculaire et leur sensibilité à des inhibiteurs connus ¹⁴².

Parmi les sous-groupes décrits figurent les phosphatases acides de haut poids et de bas poids moléculaire, les phosphatases acides spécifiques de la phosphothréonine ou de la phosphosérine, des phosphatases acides pourpres et les phosphatases acides bactériennes non spécifiques (Tableau 12). Ces dernières sont constituées de protéines solubles périplasmiques ou de lipoprotéines liées à la membrane ²²⁷.

Tableau 12. Caractéristiques des principaux sous-groupes de phosphatases acides (ACPs).

Sous-groupes d'ACPs	Caractéristiques	Références
ACPs de bas poids moléculaire	Poids moléculaire :	14-18 kDa
	Spécificité de substrats :	Faible
	Inhibition par les ions tartrates :	Non
	Inhibition par les ions fluorures :	Non
ACPs de haut poids moléculaire	Poids moléculaire :	40-60 kDa
	Spécificité de substrats :	Large
	Inhibition par les ions tartrates :	Oui
	Inhibition par les ions fluorures :	Oui
ACPs spécifiques de la phosphothréonine ou de la phosphosérine	Inhibition par l'acide okadaïque :	Oui
	Cations divalents requis :	Oui
Acps pourpres ^a	Coloration pourpre en solution :	Oui
	Cofacteurs métallique requis :	Oui
ACPs bactériennes non spécifiques Classe A	Poids moléculaire :	Faible
	Spécificité de substrats :	Large
	Inhibition par les ions tartrates :	Oui
	Inhibition par les ions fluorures :	Oui
	Cations divalents requis :	Non
ACPs bactériennes non spécifiques Classe B	Poids moléculaire :	Faible
	Spécificité de substrats :	Large
	Inhibition par les ions tartrates :	Non
	Inhibition par les ions fluorures :	Non
	Cations divalents requis :	Oui

^a coloration pourpre en solution due à un centre fer à deux atomes ou à un centre fer-zinc

Certains membres de la famille des phosphatases acides se sont révélés être des facteurs de virulence de microorganismes pathogènes. Par exemple, les ACPs décrites chez *Legionella micdadei*¹¹⁶, chez le pathogène intracellulaire obligatoire *Coxiella burnetii*²²⁸, chez le parasite intracellulaire *Leishmania donovani*²²⁹ et chez des entérobactéries telles que *Yersinia* spp.^{230, 231} et *Salmonella enterica* ser. *thyphimurium*²³² inhibent le stress oxydant des cellules phagocytaires par la déplétion intracellulaire de l'IP₃ et du DAG. *Mycobacterium tuberculosis* possède également une phosphatase acide, impliquée dans la déplétion de l'IP₃ provoquant l'inhibition de la maturation du phagosome²³³⁻²³⁵.

Chez les bactéries du genre *Francisella*, l'existence d'une phosphatase acide capable d'inhiber le stress oxydant des polynucléaires neutrophiles a été démontrée en 1996¹⁴². Plus récemment, l'analyse de la séquence du génome de la souche *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4, a confirmé la présence du gène *acpA* (FTT0221) et a révélé celle de trois autres gènes codant trois des phosphatases acides : *acpB* (FTT0156), *acpC* (FTT0620) et *hap* (FTT1662c)^{45, 236}.

De nombreuses études ont été réalisées sur l'AcpA. En effet, ses propriétés biochimiques ont été caractérisées, son gène a été séquencé, son rôle dans la virulence de *Francisella novicida* a fait l'objet de plusieurs évaluations et sa structure tridimensionnelle a été déterminée. Assez peu de données sont disponibles sur les trois autres phosphatases acides de *Francisella*, dont les activités enzymatique sont minoritaires comparativement à l'AcpA²³⁷.

IV – 7. 1. Les caractéristiques biochimiques et structurales de la phosphatase acide AcpA de *Francisella*

L'AcpA a été identifiée, caractérisée et séquencée à partir de la souche avirulente *F. tularensis* ATCC 6223. L'AcpA de cette souche présente une activité enzymatique phosphatase acide particulièrement élevée¹⁴². L'enzyme a été purifiée à partir d'extraits bruts de broyats de cultures sur gélose CHA enrichie avec de l'hémoglobine. L'AcpA présente un poids moléculaire de 57 kDa, un pH isoélectrique de 9,2 et un pH optimal de 6,0. Elle possède une large spécificité de substrats et catalyse la déphosphorylation de la plupart des phosphomonoesters, tels que l'inositol 1-phosphate, l'adénosine monophosphate (AMP) et le NADP. L'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et le phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP₂) sont faiblement hydrolysés¹⁴².

Le clonage et le séquençage du gène *acpA* de *F. novicida* a permis de déduire la séquence primaire de l'AcpA (Annexe I). Par analyse de cette séquence protéique, Reilly et collaborateurs ont identifié un peptide signal de 21 résidus en N-terminal de la protéine, signature de la sécrétion de l'enzyme. La présence de l'enzyme dans le périplasma de la bactérie a été confirmée ultérieurement²³⁶.

L'analyse physicochimique de l'AcpA de *F. tularensis* a révélé le caractère unique de cette enzyme comparativement aux phosphatases acides des autres pathogènes intracellulaires¹⁴². En effet, la séquence nucléotidique ne présente aucune similarité avec celles des phosphatases acides déjà décrites et les caractéristiques biochimiques de l'enzyme ne correspondent pas à celles des familles d'ACPs connues. L'AcpA, présentant un poids moléculaire de 57 kDa, n'appartient pas à la famille des ACPs de bas poids moléculaire. Par ailleurs, elle n'appartient ni à la famille des ACPs de haut poids moléculaire, ni à celle des ACPs bactériennes non spécifiques, car elle est résistante aux ions tartrates et aux ions fluorures¹⁴² et elle ne requiert pas de cations divalents (absence d'inhibition de son activité catalytique en présence d'EDTA). L'AcpA n'est pas un membre de la famille des ACPs spécifiques de la phosphothréonine ou de la phosphosérine car elle n'est pas sensible à l'acide okadaïque. Enfin, cette enzyme n'appartient pas à la famille des ACPs pourpres car aucun cofacteur métallique n'a pu être mis en évidence.

Après la caractérisation de la phosphatase acide de *F. tularensis*, l'enzyme de *F. novicida* a été produite chez *E. coli* afin d'en obtenir des quantités suffisantes pour déterminer sa structure tridimensionnelle et pour évaluer son potentiel vaccinal²³⁸. La détermination et l'analyse de la structure de l'AcpA ont confirmé le caractère unique de l'enzyme en termes de repliement global et d'architecture du site actif comparativement aux ACPs connues²³⁹ (Figure 15). La structure de l'enzyme recombinante présente des similarités avec la superfamille des phosphatases alcalines (AlkP). L'analyse de Felts et collaborateurs indique que le site catalytique de l'AcpA de *F. novicida* requiert un ion métallique (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} ...) contrairement à ce qu'avaient démontré Reilly et collaborateurs avec l'AcpA de *F. tularensis*¹⁴². D'ailleurs, 25% de l'activité de l'AcpA de *F. novicida* est inhibée en présence d'EDTA²³⁸, contrairement à celle de l'AcpA de *F. tularensis*¹⁴², indiquant que les mécanismes d'action de ces deux enzymes ne sont peut-

La double activité de l'AcpA de *Francisella tularensis* a été corroborée par l'analyse de la séquence protéique de l'enzyme. En effet, cette dernière a révélé une similarité partielle avec la séquence de la phosphatidylcholine phospholipase de *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie à Gram négatif¹⁴². La PLC de *Pseudomonas aeruginosa* est l'enzyme type représentative d'une nouvelle superfamille des PLC/phosphatases, parmi laquelle sont classées les phospholipases de *Mycobacterium tuberculosis*, de *Bordetella* spp., et de *Burkholderia pseudomallei*^{239, 240}. D'après Stonehouse et collaborateurs²⁴⁰, les membres de la superfamille des PLC/phosphatases possèdent deux mécanismes catalytiques distincts pour l'activité PLC et pour l'activité ACP. L'AcpA de *F. tularensis*, présentant une activité 1 000 fois supérieure à l'activité PLC, est la seule ACP de la famille des PLC/phosphatases¹⁴².

Le mécanisme catalytique de la PLC de *Pseudomonas aeruginosa* a été caractérisé. Il est différent de ceux des PLCs déjà décrites chez les bactéries à Gram positif, dont les phospholipases de *Listeria monocytogenes*, de *Bacillus cereus* et de *Clostridium perfringens*. En effet, les activités catalytiques de ces dernières sont augmentées en présence d'ion zinc et affectées par la présence d'EDTA, contrairement à celle de la PLC de *Pseudomonas aeruginosa*, qui est inhibée par ces ions et insensible à l'EDTA²⁴⁰. L'activité catalytique phospholipase C de l'AcpA de *Francisella tularensis* présente ces mêmes caractéristiques¹⁴², indiquant que cette enzyme a probablement un mécanisme catalytique proche de celui de la PLC de *P. aeruginosa*.

Comme les ACPs, les PLC sont présentes dans les cellules eucaryotes et dans les cellules procaryotes²⁴⁰. Ces enzymes jouent divers rôles dans le métabolisme et dans la virulence de certaines bactéries pathogènes^{241, 242}. Elles sont notamment impliquées dans la cytolysse des cellules eucaryotes, dans la libération de phosphate inorganique ou dans la perturbation des signaux intracellulaires des cellules eucaryotes²⁴¹. L'alpha-toxine de *Clostridium perfringens*, facteur principal de la gangrène gazeuse²⁴⁰, est la PLC la plus toxique connue²⁴¹. La PLC de *L. monocytogenes*, la listeriolysine, est impliquée dans la rupture de la membrane lors de la propagation de la bactérie de cellules en cellules, il s'agit d'une métalloprotéase à zinc²⁴⁰. La PLC de *Mycobacterium tuberculosis* est impliquée dans la virulence de la bactérie²⁴³. La PLC de *Pseudomonas aeruginosa*, la plus proche de l'AcpA de *Francisella tularensis*, est impliquée dans l'agrégation des plaquettes²⁴⁴ et dans l'inhibition du stress oxydant des polynucléaires neutrophiles²⁴⁵. En

effet, Terada et collaborateurs ont montré que la PLC de *Pseudomonas aeruginosa* inhibait le stress oxydant lorsque les polynucléaires neutrophiles étaient activés par le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) mais n'inhibait pas cette réaction lorsque les cellules étaient activées avec le peptide chimio-attractant fMLP.

IV – 7. 2. Rôle des phosphatases acides dans la virulence de *Francisella novicida*

IV – 7. 2. 1. Rôle de l'AcpA

L'AcpA de *Francisella tularensis* est impliquée dans l'inhibition de la production d'ion superoxyde par les polynucléaires neutrophiles ¹⁴². Le stress oxydant est inhibé lorsque les cellules sont préalablement activées par le fMLP ou par le PMA. L'activation de la NADPH oxydase par le fMLP implique la voie des inositols phosphates, alors que l'activation par le PMA est indépendante de cette voie. L'AcpA n'agit donc pas sur les voies des inositols phosphates, mais sur une voie commune aux deux mécanismes d'activation. Cette hypothèse est confortée par la faible affinité de l'enzyme vis-à-vis du PIP₂ et de l'IP₃. Cette caractéristique démarque l'AcpA des ACPs de *Legionella micdadei* ¹¹⁶, de *Coxiella burnetii* ²²⁸ et de *Leishmania donovani* ²²⁹ qui inhibent le stress oxydant du polynucléaire neutrophile uniquement lorsque les cellules sont activées par le fMLP ^{116, 228, 229}.

Le mécanisme d'inhibition du stress oxydant par l'AcpA de *Francisella* n'est pas encore élucidé. L'enzyme, présentant une large spécificité de substrats, pourrait intervenir dans l'hydrolyse intracellulaire de messagers secondaires, tels que le NADPH ou le ribose 5'-phosphate impliqués dans l'activation du macrophage ou du polynucléaire neutrophile ou dans l'hydrolyse de substrats exposés à la surface des cellules phagocytaires, jouant un rôle dans la transduction du signal nécessaire à l'activation de la chaîne respiratoire ou à son maintien ¹⁴². Récemment, Mc Caffrey et collaborateurs ont démontré que la souche LVS inhibait l'assemblage des sous-unités de la NADPH oxydase. Les auteurs suggèrent que l'AcpA soit impliquée dans ce mécanisme, mais ceci n'a jamais été démontré ¹⁴³.

D'après les études réalisées à partir de modèles d'infection chez la souris, l'implication de l'AcpA dans la virulence de *F. novicida* est controversée. Baron et

collaborateurs ont montré que la mutation partielle du gène *acpA*, correspondant à une délétion de 162 résidus de la région C-terminale de la protéine, n'avait d'effets ni sur la croissance intracellulaire de la bactérie dans les macrophages J774.1, ni sur la virulence chez la souris ²⁴⁶. Dans cette étude, la virulence a été évaluée à partir de souris infectées avec 2 000 UFC par voie intrapéritonéale. Les souris infectées avec la souche sauvage ou avec la souche mutée ont toutes présenté les symptômes de la tularémie et aucune différence n'a été détectée dans les quantités de bactéries dénombrées dans les rates de souris infectées par la souche sauvage ou par la souche mutée.

Plus récemment, Mohapatra et collaborateurs ont montré que la délétion totale du gène *acpA* conduisait à la diminution de la croissance intracellulaire de *F. novicida* et à une atténuation de la virulence de la bactérie chez la souris ²³⁷.

La croissance intracellulaire a été mesurée à partir de cultures de macrophages murins J774.1, de macrophages alvéolaires de rat NR8383 et de macrophages humains THP-1, préalablement activés avec le PMA. Après 12 heures d'infection, la population intracellulaire du mutant $\Delta acpA$ était inférieure d'un demi-log à celle de la souche sauvage ²³⁶. D'autre part, le mutant $\Delta acpA$ a été séquestré dans les phagosomes, contrairement à la bactérie sauvage. En effet, après 12 heures d'infection, 80% des bactéries ont persisté dans les phagosomes des cellules J774.1, alors que toutes les bactéries sauvages s'en étaient libérées, et 74% des mutants ont été retenus dans les phagosomes des cellules THP-1 activées, contre 40% pour la souche sauvage. La virulence a été évaluée à l'aide de souris infectée avec 100 UFC par voie intrapéritonéale. Un retard de mortalité a été observé chez les souris infectées avec le mutant $\Delta acpA$ comparativement à celles infectées avec la souche sauvage au cours des 72 premières heures qui suivent l'infection (Figure 17).

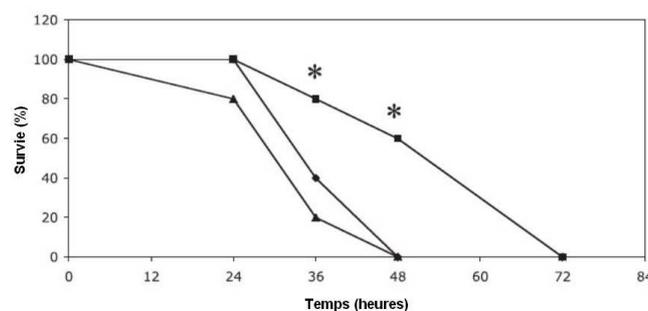


Figure 17. Relevé de mortalité des souris BALB/c après inoculation par voie intrapéritonéale de *F. novicida* sauvage (◆), déficient en AcpA (■) et déficient en AcpA et complétementé avec le pKK214(*groEL-acpA*) (▲) (d'après Mohapatra et coll. 2007 ²³⁶).

Cette étude a démontré que l'AcpA de *F. novicida* est impliquée dans la survie intracellulaire et dans la libération de la bactérie du phagosome vers le cytoplasme au cours des premières heures de l'infection. D'après les auteurs, l'activité phospholipase C de l'AcpA catalyserait l'hydrolyse des phospholipides de la membrane phagosomale, conduisant à sa rupture et à la libération de la bactérie dans le cytoplasme. Ainsi, la mutation du gène *acpA* aurait conduit à la séquestration du mutant $\Delta acpA$ dans les phagosomes et à la diminution de la croissance intracellulaire de la bactérie.

IV – 7. 2. 2. Rôle des quatre phosphatases acides

La dernière étude évaluant le rôle des phosphatases acides dans la virulence de *F. novicida* a été réalisée en 2008²³⁷. Au cours de cette étude, les quatre phosphatases acides, AcpA, AcpB, AcpC et Hap, ont été mutées de manière à obtenir de simples mutations, ou des combinaisons de double, de triple ou de quadruple mutations. Cette étude a confirmé que l'AcpA était à l'origine de plus de 80% de l'activité phosphatase acide mesurée (Figure 18).

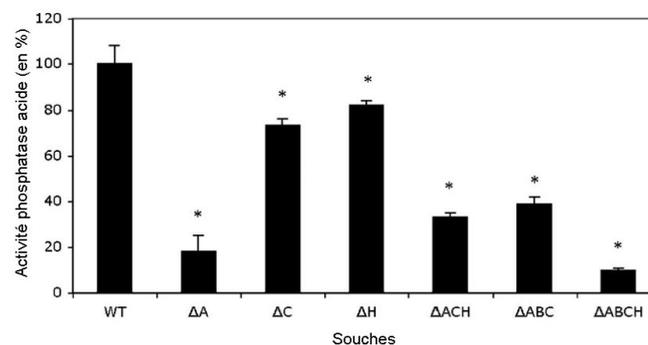


Figure 18. Activités phosphatases mesurées à partir d'extraits cellulaires de *F. novicida* et de six mutants (d'après Mohapatra et coll. 2008²³⁷). Dosage fluorométrique par hydrolyse du difluorométhylumbelliferyl phosphate (DiMUP). Résultats exprimés en pourcentage par rapport à l'activité phosphatase acide mesurée pour la souche sauvage (WT). A : *acpA*, B : *acpB*, C : *acpC*, H : *hap*.

D'après l'étude de l'expression des gènes au cours de l'infection intracellulaire, seules l'AcpA et l'Hap étaient exprimées dans les macrophages humains THP-1 préalablement activés avec le PMA. D'autre part, les mutations des gènes *acp* ont conduit à une diminution de la croissance intracellulaire des mutants dans les macrophages murins J774.1 et humains THP-1. Les croissances intracellulaires ont particulièrement été affectées pour le quadruple mutant $\Delta ABCH$ et les triples mutants

ΔACH et ΔABH , pour lesquels les populations bactériennes dénombrées dans le macrophage ont été inférieures de 3 log à celle de la souche sauvage après 24 heures d'infection.

La virulence a été évaluée chez des souris infectées par instillation nasale avec des doses de 10^3 ou de 10^6 UFC. Les souris infectées à une dose de 10^3 UFC avec les simples mutants $\Delta acpA$, $\Delta acpB$ et Δhap , le double mutant ΔAH et le triple mutant ΔABC ont succombé au cours des 10 premiers jours qui suivirent l'infection. A cette dose, seules les souris infectées avec le double mutant ΔCH , le triple mutant ΔACH et le quadruple mutant $\Delta ABCH$ ont survécu jusqu'à 9 semaines après l'infection. A une dose 10^6 UFC, seules les souris infectées avec le quadruple mutant $\Delta ABCH$ ont survécu jusqu'à 9 semaines après l'infection et un retard de mortalité a été observé chez les souris infectées avec les mutants ΔCH et ΔACH . Dans cette étude, la vaccination avec la souche atténuée $\Delta ABCH$ a permis de protéger des souris contre une dose de 10^6 UFC administrée par voie intranasale.

D'après ces travaux, les ACPs de *F. novicida* contribuent à la croissance intracellulaire de la bactérie et à sa virulence chez la souris et l'atténuation de la souche a particulièrement été marquée après la mutation des quatre enzymes.

IV – 7. 3. Différences d'expression de l'AcpA chez les espèces de *Francisella*

Reilly et collaborateurs¹⁴² ont constaté des différences entre les valeurs d'activités phosphatase acide mesurées dans des extraits bruts provenant de différentes espèces de *Francisella* (Tableau 13).

Tableau 13. Comparaison des activités phosphatase acide mesurées à partir de plusieurs souches de *Francisella* (d'après Reilly et coll. 1996¹⁴²). Activité enzymatique mesurée à partir d'extraits bruts, dont la concentration en protéine a été ajustée à 1 mg.mL⁻¹. Dosage fluorimétrique par hydrolyse du 4-méthylumbelliferyl phosphate (MUP). Une unité d'activité enzymatique est définie par la quantité d'enzyme requise pour hydrolyser une nmole de substrat par heure.

Souche	Activité spécifique phosphatase acide
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> (ATCC 29684)	100
<i>F. novicida</i>	1729
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> LVS	3087
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> B-38 (ATCC 6223)	18138

D'autre part, Reilly et collaborateurs ont constaté une réduction de l'activité enzymatique spécifique de la souche ATCC 6223 après des repiquages successifs sur milieu gélosé CHA¹⁴², indiquant que l'activité peut être modulée par des variations des conditions environnementales.

En 2001, le protéome de *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS a été comparé à ceux de souches provenant d'isolats cliniques, par analyse de leurs profils d'expression protéique par électrophorèse en deux dimensions²⁴⁷. Parmi les protéines présentes dans les extraits des souches sauvages, mais absentes de celui de la souche LVS, a figuré une phosphatase acide de 56,1 kDa correspondant à l'AcpA. D'après les auteurs, la souche LVS ne produit pas cette enzyme.

En 2004, les protéomes des trois sous-espèces *tularensis*, *holarctica* et *mediasiatica* ont été comparés par la même technique²⁴⁸. Les analyses ont été réalisées à partir de cinq souches de la sous-espèce *tularensis*, de cinq souches de la sous-espèce *holarctica* et de trois souches de la sous-espèce *mediasiatica*. D'après leurs résultats, une phosphatase acide de 57 kDa, correspondant à l'AcpA, a uniquement été produite par les souches appartenant aux sous-espèces *tularensis* et *mediasiatica*, mais pas par les souches de la sous-espèce *holarctica*.

Le [Tableau 14](#) présente tous les gènes et facteurs de virulence, mentionnés dans ce chapitre, ainsi que leurs fonctions.

Tableau 14. Récapitulatif des facteurs de virulence identifiés chez les souches du genre *Francisella*

Facteurs	Fonction	Références
Capsule	Capsule de nature polysaccharidique Protection contre l'effet bactéricide du sérum	144, 164, 165
LPS	Lipopolysaccharide non-endotoxique impliqué dans la survie intracellulaire et dans la virulence chez la souris	34, 168, 169, 176- 178
<i>pilT</i> <i>pilF</i>	Gènes nécessaires à la synthèse de pili et à l'expression de la virulence	201
<i>pilE₁</i> <i>pilG</i>	Protéines de sécrétion nécessaires à la virulence la sous-espèce <i>holarctica</i> , mais dont la mutation diminue celle de <i>F. novicida</i>	202, 203
<i>pepO</i>	Protéase sécrétée qui diminue l'invasion et la virulence de <i>F. novicida</i>	202
<i>tolC</i> <i>fljC</i>	Protéines membranaires impliquées dans l'efflux des antibiotiques et dans la voie de sécrétion de type I.	204
<i>mglA-B</i>	« Macrophage Growth Locus » Régulateur transcriptionnel de plus de 100 gènes, dont ceux présents sur l'îlot de pathogénicité. Nécessaire à la libération de la bactérie dans le cytoplasme et à l'expression de la virulence	92, 149, 185, 194
<i>acpA</i> <i>acpB</i> <i>acpC</i> <i>Hap</i>	Inhibition de la flambée respiratoire par l'AcpA. Rôle dans la croissance intracellulaire dans le macrophage, et dans la virulence de <i>F. novicida</i> chez la souris.	236, 237
<i>cds2</i>	/	185
<i>FTT0989</i>	/	185
<i>tul4</i>	/	190
<i>valAB</i>	ValA-B : protéines de transport	212
<i>minD</i>	MinD : pompe à ions toxiques	211
<i>clpB</i>	ClpB : impliquée dans une activité protéase	189
<i>dsb</i>	Dsb : protéine de formation de ponts disulfures	198, 214,
<i>katG</i>	KatG : superoxyde dismutase	215
<i>sodB</i>	SodB : catalase-peroxydase	217
<i>FTT0918</i>	/	216
<i>purA, F, MCD</i>	PurA, F, MCD : protéine de biosynthèse des purines	219, 220
<i>FTT0748</i>	FTT0748, FTT0585 : retarde l'activation de l'inflammasome	153
<i>FTT0584</i>	FslA, B, C, D : protéine de biosynthèse de sidérophores	153
<i>fslABCD</i>	/	221, 222
<i>fevR</i>	Régulateur transcriptionnel	210

Gènes de l'îlot de pathogénicité		
Facteurs	Fonction	Références
<i>pdpA</i> <i>pdpB</i>	« Pathogenicity Determinant Protein » Nécessaires à la croissance intracellulaire de la bactérie dans le macrophage et à l'expression de la virulence	96, 185, 198
<i>pigA</i> <i>pigB</i> <i>pigC</i> <i>pigD</i> <i>pigE</i> <i>pigF</i> <i>pigG</i> <i>pigH</i> <i>pdpC</i> <i>pigI</i>	« Pathogenicity Island Genes » Gènes non caractérisés	183
<i>iglD</i> <i>iglC</i> <i>iglB</i> <i>iglA</i>	« Intracellular Growth Locus » IglC : protéine nécessaire à la libération de la bactérie dans le cytoplasme, inhibition des voies du NF-κB et des MAP kinases IglA, IglB : agissent en complexe. Il s'agirait de protéines de sécrétion IglD : nécessaire à la croissance de la bactérie dans le macrophage	92, 186, 188- 192, 194, 195, 197, 249
<i>pdpD</i> <i>amnK</i>	Nécessaires à la croissance intracellulaire de la bactérie dans le macrophage et à l'expression de la virulence	96, 193
<i>orfX</i>	Gène non caractérisé	183

/ fonctions non identifiées

CHAPITRE IV

Les outils pour la manipulation génétique de *Francisella*

Introduction

Les études génétiques des organismes vivants ont pu progresser grâce à l'apparition de nombreuses méthodes d'analyse depuis les années 1950. Ainsi, le séquençage, l'hybridation des acides nucléiques, l'amplification de fragments d'ADN par PCR ou encore le clonage font partie d'une liste non exhaustive de techniques qui contribuent largement au développement du génie génétique et à l'amélioration des connaissances sur les organismes vivants.

Les méthodes de biologie moléculaire consistent à réutiliser les mécanismes naturels, déjà présents chez les organismes vivants, au profit de manipulations génétiques ciblées. Ces dernières ont, entre autres, pour objectif de modifier le génotype et/ou le phénotype de l'organisme étudié en intervenant directement sur le génome par mutagenèse ou en utilisant des outils de complémentation, tels que les vecteurs navettes. Ces méthodes, appliquées à l'étude des bactéries, ont permis de mieux comprendre l'expression et la régulation des gènes chez les procaryotes. Elles se sont révélées être des outils performants pour identifier et caractériser des gènes impliqués dans le métabolisme ou dans la virulence de certaines bactéries.

Parmi les outils les plus utilisés en biologie moléculaire figurent les plasmides. Ces petites molécules d'ADN circulaire double brin, distinctes de l'ADN chromosomique, sont capables de se répliquer de manière autonome et sont presque exclusivement rencontrées dans les bactéries. Leur classification repose sur leur mode de réplication, souvent spécifique à un

genre bactérien. Cependant, certains groupes de plasmides peuvent se répliquer dans des hôtes appartenant à des genres bactériens différents : ce sont des plasmides à large spectre d'hôtes. Dans la nature, les plasmides participent aux transferts horizontaux entre les populations bactériennes, ainsi qu'à la dissémination des gènes, conférant des avantages sélectifs, tels que des résistances aux antibiotiques ou des facteurs de virulence. Leur diversité et leur flexibilité ont permis de développer une large gamme d'outils en biologie moléculaire, permettant la création de mutants ou encore l'utilisation des bactéries comme support de production de plasmides ou de protéines.

Les outils moléculaires ont longtemps fait défaut pour l'étude de *Francisella tularensis*, ce qui a ralenti l'acquisition des connaissances sur son métabolisme et sur sa virulence. De plus, la culture fastidieuse de *Francisella tularensis* et la nécessité de travailler dans des laboratoires de niveau de sécurité biologique 3, pour les souches les plus virulentes, ont constitué des contraintes supplémentaires pour l'étude de cette bactérie. Néanmoins, depuis une quinzaine d'années, les études moléculaires de *Francisella* progressent rapidement. En effet, des méthodes efficaces de transformation ont été mises au point pour introduire de l'ADN dans les bactéries, des techniques de mutagenèse par recombinaison homologue ou par utilisation de transposons ont été développées, des vecteurs navettes porteurs de marqueurs génétiques de criblage ont été construits et de nombreux génomes ont été séquencés. Ainsi, certains gènes impliqués dans la croissance intracellulaire de la bactérie ont pu être identifiés et les mécanismes d'interaction avec les cellules infectées commencent à être caractérisés. A terme, une meilleure compréhension du métabolisme de la bactérie permettra de mieux maîtriser la tularémie en termes de diagnostic, de vaccination et de traitement. L'approche moléculaire semble aujourd'hui incontournable pour atteindre cet objectif.

Ce chapitre présente les différents outils de biologie moléculaire développés pour l'étude de *Francisella tularensis*. Il introduit également la deuxième partie des résultats de la thèse consacrée au développement de nouveaux vecteurs navettes.

I - Les techniques de transformation appliquées à *Francisella*

La transformation bactérienne est un phénomène naturel qui permet l'introduction d'ADN exogène dans une cellule procaryote. Reproduite en laboratoire, cette étape est essentielle à la modification ciblée du génotype et/ou du phénotype d'une bactérie.

Plusieurs méthodes ont été adaptées au genre *Francisella* : la transformation chimique, la cryotransformation, l'électroporation et la conjugaison.

Lors de la transformation chimique, les bactéries sont rendues « compétentes », c'est-à-dire dans un état physiologique propice à la pénétration de l'ADN dans la cellule, par la perméabilisation de la membrane dans une solution riche en sels²⁵⁰⁻²⁵². Cette technique, rarement utilisée, a uniquement été employée chez *F. novicida*^{188, 193}.

La cryotransformation est dérivée de la transformation chimique. L'ADN purifié est introduit dans les bactéries par choc thermique, provoqué par un bain dans l'azote liquide, suivi d'un bain à 37°C. Les cellules sont rendues compétentes par une solution riche en sels²⁵³. La cryotransformation a été la méthode la plus utilisée pour l'introduction d'ADN dans *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS et dans les souches de la sous-espèce *tularensis*^{219, 236, 253-256}.

L'électroporation a récemment été adaptée à *Francisella* par Maier et collaborateurs²⁵⁷. L'ADN purifié est introduit dans les bactéries sous l'action d'une forte impulsion électrique. L'application de cette tension déstabilise temporairement la membrane cellulaire, ce qui permet à l'ADN de pénétrer dans la bactérie. Les cellules sont rendues électrocompétentes par des lavages successifs dans une solution de saccharose. Maier et collaborateurs ont montré que cette technique était plus efficace que la cryotransformation²⁵⁷. Depuis sa mise au point, l'électroporation a été utilisée avec succès à plusieurs reprises pour introduire des vecteurs suicides et réplicatifs^{186, 193, 258-260} ou des complexes transposon-transposase²⁶¹ dans *F. tularensis*.

Enfin, Golovliov et collaborateurs ont été les premiers à transformer *Francisella tularensis* LVS par conjugaison²⁴⁹. Au cours de ce mécanisme, un plasmide est directement transféré à travers un pont de conjugaison d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse. La bactérie donneuse doit porter sur son chromosome les gènes nécessaires à la synthèse de ce pont de conjugaison, ainsi qu'au transfert du plasmide. D'autre part, le plasmide doit porter une séquence nucléotidique spécifique à partir de laquelle ce dernier sera transféré ; il s'agit de l'origine de transfert *oriT* ou *mob*. Ainsi, afin de transformer *F. tularensis* subsp.

holarctica LVS, Golovliov et collaborateurs ont développé un vecteur dérivé du plasmide pUC19, dans lequel a été insérée l'origine de transfert *oriT*.

D'autres vecteurs ont ensuite été développés et utilisés pour transformer *F. novicida*²¹⁹,²⁶², et les sous-espèces *holarctica*^{193, 203, 204, 216} et *tularensis*^{197, 262}.

II – Mutagenèse

Au cours des premiers travaux sur *Francisella*, les études génétiques étaient réalisées à l'aide de mutants spontanés, présentant des modifications phénotypiques observables : par exemple, une perte de virulence²⁶³ ou un changement dans l'apparence des colonies²⁶⁴. Cependant, à cette époque, l'absence d'outils ne permettait pas de caractériser les gènes mutés impliqués dans ces différences phénotypiques. Des agents chimiques, comme l'acridine orange, ont notamment été utilisés pour obtenir des variants acapsulés de la sous-espèce *holarctica*¹⁶⁴. L'obtention de mutations spontanées ou induites par l'utilisation d'agents chimiques est relativement simple et rapide mais celles-ci n'étant ni ciblées, ni marquées, leur localisation et leur caractérisation restent difficiles.

Deux stratégies de mutagenèse ont ensuite majoritairement été utilisées chez *Francisella* : la mutagenèse dirigée par échange d'allèles et la mutagenèse aléatoire par l'utilisation de transposons.

II – 1. Mutagenèse dirigée par échange d'allèles

Cette méthode permet de générer des mutations dans des régions génomiques précises par délétion ou insertion. Elle a été utilisée pour muter *F. novicida* et des souches appartenant aux sous-espèces *holarctica* et *tularensis*. Ce mécanisme d'échange se produit entre deux fragments d'ADN présentant des homologies de séquences : l'allèle sauvage du gène d'intérêt présent sur le génome et l'allèle muté. Le gène muté peut être introduit dans la bactérie par transformation sous deux formes différentes : soit il s'agit d'un fragment d'ADN linéaire amplifié par PCR, soit le gène muté est inséré dans un plasmide suicide.

Lorsque le gène d'intérêt est muté par insertion d'une cassette codant pour une résistance à un antibiotique, l'échange entre l'allèle sauvage et l'allèle muté se produit en une seule étape par une double recombinaison homologue. Le gène muté peut être porté par un fragment d'ADN linéaire ou par un plasmide suicide. Après la transformation bactérienne, la pression de sélection, assurée par la présence de l'antibiotique correspondant

dans le milieu de culture, favorise l'évènement de recombinaison et permet de sélectionner uniquement les bactéries qui ont subi la mutation (Figure 19).

Cette méthode a été utilisée pour muter *F. novicida* à partir d'un fragment d'ADN linéaire¹⁹⁰. Par contre, l'obtention d'une mutation après l'introduction d'un fragment d'ADN linéaire n'a jamais été décrite chez *F. tularensis*, pour laquelle l'efficacité de transformation d'un fragment linéaire est médiocre comparativement à celle observée avec un plasmide suicide. Cette différence d'efficacité pourrait être liée à la dégradation de l'ADN linéaire par des exonucléases dans la bactérie, d'où la nécessité d'utiliser une plus grande quantité de produit PCR lors de la transformation.

Lorsque le gène d'intérêt est muté par délétion, la construction doit être portée par un plasmide suicide, lui-même porteur d'un gène de sélection négative ou d'excision. Comme l'indique son nom, un plasmide suicide ne se maintient pas dans la bactérie receveuse car il ne possède pas les fonctions nécessaires à sa réplication. Ces fonctions sont souvent spécifiques à un genre bactérien donné. Ainsi, un plasmide répliatif chez *E. coli* ne sera pas forcément répliatif chez *Francisella*, et réciproquement. Lorsqu'une bactérie reçoit un plasmide suicide, ce dernier sera perdu au cours des divisions cellulaires ou sera, dans certaines conditions, intégré dans le génome bactérien.

L'intégration de la construction plasmidique dans le génome de la bactérie receveuse est induite par une pression de sélection assurée par la présence, dans le milieu de culture, de l'antibiotique dont les gènes de résistance sont portés par le plasmide suicide. Ainsi, la bactérie est contrainte d'intégrer le plasmide dans son génome afin de survivre. Ce premier évènement de recombinaison conduit à l'obtention de la forme intermédiaire mérodipléide : le plasmide est entièrement intégré au génome et les deux formes du gène d'intérêt, sauvage et mutée, sont présentes en simple copie. Cette forme mérodipléide disparaît à la suite d'un second évènement de recombinaison au cours duquel se produit l'échange entre l'allèle sauvage et l'allèle muté. Cet échange conduira soit à la perte définitive de l'allèle sauvage, soit à sa régénération.

Pour induire le deuxième évènement de recombinaison, le plasmide suicide doit posséder un marqueur de sélection négative. Il s'agit souvent du gène *sacB* de *Bacillus subtilis* qui code pour la lévansucrase. Cette enzyme est létale pour les bactéries à Gram négatif en présence de saccharose dans le milieu. Dans ce cas, les bactéries n'ayant pas subi le deuxième évènement de recombinaison et possédant toujours le plasmide dans leur génome produisent la lévansucrase et ne survivent pas (Figure 20).

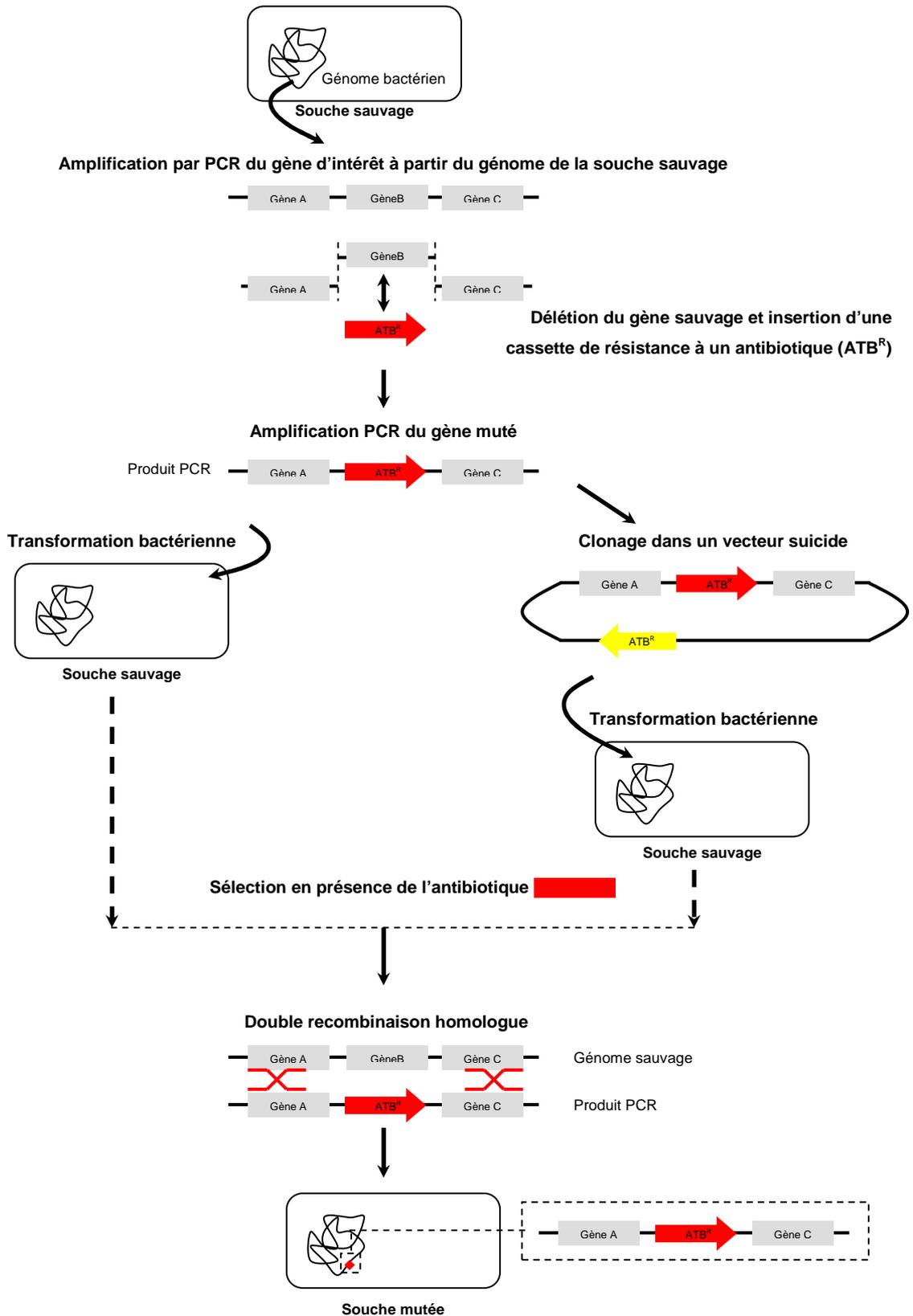


Figure 19. Schéma de la mutagenèse par échange d'allèles à partir d'un gène muté par insertion d'une cassette de résistance à un antibiotique ²⁶³

Amplification par PCR du fragment d'ADN d'intérêt à partir du génome de la souche sauvage

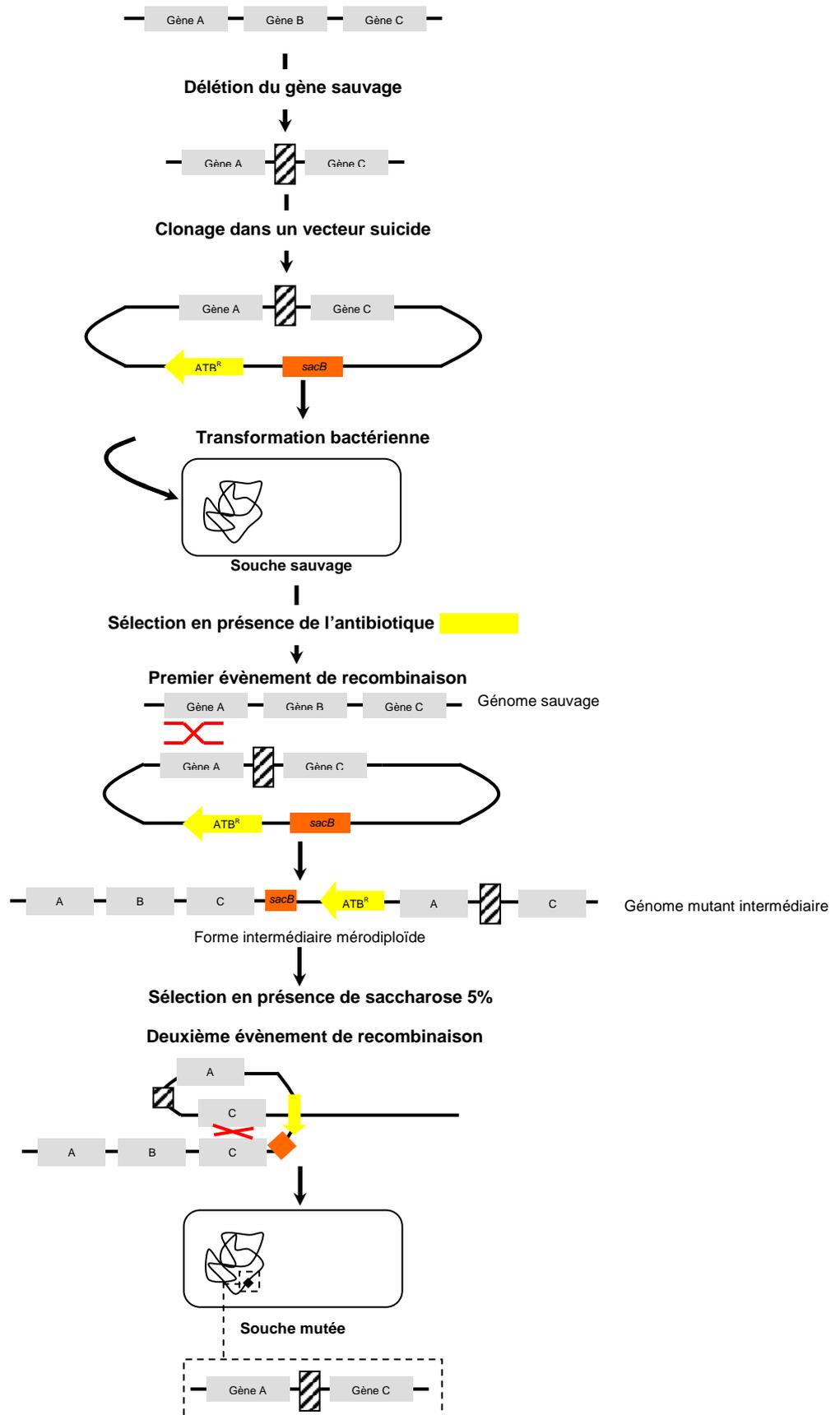


Figure 20. Schéma de la mutagenèse par échange d'allèles à partir d'un gène muté par délétion ²⁶³

Golovliov et collaborateurs sont les premiers à avoir réalisé une mutation par échange d'allèles chez *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS²⁴⁹. Ils ont construit un plasmide suicide, le pPV (Figure 21), en modifiant le plasmide pUC19 par l'introduction du gène *sacB*, d'une origine de transfert et d'un gène de résistance au chloramphénicol.

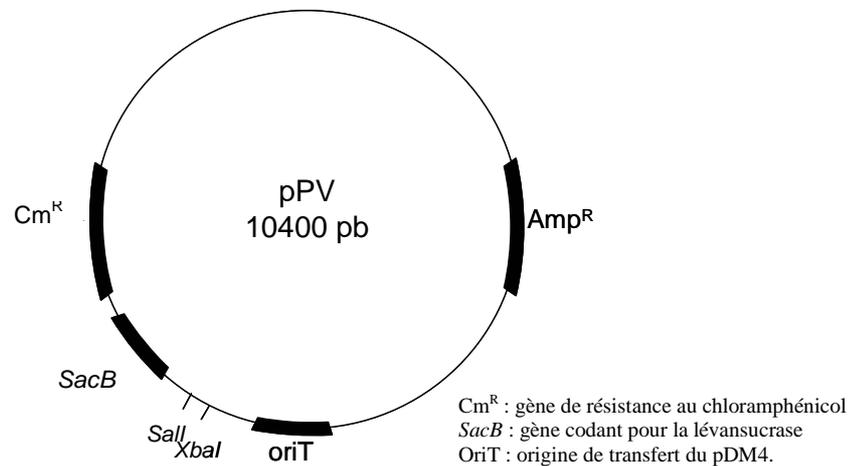


Figure 21. Plasmide suicide pPV (dérivé du pUC19)²⁴⁹.

Après le pPV, d'autres vecteurs suicides ont été construits et la mutagenèse dirigée par échange d'allèles a largement été utilisée pour muter *Francisella* (Tableau 15, Tableau 16).

II – 2. Mutagenèse aléatoire par l'utilisation de transposons

Les transposons ou éléments transposables sont utilisés pour créer des mutations aléatoires dans le génome de la bactérie étudiée. L'ensemble des mutants obtenus constitue alors une banque de mutants aléatoires.

Les transposons sont des éléments mobiles constitués par une séquence d'ADN et sont naturellement présents dans les génomes de tous les organismes vivants. Ils sont peu fréquents dans les petits génomes, comme ceux des bactéries, mais représentent une part importante des grands génomes (ex : 70% dans le maïs). Les éléments transposables présents dans les génomes bactériens, nommés « séquences d'insertion » (IS), sont les plus simples. Une séquence d'insertion est constituée d'un gène codant pour la transposase (enzyme qui catalyse la transposition), encadré par des séquences inversées-répétées qui marquent les extrémités de l'IS. La transposase reconnaît spécifiquement les séquences inversées-répétées du transposon, ainsi que la séquence d'insertion sur l'ADN, caractérisée

par une séquence répétée deux fois. Ainsi, une IS sera toujours encadrée de séquences directement répétées, spécifiques à sa transposase. Les transposons sont généralement connus pour leur importance dans le transfert de fonctions. Ces éléments mobiles peuvent porter des gènes codant pour des résistances antibiotiques, des résistances à des métaux lourds, à des toxines ou pour des protéines de structure...

La création de mutations par insertion en utilisant les transposons Tn10 et TnMax2 a été tentée à plusieurs reprises chez *Francisella*^{182, 189, 212}. Cependant, Lauriano et collaborateurs ont montré chez *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS que les mutations créées avec ces transposons étaient instables¹⁹⁰. Par la suite, deux systèmes de transposons ont été développés pour créer des banques de mutants de *Francisella* : le système EZ::TN, basé sur le transposon Tn5, et un système basé sur le transposon *himar1*.

La méthode de mutation basée sur l'insertion aléatoire du complexe transposon-transposase, dérivé du Tn5, a été développée par Kawula et collaborateurs avec *F. tularensis* LVS²⁰⁷ et a permis d'obtenir une banque de mutants aléatoires stables. Cette technique a ensuite été utilisée à plusieurs reprises pour créer des banques de mutants à partir de *F. novicida* U112^{153, 198, 210, 261}, de *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS^{269, 270} et de *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4²¹⁴.

Récemment, Maier et collaborateurs ont créé une banque de mutants aléatoires de *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS à l'aide d'un système transposon-transposase dérivé de *himar1*²⁵⁹.

La création de banques de mutants de *Francisella tularensis* par l'insertion aléatoire de transposons constitue une nouvelle approche pour étudier la pathogénie de la bactérie. L'analyse de mutants ayant perdu leur capacité à croître dans les macrophages ou étant atténués dans leur virulence permettra d'identifier les gènes impliqués dans ces mécanismes. L'isolement de mutants atténués ouvre de nouvelles voies pour le développement de nouveaux vaccins. Néanmoins, l'application de cette méthode nécessite un système de criblage efficace, permettant de sélectionner des clones d'intérêt parmi parfois 40 000 clones testés²¹⁰.

Tableau 15. Mutants de *Francisella novicida* construits par échange d'allèles (d'après Zahrt 2007²⁶³)

Espèce	Gènes mutés	Assignations ^a	Mutation ^b	Résistance ^c	Transformation ^d	Références
<i>F. novicida</i>	<i>acpA</i>	FTN0090	I	Erm	Electro.	246
	<i>acpA</i>	FTN0090	DI	Km	Cryo.	236
	<i>acpB</i>	FTN1556	DI	Tc	Cryo.	237
	<i>acpC</i>	FTN1061	DI	Erm	Cryo.	237
	<i>hap</i>	FTN0954	DI	Hyg	Cryo.	237
	<i>recA</i>	FTN0122	I	Km	Chim.	265
	<i>minD</i>	FTN0330c	I	Km	Chim.	211
	<i>tul4</i>	FTN0427	DI	Erm	Electro.	190
	<i>fopA</i>	FTN0756	I	Km	Chim.	250
	/	FTN0869	DI	Km	Electro.	185
	/	FTN0910	DI	Km	Electro.	185
	/	FTN1070	DI	Km	Electro.	185
	<i>pepO</i>	FTN1186	DI	Km	Electro.	185
	<i>mglA</i>	FTN1290	DI	Erm	Electro.	191
	<i>pdpB</i>	FTN1310	DI	Km	Electro.	185
	<i>cds2</i>	FTN1318	DI	Km	Electro.	185
	<i>iglA</i>	FTN1324	DI	Erm	Chim.	188
	<i>iglB</i>	FTN1323	DI	Erm	Chim.	188
	<i>iglB</i>	FTN1323	DI	Erm	Cryo.	192
	<i>iglC</i>	FTN1322	DI	Erm	Electro.	191
	<i>pdpD</i>	FTN1325c	DI	Erm	Electro.	96
	<i>pdpD</i>	FTN1325c	D	/	Chim.	193
	<i>anmK</i>	FTN1326	D	/	Chim.	193
	<i>wbtDEF</i>	FTN1425c – FTN1427c	DI	Cm	Conjug.	262
	<i>oppB</i>	FTN1592	DI	Km	Electro.	185
	<i>frgA</i>	FTN1682	DI	Km	Electro.	186
	/	FTN1741	DI	Km	Electro.	185
	<i>pur A – purF</i>	FTN0178 – FTN1700	DI	Cm	Cryo. – Conjug.	219
	/	FTN1758	D	/	Chim.	193
	<i>figB, C, D, E</i>	FTN1683 à FTN1686	DI	Km	Electro.	221

^a Annotations du génome de la souche U112 (numéros d'accèsion GenBank CP000439)

^b mutations par insertion (I), délétion (D), délétion-insertion (DI).

^c résistance à l'érythromycine (Erm), à la kanamycine (Km), au chloramphénicol (Cm), à l'hygromycine (Hyg).

^d introduction de l'ADN par électroporation (Electro.), cryotransformation (Cryo.), conjugaison (Conjug.) et transformation chimique (Chim.)

Tableau 16. Mutants de *Francisella tularensis* (subsp. *holarctica* et *tularensis*) construits par échange d'allèles (d'après Zahrt 2007)

Sous-espèces	Gènes mutés	Assignations ^a	Mutation ^b	Résistance ^c	Transformation ^d	Références
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>	<i>iglC1 – iglC2</i>	FTL0113 – FTL1159	D	/	Conjug.	249
	<i>iglC1 – iglC2</i>	FTL0113 – FTL1159	D	/	Electro.	266
	<i>iglD1 – iglD2</i>	FTL0114 – FTL1160	D	/	Conjug.	196
	<i>mglA</i>	FTL1185	D	/	Conjug.	208
	<i>sspA</i>	FTL1606	D	/	Conjug.	208
	<i>mglA</i>	FTL1185	D	/	Conjug.	196
	<i>purMCD</i>	FTL0395 – FTL0396	DI	Km	Electro.	220
	<i>blaB – blaA</i>	FTL0879 – FTL0957	D	/	Electro.	258
	<i>ftlC</i>	FTL1107	D	/	Conjug.	204
	<i>sodB</i>	FTL1791	P	/	Conjug.	216
	<i>fslA</i>	FTL1832	D	/	Electro.	267
	<i>fslA</i>	FTL1832	DI	Km	Electro.	186
	<i>tolC</i>	FTL1865	D	/	Conjug.	204
	<i>pilF</i>	FTL1029	D	/	Conjug.	201
	<i>lpxL</i>	FTT0032c	DI	Km	Cryo.	268
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>	<i>blaB – blaA</i>	FTT0611c – FTT0681c	D	/	Electro.	258
		FTT0918	D	/	Conjug.	197
		FTT0919	D	/	Conjug.	197
	<i>iglC1 – iglC2</i>	FTT1357c – FTT1712c	D	/	Conjug.	197
	<i>wbtDEF</i>	FTT1459c – FTN1461c	DI	Cm	Conjug.	262
	<i>fur</i>	FTT0030c	D	/	Electro.	222
	<i>fslE</i>	FTT0025	D	/	Electro.	222
	<i>acrA</i>	FTL1845	D	/	Electro.	215
	<i>acrB</i>	FTT0105c	D	/	Electro.	215
<i>dsbB</i>	FTT0107c	D	/	Electro.	215	

^a Annotations des génomes de *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS (numéros d'accèsion GenBank AM233362) et de *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 (numéros d'accèsion GenBank AJ749949).

^b mutations par insertion (I), délétion (D), délétion-insertion (DI), mutation ponctuelle (P).

^c résistance antibiotique à la kanamycine (Km), au chloramphénicol (Cm).

^d introduction de l'ADN par électroporation (Electro.), cryotransformation (Cryo.), conjugaison (Conjug.) et transformation chimique (Chim.)

III – Les plasmides naturels de *Francisella* et développement de vecteurs navettes

Le pFNL10 est le seul plasmide naturel décrit chez *Francisella* jusqu'à présent ²⁷¹. Il a été identifié en 1994 à partir de la souche *Francisella novicida*-like F6168, isolée du sang d'un patient californien ²⁶. L'identification d'un plasmide naturel, capable de réplication autonome chez *Francisella*, a rapidement présenté un intérêt pour le développement de nouveaux outils moléculaires, dont les vecteurs navettes. Ces derniers peuvent être utilisés pour l'identification de gènes essentiels à la survie de la bactérie dans l'hôte, par complémentation de mutants ou par l'étude de l'expression des gènes à différents stades de l'infection. Par exemple, certains promoteurs spécifiquement activés lors de l'infection intracellulaire du macrophage peuvent être identifiés, en clonant des fragments d'ADN génomiques en amont de gènes rapporteurs (gène de résistance à un antibiotique ou gène codant pour une protéine fluorescente, par exemple la GFP - green fluorescent protein).

L'analyse de la séquence nucléotidique du pFNL10 a été réalisée plus tardivement en 2001 ²⁷².

III – 1. L'analyse de séquence du pFNL10

Le pFNL10 est un plasmide de 3 990 pb dont la séquence est déposée dans GenBank sous le numéro d'accès AF121448 ²⁷² (Figure 22, Tableau 17).

La séquence du pFNL10 est caractérisée par six régions codantes. L'ORF1 code pour une protéine de 339 acides aminés (aa) dont la séquence est proche des protéines d'initiation de la transcription des autres bactéries. Cette protéine, nommée RepA, correspond à la réplicase essentielle au maintien du plasmide dans la bactérie. L'ORF2 code pour une protéine de 140 aa qui correspondrait à une hélicase ATP-dépendante. L'ORF3 code pour une protéine de 298 aa. D'après l'analyse de séquence, le produit de l'ORF3 serait une intégrase ou une recombinase. LoVuello et collaborateurs suggèrent que l'ORF3 joue un rôle dans la répartition du plasmide entre les bactéries ou dans le nombre de copies ²⁵⁸. L'ORF4 et l'ORF5, disposés en opéron, codent respectivement pour des protéines de 68 aa et 86 aa. Ces deux ORFs constituent un système d'addiction de type toxine-antidote, similaire à celui porté par l'opéron *phd-doc* du bactériophage P1 d'*E. coli* ^{274, 275}. Ce système favorise la survie des bactéries qui portent le plasmide : Doc est toxique et cause la mort des bactéries, alors que Phd constitue l'antidote. Cette dernière se lie à Doc pour

bloquer son activité. L'ORFm code pour une protéine de 56 aa pour laquelle aucune homologie n'a été identifiée.

Deux zones promotrices, dépendantes du facteur $\sigma 70$, ainsi que deux zones de terminaison, ont été identifiées en amont et en aval des opérons *repA-orf2* et *orf4-orf5*. L'origine de réplication du pFNL10 est caractérisée par deux séquences répétées, une de 13 pb (AATATATAAAGAG) et une de 31 pb (GATACAAAAGTAGTTTTAAATTCAAAAAGT). D'après cette origine de réplication, Pomerantsev et collaborateurs suggèrent que le pFNL10 se réplique selon le mode Theta, identique à celui de la réplication de l'ADN chromosomique.

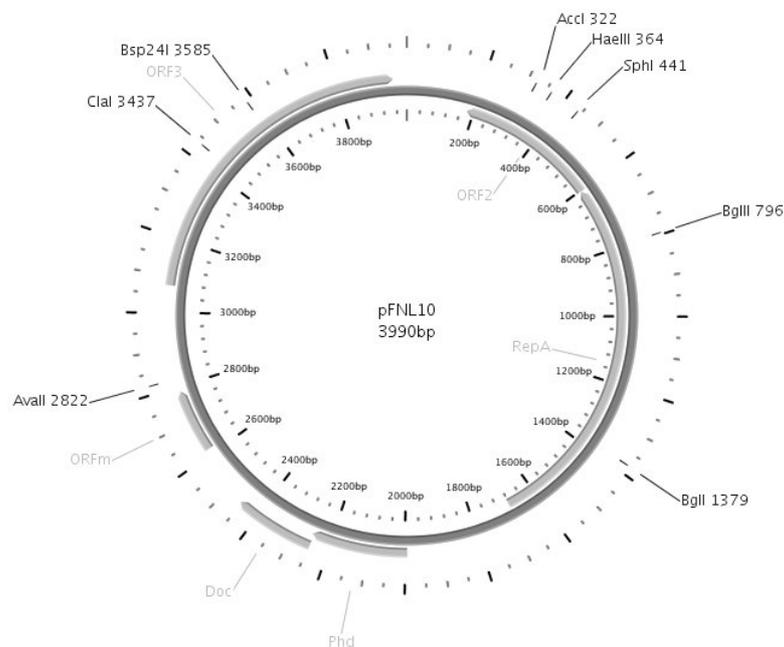


Figure 22. Carte du plasmide pFNL10 (3 990 pb) (créée par PlasmMapper ²⁷³). Les flèches grises représentent les six régions codantes (de ORF1 à ORF6). Les sites de restriction uniques et leurs positions sont indiqués.

Tableau 17. Régions codantes du pFNL10 ²⁷²

Plasmide	Positions	Description
pFNL10		
ORF1	605-1682	Rep A
ORF2	180-602	Hélicase ATP-dépendante
ORF3	3075-3953	Intégrase ou recombinaison
ORF4	2249-2455	Protéine similaire à Doc
ORF5	1995-2252	Protéine similaire à Phd
ORFm	2616-2786	Aucune homologie identifiée

III – 2. Les vecteurs navettes répliatifs chez *Francisella*

L'une des caractéristiques essentielles des vecteurs navettes réside dans leur capacité à se répliquer à l'intérieur de deux genres bactériens au minimum. Le plus souvent, il s'agit de la bactérie étudiée et d'*E. coli*. L'intérêt de ces vecteurs est de pouvoir réaliser les constructions chez *E. coli*, dont la manipulation est aisée, avant de les utiliser pour des études précises dans la bactérie d'intérêt.

Ces vecteurs peuvent être construits selon deux stratégies : soit à partir d'un plasmide naturel porteur de l'origine de répliation spécifique du genre de la bactérie étudiée, soit à partir d'un plasmide à large spectre d'hôtes. A ces plasmides sont ajoutées de nouvelles fonctions, essentielles à leur manipulation : un marqueur de sélection, telle qu'une cassette de résistance à un antibiotique pour la sélection de clones et une origine de répliation spécifique à *E. coli*.

Avant le pFNL10, aucun plasmide naturel n'avait été isolé chez *Francisella*, ce qui a limité le développement d'outils moléculaires. Des études avaient été réalisées par des chercheurs russes avec les plasmides à larges spectres d'hôtes, pC194 de *Staphylococcus aureus* et pSa de *Bacillus*, mais ces plasmides n'étaient pas stables chez *Francisella* en milieu liquide sans pression de sélection²⁷⁶⁻²⁷⁸.

Lorsque le pFNL10 a été identifié, il a servi de base pour développer des vecteurs navettes répliatifs chez *E. coli* et chez *Francisella*. Jusqu'à récemment, les vecteurs navettes fonctionnels chez *Francisella* étaient tous dérivés de ce plasmide (Tableau 18).

Tableau 18. Plasmides et vecteurs navettes réplcatifs chez *Francisella* (d'après Zahrt 2007 ²⁶³)

Plasmides	Origines ^a	Description	Résistances / marqueurs ^b	Références
pFNL10	ori _{FT}	Plasmide naturel de <i>Francisella novicida</i> -like F6168	None	271, 272
pFNL100	ori _{FT} ; ColE1	Plasmide hybride du pFNL10 et du vecteur de clonage d' <i>E. coli</i> , pBR328	Tc ^r ; Cm ^r	253
pFNL200	ori _{FT}	Dérivé du pFNL100 : délétion avec l'enzyme <i>Sau3A</i>	Tc ^r ; Cm ^r	253, 272
pOM1	ori _{FT}	Dérivé du pFNL200 : délétion spontanée	Tc ^r	279
pKK202	ori _{FT} ; p15A	Dérivé du pFNL200 : délétion de 3 kb par <i>XbaI</i> , insertion de l'origine de réplcation p15A du pACYC184	Tc ^r ; Cm ^r	255
pKK214	ori _{FT} ; p15A	Dérivé du pKK202 : délétion par <i>XbaI</i> , insertion du gène de résistance au chloramphénicol du pCM7 sans son promoteur et le MCS du pBlue script	Tc ^r	254
pKK214CAT	ori _{FT} ; p15A	Dérivé du pKK214 : insertion du promoteur <i>groESL</i> devant le gène de résistance au Cm	Tc ^r ; <i>groEL</i> -Cm ^r	77
pKK214GFP	ori _{FT} ; p15A	Dérivé du pKK214CAT : remplacement du gène de résistance au Cm par le gène <i>gfp</i>	Tc ^r ; <i>groEL-gfp</i>	77
pFNLTP1	ori _{FT} ; pMB1	Plasmide hybride du pFNL10 et du vecteur de clonage d' <i>E. coli</i> , pCR2.1-TOPO	Amp ^r ; Km ^r	257
pFNLTP5 à 8	ori _{FT} ; pMB1	Dérivés du pFNLTP1 contenant différentes combinaisons de sites multiples de clonage	Amp ^r ; Km ^r ; MCS	257
pFNLTP9	ori _{FT} ; pMB1	Dérivés du pFNLTP1 contenant une ori _{FT} sensible à la chaleur	Amp ^r ; Km ^r	257
pFNLTP6- <i>gfp</i>	ori _{FT} ; pMB1	Dérivé du pFNLTP6 : insertion du gène <i>gfp</i> sans son promoteur en aval du MCS	Amp ^r ; Km ^r	257
pFNLTP6 <i>gro-gfp</i>	ori _{FT} ; pMB1	Dérivé du pFNLTP6- <i>gfp</i> : insertion du promoteur <i>groESL</i> devant le gène <i>gfp</i>	Amp ^r ; Km ^r ; <i>groEL-gfp</i>	257
pFNLTP16H3	ori _{FT} ; pMB1	Dérivé du pFNLTP9 : délétion du gène de résistance à la kanamycine, insertion du transposon <i>himarFT</i> codant pour un gène de résistance à la kanamycine	Amp ^r ; Km ^r	259
pFNLTP23	ori _{FT} ; pMB1	Dérivé du pFNLTP8 : délétion du gène de résistance à la kanamycine, insertion du gène de résistance à la nourseothricine	Amp ^r ; Nt ^r	259
pXP136	ori _{FT} ; ColE1	Dérivé du pFNLTP6 <i>gro-gfp</i> : insertion du gène <i>bla</i> devant le gène <i>gfp</i> , puis délétion de 373 pb	Km ^r ; Ceph ^r	280
pXP160	ori _{FT} ; ColE1	Dérivé du pXP136 : délétion de <i>gfp</i> , placant <i>bla</i> sous le contrôle de <i>groESL</i> . Délétion de 1,5 kb contenant le gène de résistance à la kanamycine, insertion du gène <i>gfp</i> et délétion de l'ORF3.	Ceph ^r	280
pXP167	ori _{FT} ; ColE1	Dérivé du pXP160 : délétion de 299 pb codant une partie de ori _{FT} et de l'ORF5, pour placer le gène <i>gfp</i> sous le contrôle du promoteur de l'ORF5.	Ceph ^r	280
pMP393	ori _{FT} ; ColE1	Dérivé du pMV261 : insertion de l'origine de réplcation du pFNL10	Km ^r	258
pMP527	ori _{FT} ; ColE1	Dérivé du pMP393 : insertion du promoteur <i>groESL</i> devant le gène de résistance à la kanamycine	Km ^r	258
pMP529	ori _{FT} ; ColE1	Dérivé du pMP527 : remplacement du gène de résistance au chloramphénicol par le gène de résistance à l'hygromycine	Hyg ^r	258
pMP607	ori _{FT} ; ColE1	Dérivé du pMP527 : insertion des <i>orf4</i> et <i>orf5</i> du pFNL10	Km ^r	258
pMP633	ori _{FT} ; ColE1	Dérivé du pMP529 : insertion des <i>orf4</i> et <i>orf5</i> du pFNL10	Hyg ^r	258
pCU18	ori _{pC194} ; pMB1	Plasmide hybride du pUC18 et du pC194	Amp ^r , Cm ^r	260
pCUG1	ori _{pC194} ; pMB1	Plasmide hybride du pUC18 et du pC194, insertion du gène <i>gfp</i> du pFPV25, sans son promoteur	Amp ^r , Cm ^r	260
pCUG2	ori _{pC194} ; pMB1	Plasmide hybride du pUC18 et du pC194, insertion du gène <i>gfp</i> du pFPV25, sans son promoteur (orientation du pC194 inversée par rapport au pCUG1)	Amp ^r , Cm ^r	260

^a origines de réplcations des plasmides : ori_{FT}, origine de réplcation du pFNL10 ; ColE1, origine de réplcation d'*E. coli* des vecteurs pBR ; p15A, origine de réplcation d'*E. coli* des vecteurs pACYC ; pMB1, origine de réplcation d'*E. coli* des vecteurs pUC, origine de réplcation du plasmide pC194 de *Staphylococcus aureus*.

^b Résistances antibiotiques ou marqueurs portés par le plasmide. Tc^r, Cm^r, Amp^r, Km^r, Nt^r, Hyg^r, Ceph^r : résistance à la tétracycline, au chloramphénicol, à l'ampicilline, à la kanamycine, à la nourseothricine, à l'hygromycine et à la céphalosporine ; *gfp*, gène de la « green fluorescent protein » ; *groESL*, promoteur *groESL* de *Francisella* ; MCS, site multiple de clonage.

Le pFNL100 et le pFNL200 constituent la première génération de vecteurs. Le pFNL100, construit en 1996, est un plasmide hybride entre le pFNL10 et le pBR328²⁵³. Il porte les gènes de résistance à la tétracycline et au chloramphénicol du pBR328. Il est répliatif chez *Francisella*, grâce à l'origine de répliation du pFNL10 (*ori_{FT}*), et chez *E. coli*, grâce à l'origine de répliation du pBR328 (*ColE1*). Le pFNL200 a été construit par délétion d'une partie du pFNL100, mais a perdu sa capacité à se répliquer chez *E. coli*, ce qui a limité son utilisation en biologie moléculaire.

Une deuxième génération de plasmides a ensuite été construite avec le pKK202, le pOM1 et le pKK214 :

- Le pKK202 a été obtenu suite à une délétion du pFNL200 et à l'insertion de l'origine de répliation d'*E. coli*, *p15A*²⁵⁵.
- Le pOM1 a été obtenu par une délétion spontanée du pFNL200²⁷⁹. Il a été utilisé pour comparer la cryotransformation et l'électroporation dans plusieurs souches de la sous-espèce *tularensis*²⁵⁶.
- Le pKK214 a été construit à partir du pKK202 par délétion d'un fragment de 3 kb porteur du gène de résistance au chloramphénicol du pBR328, puis par insertion du gène de résistance au chloramphénicol (*cat*) du pCM7 sans son promoteur, en aval d'une partie du site multiple de clonage du pBlue Script²⁵⁴.

Le pKK214 a ensuite été utilisé pour créer une banque de promoteurs à partir de l'ADN génomique de la souche LVS. Le clonage des fragments chromosomiques en amont de la cassette de résistance au chloramphénicol a permis de sélectionner des promoteurs activés lors de l'infection dans le macrophage. Le pKK214 a également servi à construire le pKK214CAT, par insertion du promoteur *groESL* de *Francisella* en amont du gène *cat*, puis le pKK214GFP, en remplaçant le gène *cat* par le gène *gfp*⁷⁷. La production de la GFP par *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, complétée avec le pKK214GFP, a permis d'étudier la croissance et la survie de la bactérie dans le protozoaire *Acanthamoeba castellanii*, suggérant ainsi le rôle des amibes en tant que réservoir dans la transmission de la tularémie.

Une nouvelle série de vecteurs a ensuite été construite par Maier et collaborateurs en 2004. Le premier vecteur construit fut le pFNLTP1 : plasmide hybride entre le pFNL10 et le plasmide pCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen)²⁵⁷. Tous les plasmides pFNLTPn, construits à partir du pFNLTP1, portent l'origine de répliation *pMB1* d'*E. coli*, spécifique de la famille des

plasmides pUC, apportée par le pCR[®]2.1-TOPO. Maier et collaborateurs ont montré que les vecteurs pFNLTPn étaient stables lors de cultures en milieux liquides de *F. tularensis* LVS sans pression de sélection, ainsi qu'au cours de la croissance de la bactérie dans le macrophage. Parmi les vecteurs construits figurent, le pFNLTP6 *gro-gfp*, utilisé pour la production de la GFP par *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS dans le macrophage et le pFNLTP9, porteur d'une réplicase dont l'activité est dépendante de la température. L'intérêt du pFNLTP9 était de pouvoir rendre ce vecteur non répliatif à 42°C, afin de réaliser, à cette température, une mutagenèse par échange d'allèles.

Par la suite, Maier et collaborateurs ont réutilisé cette série de vecteurs afin de construire un système de mutagenèse aléatoire basé sur le transposon *himar1*. Dans cette étude, le plasmide pFNLTP16H3 a été utilisé comme plasmide suicide et a permis de construire une série de mutants aléatoires.

Dans une autre étude, la série des vecteurs pFNLTPn a servi de base pour construire les plasmides pXP136, pXP160 et pXP167²⁸⁰. Ces vecteurs ont ensuite été utilisés pour tester l'expression du gène de résistance aux β -lactamases *bla* chez *Francisella tularensis* LVS.

La dernière série de vecteurs navettes basée sur le pFNL10 a été construite en 2006 par LoVullo et collaborateurs²⁵⁸. Ils ont construit les vecteurs pMP393, pMP527, pMP529, pMP607 et pMP633, utilisés pour comparer l'efficacité de l'électroporation entre *F. novicida* U112, la souche vaccinale LVS et *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4. Ils ont montré, comme Maier et collaborateurs en 2004, que l'efficacité de transformation dans *F. novicida* U112 était plus faible que celle obtenue avec les autres souches. La présence dans *F. novicida* U112 d'un système de méthylation et de restriction de l'ADN, conduisant à la dégradation de l'ADN exogène, serait l'hypothèse la plus probable expliquant la différence d'efficacité entre *F. novicida* U112 et *F. tularensis*.

Au cours de cette étude, LoVullo et collaborateurs ont également démontré que *AphA -1*, gène de résistance à la kanamycine, était moins bien exprimé dans la souche SCHU S4 par rapport à la souche LVS : l'efficacité de transformation a été améliorée après insertion du promoteur *groESL* devant le gène *AphA-1*.

Les derniers vecteurs navettes adaptés à *Francisella* ont été construits à partir l'origine de réplication du pC194, plasmide à large spectre d'hôtes provenant de *Staphylococcus aureus*²⁶⁰. Trois plasmides ont ainsi été obtenus : le pCU18, plasmide hybride du pC194 et

du pUC18 ; le pCUG1 et le pCUG2, plasmides hybrides porteur du gène *gfp* du pFPV25 sans promoteur. Le pCUG1 a été utilisé pour créer une banque de fragments d'ADN génomique de *F. tularensis* LVS, clonés en amont du gène *gfp*. Un ensemble de promoteurs activés lors de l'infection intracellulaire a ainsi été identifié parmi 20 000 clones testés, en isolant uniquement les clones produisant la GFP dans le macrophage. D'autre part, Rasko et collaborateurs ²⁶⁰ ont vérifié la possibilité de faire coexister le pCUG1 et le pKK214GFP, possédant deux origines de répllication différentes, dans la même bactérie avec *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS. L'utilisation de deux vecteurs navettes dans une même bactérie peut permettre l'étude de mécanismes d'interactions entre deux produits (un promoteur et son régulateur par exemple).

En conclusion, il existe actuellement des outils et des méthodes permettant la manipulation génétique de *Francisella tularensis*. Toutefois leur mise au point est récente. Par exemple la conjugaison date de 2003 ²⁴⁹ et l'électroporation de 2004 ²⁵⁷. D'autre part, l'unique source de vecteurs navettes a longtemps été le pFNL10. Il a fallu attendre jusqu'à 10 ans avant que des outils vraiment exploitables, tels que le pKK214 ²⁵⁴ ou la série de plasmide pFNLTPn ²⁵⁷, soient disponibles. Grâce à ces vecteurs, des gènes rapporteurs, tels que des gènes de résistance aux antibiotiques ou le gène *gfp* ont pu être utilisés, au cours de ces cinq dernières années, afin d'identifier des gènes de virulence de *Francisella tularensis* ^{77, 257, 260, 280}. L'essor des outils de biologie moléculaire adaptés à *Francisella tularensis* est récent et repose actuellement sur deux méthodes de transformation, quelques plasmides suicides et des vecteurs navettes essentiellement basés sur le pFNL10. L'amélioration des techniques et la mise à disposition d'une variété plus large d'outils permettraient d'améliorer les conditions d'étude de la bactérie et de progresser dans la compréhension de cette pathologie.

OBJECTIFS

OBJECTIFS

La première partie de ce mémoire a permis de faire le point sur la tularémie, sur les mécanismes de virulence de son agent étiologique et sur les outils moléculaires disponibles pour la manipulation génétique du genre *Francisella*. Plusieurs remarques peuvent être formulées à ce stade. Premièrement, malgré une forte homologie entre les génomes des différentes espèces de *Francisella*, ces dernières présentent des différences génotypiques et phénotypiques non négligeables qui influent sur leurs exigences nutritionnelles et sur leurs virulences respectives. Ensuite, de nombreuses études ont permis d'identifier des éléments structuraux ou génomiques impliqués dans la croissance intracellulaire et dans la virulence de *Francisella tularensis*, mais pour l'instant les liens entre ces différents facteurs de pathogénicité ne sont pas clairement établis. Enfin, la majorité des études a été réalisée avec la souche atténuée *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS et avec l'espèce faiblement virulente chez l'Homme *F. novicida*. Dans ce contexte, l'extrapolation des conclusions de ces études à *F. tularensis* subsp. *tularensis* est discutable.

L'objectif de cette thèse était d'évaluer le rôle de la phosphatase acide AcpA dans la virulence de *Francisella tularensis*.

A l'issue de ce travail, nous souhaitons posséder nos propres outils moléculaires pour la manipulation génétique des souches pathogènes de *Francisella tularensis* et répondre aux questions suivantes :

- L'enzyme AcpA est-elle un facteur de virulence de *F. tularensis* subsp. *tularensis* ?
- Peut-on considérer que les mécanismes de virulence de *F. novicida* ou de *F. tularensis* subsp. *holarctica* sont identiques à ceux de *F. tularensis* subsp. *tularensis* ? Et par conséquent, peut-on extrapoler les conclusions des études de *F. novicida* ou de *F. tularensis* subsp. *holarctica* à la sous-espèce *tularensis* ?

Dans un premier temps, nous avons évalué le rôle de la phosphatase acide A dans la virulence de *F. tularensis* subsp. *tularensis*. Dans cette perspective, nous avons caractérisé *in vitro* l'activité enzymatique de plusieurs souches du genre *Francisella*. Ensuite, nous avons développé une méthode de mutagenèse qui nous a permis d'obtenir un mutant déficient en AcpA. Enfin, nous avons développé un modèle d'infection expérimentale par voie respiratoire chez la souris.

Par ailleurs, dans un contexte où l'absence de vecteurs navettes a longtemps ralenti l'étude de la bactérie, nous avons développé deux générations de vecteurs navettes répliquatifs chez *E. coli* et chez *Francisella tularensis*. Ce travail a été possible grâce à l'identification et à la caractérisation de deux plasmides naturels à partir de deux souches distinctes de *Francisella philomiragia*.

TRAVAIL EXPERIMENTAL

CHAPITRE I

Étude du rôle de la phosphatase acide A dans la virulence de *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*

I - Introduction

Certains membres de la famille des phosphatases acides (ACPs) sont des facteurs de virulence de pathogènes intracellulaires facultatifs ou obligatoires, tels que *Legionella micdadei*¹¹⁶, *Coxiella burnetii*²²⁸ ou *Leishmania donovani*²²⁹. Les phosphatases acides de ces pathogènes inhibent le stress oxydant dans les cellules phagocytaires, en bloquant la production d'ions superoxydes par hydrolyse de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP₂), messagers intracellulaires nécessaires à l'activation de la NADPH oxydase^{116, 229, 281, 282}.

Francisella tularensis possède quatre phosphatases acides, dont la phosphatase acide AcpA qui est majoritaire²³⁷. Cette enzyme est impliquée dans l'inhibition de la production d'ions superoxyde au cours du stress oxydant des polynucléaires neutrophiles¹⁴². Elle présente des caractères biochimiques, structuraux et catalytiques uniques comparativement aux autres membres de la famille des phosphatases acides. Actuellement, le mécanisme moléculaire conduisant à l'inhibition du stress oxydant des cellules phagocytaires par l'AcpA de *Francisella* n'est pas clairement connu. Nous savons juste qu'il engage une voie d'activation de la NADPH oxydase commune à celles des inositol-phosphates et du PMA^{142, 239}, contrairement aux mécanismes d'inhibition des autres ACPs décrits, qui n'engagent que la voie des inositol-phosphates.

Le rôle de l'AcpA dans la virulence de *Francisella* a uniquement été évalué chez *F. novicida*, souche opportuniste chez l'Homme contrairement à *F. tularensis*. Depuis 1996,

les études réalisées sur ce sujet exposent des résultats contradictoires : d'après Baron et collaborateurs, l'AcpA n'est pas essentielle pour la croissance intracellulaire et la virulence de la bactérie²⁴⁶; d'après Mohapatra et collaborateurs, l'AcpA contribue à la survie intracellulaire et à la virulence de la bactérie au cours des 72 premières heures qui suivent l'infection²³⁶; dans une seconde étude, ces mêmes auteurs montrent que la contribution de l'AcpA dans la virulence de la bactérie n'est pas significative lorsque le relevé de mortalité est réalisé pendant 10 jours après infection par voie respiratoire²³⁷.

Les interprétations de ces précédentes études varient en fonction du modèle d'étude. Néanmoins, l'AcpA est fréquemment citée parmi les facteurs de virulence de *F. novicida* et, par extrapolation, parmi ceux de *F. tularensis*^{143, 260, 283}, malgré des caractères phénotypiques bien distincts entre ces deux espèces, notamment en terme de virulence.

Dans ce contexte, nous avons souhaité évaluer le rôle de la phosphatase acide A dans la virulence de *F. tularensis* en étudiant pour la première fois des souches pathogènes pour l'Homme. L'objectif de notre étude était de déterminer si cette enzyme est impliquée dans la virulence de *F. tularensis* subsp. *tularensis* et d'autre part, de définir si l'extrapolation des résultats obtenus avec *F. novicida* à *F. tularensis* est justifiée.

Dans un premier temps, l'activité enzymatique phosphatase acide a été caractérisée *in vitro* à partir de *F. novicida* et de deux souches virulentes appartenant aux sous-espèces *holarctica* et *tularensis*. Ensuite, une méthode de mutagenèse dirigée a été développée afin de construire un mutant déficient en phosphatase acide A de *F. tularensis* subsp. *tularensis*. Enfin, un modèle d'infection expérimentale par voie respiratoire a été développé chez la souris afin d'évaluer *in vivo* le rôle de l'AcpA dans la virulence de *F. tularensis* subsp. *tularensis*.

II – Matériels et méthodes

II – 1. Souches, plasmides, amorces et conditions de culture

Les bactéries, les plasmides et les amorces utilisés dans cette étude sont présentés dans le [Tableau 19](#) et le [Tableau 20](#).

Tableau 19. Souches bactériennes utilisées au cours de la première étude

Souche	Description ^a	Référence et source
Francisella		
<i>F. novicida</i>	Souche CIP 5612 – Cb ^r , Tp ^r , Ap ^r	CIP
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>	Souche CRSSA 278/06 – Cb ^r , Tp ^r , Ap ^r	Échantillon clinique humain
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>	Souche CRSSA 061/00 – Cb ^r , Tp ^r , Ap ^r	Échantillon clinique humain
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>	LVS (Live Vaccine Strain) – NCTC 10857	NCTC
	Souches (origine)	
	CNEVA/10178/96 (marcassin)	CNEVA/4540/98 (lièvre) AFSSA/1458/03 (lièvre)
	CNEVA/3/97 (lièvre)	CNEVA/6011/98 (lièvre) AFSSA FT78
	CNEVA/3696/97 (lièvre)	CNEVA/11263/98 (lièvre) AFSSA/1685/03 (lièvre)
	CNEVA/4262/97 (lièvre)	CNEVA/907/98 (lièvre) AFSSA/5120/03 (lièvre)
	CNEVA/5838/97 (lièvre)	AFSSA FT27 AFSSA/5566/03 (lièvre)
	CNEVA/6530/97 (lièvre)	AFSSA/2772/99 (lièvre) AFSSA/250/04 (lièvre)
	CNEVA/6670/97 (lièvre)	AFSSA/6446/99 (lièvre) AFSSA/293/04 (humain)
	CNEVA/12379/97 (lièvre)	AFSSA/7124/02 (humain) AFSSA/1168/04 (lièvre)
	CNEVA/1086/98 (lièvre)	AFSSA/8102/02 (lièvre) AFSSA/1165/04 (lièvre)
	CNEVA/952/98 (lièvre)	AFSSA/292/03 (lièvre) AFSSA/1421/04 (lièvre)
	AFSSA FT15	AFSSA/571/03 (lièvre) AFSSA/3814/04 (humain)
	CNEVA/1261/98 (lièvre)	AFSSA/782/03 (humain) AFSSA/177/04/05 (lièvre)
	CNEVA/1386/98 (lièvre)	AFSSA/824/03 (lièvre) AFSSA/841/04/05 (lièvre)
	02/0283	AFSSA/1207/03 (lièvre) 06/143
	CNEVA/2115/98 (lièvre)	
E. coli		
One shot [®] TOP10 chemically competent <i>E. coli</i> .	F <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 ara</i> Δ139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen [®] (Carlsbad, CA)
<i>E. cloni</i> [®] 10G chemically competent cells	F <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) <i>endA1 recA1</i> φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 araD</i> 139 Δ(<i>ara,leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL nupGλ tonA</i>	Lucigen [®] corp. Middleton, WI
<i>E. coli</i> DH5α	F (φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>supE44 relA1 deoR</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169	Invitrogen [®] (Carlsbad, CA)

^a Ap^r Cb^r, Tp^r, résistances à l'ampicilline, à la carbénicilline et au triméthoprime.

Tableau 20. Plasmides et amorces utilisés au cours de la première étude

Plasmide ou amorce	Description ^a	Référence et source
Plasmide		
pCR [®] -XL-TOPO	Plasmide de 3,5-kb pour le clonage de longs produits PCR, Km ^r , zeocin ^r	Invitrogen [®]
pCR [®] 4-TOPO	Plasmide de 3,9-kb pour le clonage de produits PCR, Ap ^r , Km ^r	Invitrogen [®]
pACYC184	Plasmide de 4,2-kb, Cm ^r , Tc ^r	284
pKK214	Plasmide de 4,8-kb. Dérivé du pFNL10, Tc ^r	254
pXL-UpacpADwn	Plasmide de 7,7-kb. Dérivé du pCR [®] -XL-TOPO porteur du fragment UpacpADwn, Km ^r , zeocin ^r	Cette étude
pXL-ΔacpA	Plasmide de 6,0-kb. Dérivé du pXL-UpacpADwn. Délétion du d'une région de 1,7 kb correspondant au gène <i>acpA</i> dans le fragment UpacpADwn, Km ^r , zeocin ^r	Cette étude
pXL-ΔacpA::Cm	Plasmide de 6,8-kb. Dérivé du pXL-ΔacpA. Insertion du gène de résistance Cm du pACYC184, Km ^r , Cm ^r , zeocin ^r	Cette étude
pTOPO-acpA	Plasmide de 5,8-kb. Dérivé du pCR [®] 4-TOPO porteur du gène <i>acpA</i> , Ap ^r , Km ^r	Cette étude
pKK214-acpA	Plasmide de 6,7-kb. Dérivé du pKK214 porteur du gène <i>acpA</i> de <i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> 278/06, Tc ^r	Cette étude
Amorce		
AcpA001	5'-GCAGCAGGATACATATTGTGTCGACGCC-3' – amorce directe pour UpacpADwn	
AcpA002	5'-GTGAGTCTTTTGGTGCACAATTGC-3' – amorce inverse pour UpacpADwn	
AcpA003	5'-TGTATAGTCGACAATTCAAAG-3' – amorce directe pour <i>acpA</i>	
AcpA004	5'-AAGACGTCGACAAACAGTTGG-3' – amorce inverse pour <i>acpA</i>	
V001	5'-GCCACGCTCTTCTCCATCAAG-3' – amorce directe interne au fragment UpacpADwn	
V002	5'-CTGGAGCTAGCTATCAAGATAC-3' – amorce inverse interne au fragment UpacpADwn	
C009 ^b	5'-CGTTGATAGGCCTGTAAGAGG-3' – amorce directe pour la cassette Cm du pACYC184	
C001 ^b	5'-CTTATTCAGGCCTAGCACCAGG-3' – amorce inverse pour la cassette Cm du pACYC184	
S001	5'-TGTATAGTCGACAATTCAAAG-3' – amorce directe pour la région 5' du gène <i>acpA</i>	
S002	5'-CCATCATAATATCCCATGAC-3' – amorce inverse pour la région 5' du gène <i>acpA</i>	

^a Km^r, Ap^r Cb^r, Tp^r, Cm^r and Tc^r, résistances à la kanamycine, à l'ampicilline, à la carbénicilline, au triméthoprim, au chloramphénicol et à la tétracycline.

^b Les régions soulignées correspondent au site de digestion de l'enzyme de restriction *Stu*I.

F. novicida, *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 ont été cultivées à 37°C sous agitation en bouillon BHI-IsoVitalexTM (Becton Dickinson, France) ou sur milieu gélosé BHI-IsoVitalexTM (1% d'IsoVitalexTM pour *F. novicida* ; 2% d'IsoVitalexTM pour les sous-espèces *holarctica* et *tularensis*). Lorsque cela était nécessaire, le milieu gélosé a été additionné avec 2% d'hémoglobine et avec de la kanamycine (concentration finale de 5 ou 10 µg.ml⁻¹) ou du chloramphénicol (2 µg.ml⁻¹). *F. novicida* a été manipulée en laboratoire NSB2 et les sous-espèces *tularensis* et *holarctica* en laboratoire NSB3. Les souches d'*E. coli* ont été cultivées à 37°C en milieu LB (Luria-Bertani), additionné si nécessaire d'ampicilline (100 µg.ml⁻¹), de kanamycine (50 µg.ml⁻¹), de tétracycline (30 µg.ml⁻¹) ou de chloramphénicol (15 µg.ml⁻¹). Tous les antibiotiques ont été fournis par Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La densité cellulaire des cultures a été mesurée à 600 nm à l'aide du photomètre Biophotometer (Eppendorf®, Le Pecq, France).

Pour le dosage, 50 μ L du substrat DiMUP à 200 μ M, dilué dans du *N,N*-diméthylformamide (DMF), ont été ajoutés à 50 μ L de chaque échantillon dilué, préalablement déposé dans une plaque à 96 puits noire. Après une incubation de 2 h à 37°C, la fluorescence a été mesurée à l'aide d'un fluorimètre (FL800, Bio-Tek Instruments, Winooski, US) à des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de 360 et 460 nm, respectivement.

Une gamme étalon a été réalisée avec le 6,8-difluoro-7-hydroxyl-4-méthyl coumarine dilué dans le tampon d'acétate de sodium 0,1 M (pH 5,5), afin de déterminer la quantité de produit formé dans le milieu réactionnel. Les résultats ont été exprimés en nmoles de produit formé, par heure de réaction, par mL de culture, par unité de densité optique (DO) à 600 nm de la culture (nmol/h/mL/UDO). Chaque échantillon a été dosé trois fois. Les valeurs reportées dans les graphiques correspondent aux moyennes des trois résultats plus ou moins l'écart-type.

II – 3. Manipulation de l'ADN

Les PCR ont été réalisées sur un thermocycler PTC 200 (MJ Research, Waltham, Mass.) avec le réactif « PuRe TaqTM Ready-To-GoTM PCR beads » (GE Healthcare, Buckinghamshire, GB) selon les recommandations du fournisseur. Les ligations ont été réalisées avec la T4DNA ligase (New England Biolabs, Beverly, Mass.) et les déphosphorylations avec la phosphatase alcaline d'intestin de veau (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, Fermentas, Ontario, Canada) selon les recommandations des fournisseurs. L'ADN plasmidique d'*E. coli* a été préparé à l'aide du « QIAprep Spin Miniprep Kit » ou du « QIAGEN plasmid midi kit » (QIAGEN, France). L'ADN plasmidique de *Francisella* a été extrait par la méthode de Kado-Liu modifiée²⁸⁵ (Annexe II). L'ADN génomique de *Francisella* a été extrait selon la technique décrite dans l'Annexe III. Les oligonucléotides ont été synthétisés par Eurogentec (Liège, Belgique).

II – 4. Transformation des bactéries

Les souches *E. coli* TOP10 (Invitrogen[®], Carlsbad, CA) et *E. cloni*[®] 10G (Lucigen[®] corporation, Middleton, WI) ont été transformées par choc thermique selon les recommandations du fournisseur. La souche DH5 α a été transformée selon la méthode décrite dans l'Annexe IV²⁸⁶. Les souches de *Francisella* ont été transformées par électroporation²⁵⁷ (Annexe V) et par cryotransformation²⁸⁷ (Annexe VI).

II – 5. Construction du vecteur suicide pXL- Δ acpA::Cm et du vecteur pKK214-acpA

Afin de construire le vecteur suicide pXL- Δ acpA::Cm, nous avons utilisé le plasmide commercial pCR[®]-TOPO-XL, non répliatif chez *Francisella*. Le vecteur pXL- Δ acpA::Cm a été obtenu en trois étapes nécessitant la construction de deux vecteurs intermédiaires : le pXL-UpacpADwn et le pXL- Δ acpA (Figure 24).

Le pXL-UpacpADwn a été obtenu par le clonage d'une région de 4 203 pb de l'ADN génomique de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 dans le plasmide pCR[®]-TOPO-XL. La UpacpADwn région, contenant le gène *acpA*, a été amplifiée par PCR à l'aide des amorces AcpA001 et AcpA002, selon les conditions d'amplification suivantes : une étape de 5 min à 95°C, suivie de 30 cycles de 1 min à 95°C, 1 min à 58°C et 4 min à 72°C, puis une étape de 4 min à 72°C. Après migration du produit PCR sur gel d'agarose à 0,8%, contenant du cristal violet à 1,6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour la visualisation de l'ADN, la bande a été extraite du gel, puis a été clonée dans le plasmide pCR[®]-TOPO-XL selon les recommandations du fournisseur. Les bactéries *E. coli* One shot[®] TOP10 ont ensuite été transformées avec le produit de clonage. La construction obtenue, nommée pXL-UpacpADwn et présentant une taille de 7 722 pb, a été vérifiée par linéarisation du plasmide avec l'enzyme *Bam*HI. Le résultat a été confirmé par amplification PCR à l'aide des couples d'amorces AcpA003/AcpA004 et V001/V002 permettant d'obtenir deux fragments d'ADN de 4 203 pb et de 2 728 pb à partir de cette construction.

Le plasmide pXL- Δ acpA a été obtenu à partir du pXL-UpacpADwn par délétion d'un fragment de 1 674 pb, contenant la région codante du gène *acpA*. Le plasmide pXL-UpacpADwn a été digéré avec l'enzyme de restriction *Ssp*I afin d'en extraire le fragment de 1 674 pb. Après séparation des produits de la digestion sur gel d'agarose à 0,8%-BET, le fragment résiduel de 6 048 pb, délété de la région codante du gène *acpA*, a été extrait du gel, puis ligué afin de recirculariser le vecteur pXL- Δ acpA. Les bactéries compétentes *E. coli*[®] 10G ont ensuite été transformées avec le produit de ligation. Après extraction de l'ADN plasmidique des clones sélectionnés, la construction pXL- Δ acpA a été vérifiée par amplification PCR avec les amorces V001 et V002, permettant d'obtenir un fragment de 1 054 pb.

Le vecteur pXL- Δ acpA::Cm a été obtenu à partir du pXL- Δ acpA par insertion d'un gène de résistance au chloramphénicol dans la région Δ acpA. La cassette Cm du plasmide

pACYC184²⁸⁴ a été amplifiée par PCR avec les amorces C009 et C001 (porteuse du site de restriction *StuI*), selon les conditions d'amplification suivantes : une étape de 5 min à 95°C, suivie de 30 cycles de 1 min à 95°C, 1 min à 55°C et 1 min 30 à 72°C, puis une étape de 4 min à 72°C. Le produit PCR obtenu a été digéré par *StuI*, afin de générer des bouts francs, puis a été inséré par ligation dans le pXL- Δ *acpA*, préalablement digéré par *SspI* et déphosphorylé. Les bactéries compétentes *E. coli*[®] 10G ont été transformées avec le produit de ligation. Après extraction de l'ADN plasmidique des clones sélectionnés, le vecteur pXL- Δ *acpA*::Cm a été vérifiée par digestion avec l'enzyme *EcoRI* permettant d'obtenir quatre fragments de 3 501 pb, 1 776 pb, 1 049 pb et 523 pb.

Afin de compléter le mutant de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 déficient en phosphatase acide A, le vecteur pKK214-*acpA*, répliquatif chez *Francisella* et porteur du gène *acpA* de la souche sauvage, a été construit (Figure 25). Le vecteur pKK214-*acpA* a été obtenu par insertion du gène *acpA* dans le pKK214²⁵⁴. Le gène *acpA* de l'ADN génomique de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 a été amplifié par PCR à l'aide des amorces AcpA003 et AcpA004, selon les conditions d'amplification suivantes : une étape de 5 min à 95°C, suivie de 30 cycles de 1 min à 95°C, 1 min à 53°C et 1 min 30 à 72°C, puis une étape de 4 min à 72°C. Dans un premier temps, le produit PCR a été cloné dans le plasmide pCR[®]4-TOPO. Les bactéries *E. coli* One shot[®] TOP10 ont été transformées avec le produit de clonage selon les recommandations du fournisseur. Après extraction plasmidique, la construction intermédiaire obtenue, nommée pTOPO-*acpA*, a été vérifiée par digestion avec l'enzyme *EcoRI*, permettant d'obtenir deux fragments de 3 956 pb et de 1 942 pb. Le gène *acpA* a ensuite été extrait du pTOPO-*acpA*, puis cloné dans le pKK214. Pour cela, la construction pTOPO-*acpA* a été digérée par l'enzyme de restriction *EcoRI*, le produit de digestion a été séparé sur gel d'agarose à 0,8%-BET. Le fragment de 1 942 pb correspondant au gène *acpA* a été extrait, puis inséré dans le pKK214, préalablement digéré par *EcoRI* et déphosphorylé. Les bactéries *E. coli* DH5 α ont été transformées avec le produit de ligation par la méthode décrite dans l'Annexe IV. Après extraction de l'ADN plasmidique des clones sélectionnés, le vecteur pKK214-*acpA*, présentant une taille de 6 742 pb, a été vérifiée par digestion avec l'enzyme *EcoRI* permettant d'obtenir deux fragments de 4 800 pb et de 1 942 pb.

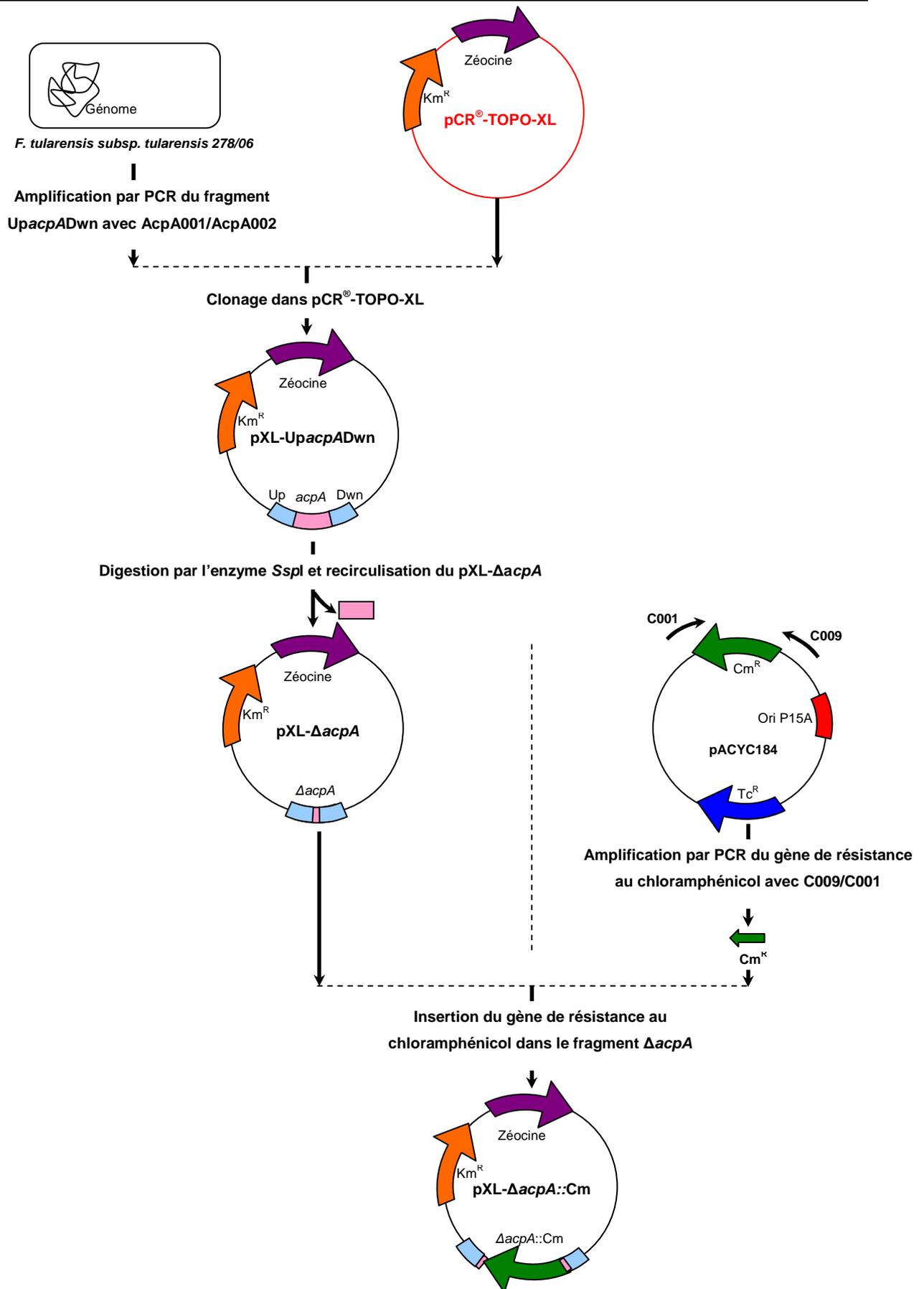


Figure 24. Construction du vecteur suicide **pXL- Δ *acpA*::*Cm***

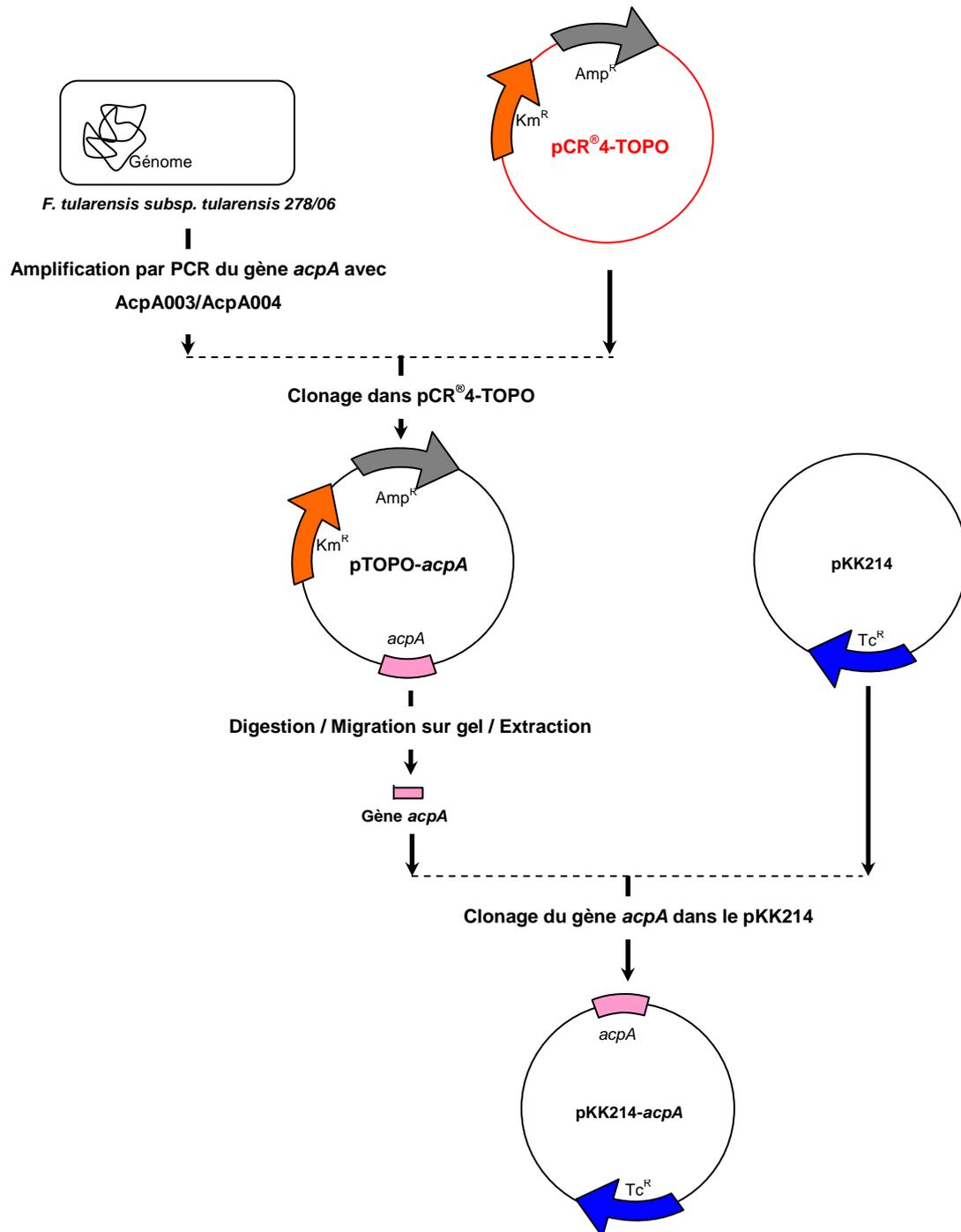


Figure 25. Construction du vecteur pKK214-*acpA*

II – 6. Modèle d'infection expérimentale chez la souris

Un modèle d'infection par instillation nasale a été développé chez la souris afin de déterminer les doses létales 50 (DL50) de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 et de comparer les virulences entre *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 et son mutant déficient en AcpA.

Les souris Swiss femelles de huit semaines utilisées pour les expérimentations ont été fournies par le centre d'élevage R. Janvier (Le Genest St. Isle, France). Les études décrites ci-dessous ont été approuvées par le comité d'éthique du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées sous le numéro de dossier n°2006/24. *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 ont été cultivées à 37°C sous agitation dans des fioles de 250 mL. Les cultures ont étéensemencées au 1/20^{ème} dans 25 mL de bouillon BHI-IsoVitaleXTM à partir de précultures de 24 h. Les souris ont été infectées à partir de cultures diluées dans du sérum physiologique. Les concentrations bactériennes des dilutions utilisées pour infecter les souris ont été déterminées par deux méthodes de dénombrement en milieu solide : par étalement et par inclusion. Pour le dénombrement par étalement, 100 µL de chaque dilution ont été étalés sur des boîtes de gélose chocolat enrichie. Les colonies ont été dénombrées après 4 jours d'incubation à 37°C en atmosphère ambiante. Pour le dénombrement en inclusion, 1 mL de chaque dilution a été déposé dans une boîte de Pétri, puis inclus dans un volume de 20 mL de gélose BHI-IsoVitaleXTM en surfusion. Les colonies ont été comptées après 6 à 10 jours d'incubation à 37°C en atmosphère ambiante. Chaque dénombrement a été réalisé en double à partir de trois dilutions de 10 en 10. Seules les boîtes de Pétri contenant entre 30 et 300 colonies ont été interprétées²⁸⁸.

La détermination des DL50 a été réalisée à l'aide de 6 lots de 8 souris. Chaque lot a été infecté à une dose définie par instillation nasale de 30 µL d'une dilution adéquate de la culture dans du sérum physiologique. La mortalité des souris infectées a été suivie pendant 4 semaines. Les DL50 ont été calculées par la méthode de Reed et Muench²⁸⁹.

La comparaison entre les virulences de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 et de son mutant déficient en AcpA a été réalisée à partir de deux lots de 20 souris. Chaque lot a été infecté par instillation nasale avec l'une ou l'autre des souches à une dose voisine de la DL50 de la souche sauvage (30 UFC). La survie des souris a été suivie pendant 24 jours, puis a été analysée par la méthode de Kaplan-Meier²⁹⁰ à l'aide du logiciel Graphpad Prism[®]

(La Jolla, CA). Les courbes de survie ont été comparées par le test log-rank²⁹¹ à l'aide de ce même logiciel. La probabilité minimale d'observer une différence significative entre les courbes de survie de la souche sauvage et la souche mutée a été fixée à 0,05.

II – 7. Analyse des séquences nucléotidiques et protéiques.

Afin de caractériser les gènes *acpA* des souches de la sous-espèce *holarctica*, une région de 715 pb à l'extrémité 5' du gène *acpA* a été amplifiée par PCR à l'aide des amorces S001 et S002, à partir de l'ADN génomique de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06, de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et des souches CNEVA/2115/98, CNEVA/4540/98, CNEVA/6011/98, CNEVA/11263/98, CNEVA/907/98, AFSSA FT27, AFSSA/2772/99, 06/143. Les conditions d'amplification ont été les suivantes : une étape de 5 min à 95°C, suivie de 30 cycles de 1 min à 95°C, 1 min à 60°C et 40 s à 72°C, puis une étape de 4 min à 72°C. Les produits PCR ont ensuite été séquencés par Cogenics (Meylan, France) à partir des amorces S001 et S002.

Les alignements de séquences nucléotidiques ont été réalisés avec le programme en ligne CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>, dernière accession 20 septembre 2008). La prédiction des séquences protéiques à partir de régions codantes des séquences nucléotidiques a été réalisée à l'aide du programme de traduction en ligne disponible sur le site Expasy (<http://us.expasy.org/tools/dna.html>, dernière accession 20 septembre 2008).

III – Résultats

III – 1. Caractérisation *in vitro* de l'activité phosphatase acide à partir de trois souches du genre *Francisella*.

L'activité phosphatase acide a été mesurée dans les surnageants de cultures et dans les extraits intracellulaires de *F. novicida* 244/05, de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 (Figure 26).

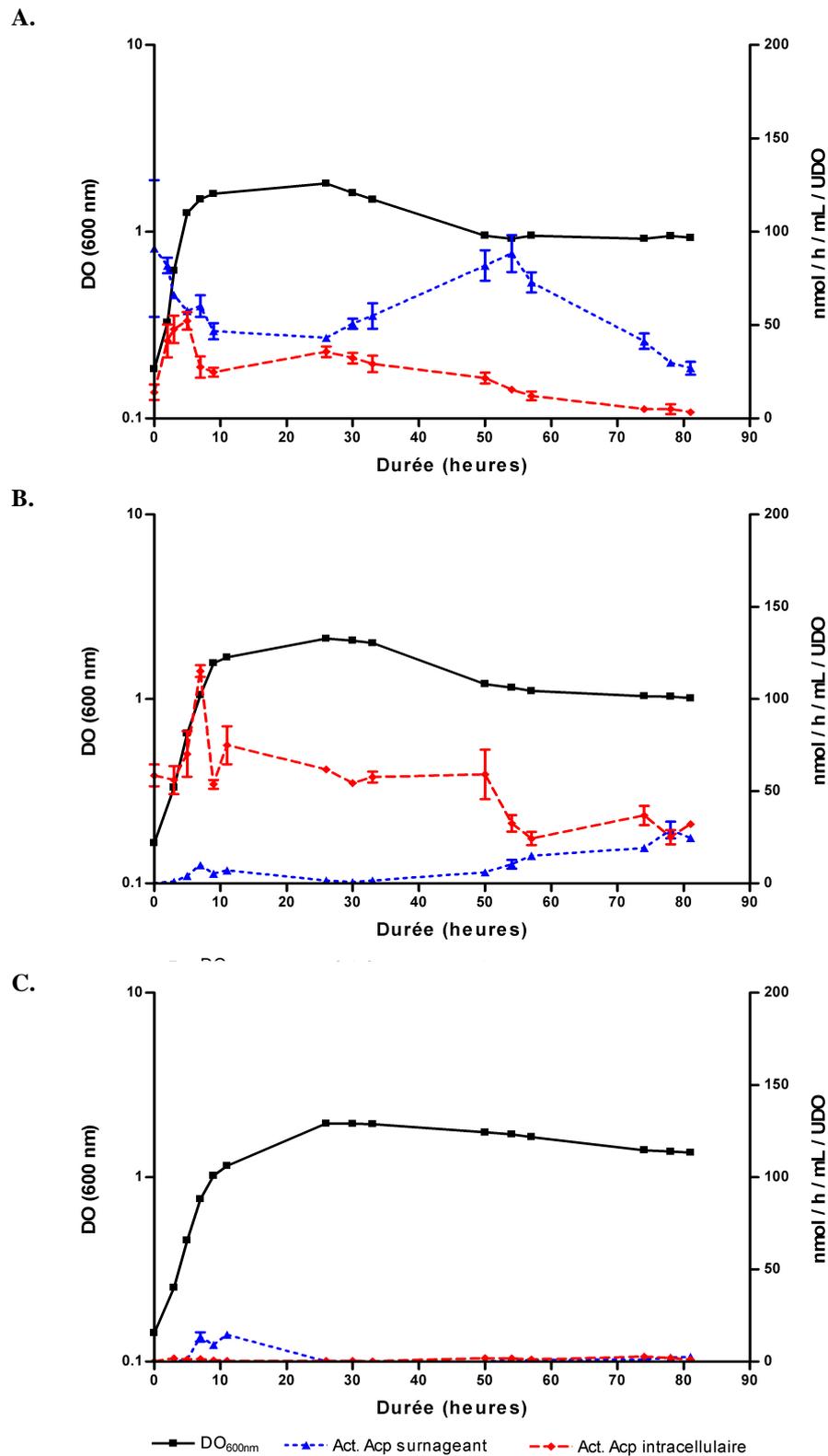


Figure 26. Courbes de croissance (■) et évolution de l'activité phosphatase acide dans les surnageants de culture (▲) et dans les extraits intracellulaires (◆) de *F. novicida* 244/05 (A), de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 (B) et de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 (C). Les valeurs d'activité phosphatase acide reportées correspondent aux moyennes de trois valeurs \pm l'écart-type, représenté par les barres d'erreurs.

Les trois courbes de croissances ont des profils proches : elles atteignent un maximum de DO à 600 nm voisin de 2. Cependant, *F. novicida* atteint plus rapidement la phase stationnaire comparativement aux deux souches de *F. tularensis*, indiquant une croissance plus rapide.

En ce qui concerne l'activité phosphatase acide mesurée dans les surnageants de cultures et dans les extraits intracellulaires, la première observation concerne *F. tularensis* subsp. *holarctica* pour laquelle l'activité enzymatique détectée est extrêmement faible. Elle atteint dans le surnageant une valeur de 17 nmol/h/mL/UDO après 11 h de culture et aucune activité intracellulaire n'a été détectée.

A l'inverse, une activité phosphatase acide a été détectée dans les surnageants de cultures et dans les extraits intracellulaires de *F. novicida* et de *F. tularensis* subsp. *tularensis*. Toutefois les profils obtenus pour ces deux souches sont différents.

L'activité enzymatique mesurée dans les surnageants de *F. novicida* est stable au cours de la phase stationnaire de croissance, puis augmente pendant la phase de déclin jusqu'à atteindre un maximum de 88 nmol/h/mL/UDO. Elle diminue ensuite brutalement après 54 h de culture. L'activité enzymatique mesurée dans les extraits intracellulaires est plus faible que celle mesurée dans les surnageants, suggérant que l'AcpA de *F. novicida* est en partie sécrétée dans le milieu extérieur. Elle atteint un maximum de 52 nmol/h/mL/UDO après 7 h de culture en fin de phase exponentielle. Elle augmente ensuite pendant la phase stationnaire et diminue pendant la phase de déclin. L'augmentation de l'activité extracellulaire et la diminution de l'activité intracellulaire pendant la phase de déclin peuvent être associées à la libération de l'enzyme dans le surnageant, consécutive à la mort et à la lyse des bactéries.

L'activité enzymatique mesurée dans les surnageants de *F. tularensis* subsp. *tularensis* est faible. Elle présente une valeur de 10 nmol/h/mL/UDO après 7 h de culture, puis diminue pendant la phase stationnaire. Elle augmente ensuite pendant la phase de déclin jusqu'à atteindre un maximum de 30 nmol/h/mL/UDO après 78 h de culture. L'activité enzymatique mesurée dans les extraits intracellulaires est plus élevée que l'activité mesurée dans les surnageants, suggérant que l'AcpA de *F. tularensis* subsp. *tularensis* n'est pas, ou très faiblement, sécrétée dans le milieu extérieur. Elle atteint un maximum de 115 nmol/h/mL/UDO après 7h de culture en fin de phase exponentielle. Elle se stabilise

ensuite pendant la phase stationnaire de croissance avec des valeurs proches de 60 nmol/h/mL/UDO, puis diminue pendant la phase de déclin. L'augmentation de l'activité extracellulaire et la diminution de l'activité intracellulaire pendant la phase de déclin peuvent être associées à la libération de l'enzyme dans le surnageant, consécutive à la mort et à la lyse des bactéries.

En considérant l'ensemble des résultats, il apparaît très nettement que les trois souches étudiées ne présentent pas les mêmes profils d'activité phosphatase acide au cours d'une culture en milieu liquide : l'activité mesurée à partir de la culture de *F. tularensis* subsp. *holarctica* est extrêmement faible, voire nulle ; l'activité mesurée à partir de la culture de *F. novicida* est majoritairement extracellulaire, indiquant très probablement une sécrétion de l'enzyme ; l'activité mesurée à partir de la culture de *F. tularensis* subsp. *tularensis* est majoritairement intracellulaire.

III – 2. Identification d'une mutation dans le gène *acpA* chez *F. tularensis* subsp. *holarctica*.

Les surnageants et les extraits intracellulaires de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 présentant une activité enzymatique extrêmement faible au cours de la culture en milieu liquide, nous nous sommes orientés vers une analyse du gène *acpA* de cette sous-espèce.

Dans un premier temps, nous avons comparé les gènes *acpA* de *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS et de *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 à partir des séquences génomiques disponibles dans la base de données GenBank, sous les numéros d'accès AM233362 et AJ749949. Cette analyse a permis d'identifier cinq mutations dans la région codante du gène *acpA* de *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS comparativement à celle du gène de *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4. Une d'entre elles, susceptible de décaler le cadre de lecture du gène, a particulièrement retenu notre attention : l'insertion d'une thymidine 48 pb après la première base du codon d'initiation de la traduction. Cette mutation par insertion, jamais décrite auparavant, a été dénommée iT48 ([Figure 27](#)).

LVS	ATGAAGCTCAATAAAATTACTTTAGGAATTTTAAGTCTAAGTATCGC	60
SCHU S4	ATGAAGCTCAATAAAATTACTTTAGGAATTTTAAGTCTAAGTATCGC	
LVS	TGCCACAGATGTGAATAATAGCAAACCAATGATATGGAACCTTTGTA	120
SCHU S4	TGCCACAGATGTGAATAATAGCAAACCAATGATATGGAACCTTTGTA	
LVS	AAAATTATTTAATAATGCGAATACTCTAAAACTACAACCTCCAATAAAGCAGTAGTAAT	180
SCHU S4	AAAATTATTTAATAATGCGAATACTCTAAAACTACAACCTCCAATAAAGCAGTAGTAAT	

Figure 27. Alignement de séquences du gène *acpA* de *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS et de *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4. L'alignement ci-dessus correspond à 180 pb de la région 5' du gène *acpA* de 1 545 pb. D'après les séquences déposées dans GenBank sous les numéros d'accèsion AM233362 et AJ749949 pour les souches LVS et SCHU S4, respectivement. La mutation iT48 est surlignée en rouge.

La prédiction de la séquence protéique à partir de la région codante du gène *acpA* de *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS a confirmé notre hypothèse. Le premier codon stop, très probablement à l'origine de l'interruption de la traduction de l'ARN messager du gène *acpA*, apparaît après le 25^{ème} résidu de la séquence protéique prédite (Figure 28).

A.

```

M K L N K I T L G I L S L S I A T T T F A T D V N N S K P N D Y G T L V K
I K Q K L F N N A N T L K T T T P I K H V V I I F Q E N N S F D R Y F G M
Y P N A K N P E G E P K F V A K E N T P N V N G L T K Q L L E N N P N T K
N P Y R L D R N F Q P C S Q N H E Y H Q E I S S F N G G L M N K F V E H G
G H D N D T Y K Q N C D G Q V M G Y Y D G N T V T A L W N Y A Q N F A L N
D N T F G T T F G P S T P G A L N L V A G A N G P A M S P S G N L E N I E
N S Y I I D D P N P Y Y D D C S Y G T S K S G D T N T A V A K I T D G Y N
I G H Y L T Q K G I T W G W F Q G G F K P T S Y S G K T A I C D A M S T N
K F G I K S R D Y I P H H E P F N Y W K E T S N P H H L A P S D D K Y I G
S N D Q A N H Q Y D I S E F W K A L D Q N T M P A V S Y L K A P G Y Q D G
H G G Y S N P L D E Q E W L V N T I N R I K Q S K D W D S T A I I I I Y D
D S D G D Y D H V Y S P K S Q F S D I K G R Q G Y G P R L P M L V I S P Y
T K A N Y I D H S L L N Q A S V L K F I E Y N W G I G S V S K Y S N D K Y
S N N I L N M F D F N K K Q K T P K L I L D P K T G L V V D K L N Stop

```

B.

```

M K L N K I T L G I L S L S I A N N D F C H R C E Stop Stop Q T K Stop L W
N S C K N R T K I I Stop Stop C E Y S K N Y N S N K A R S N N I P R E Stop
L F Stop Stop I L W N V P Stop C Q K P R G Stop A K I C S Q R K Y S K C
Stop W S D K T I I R E Stop S K Y K K S L S F R Stop K F P T L L T K S
Stop V P S R N F F F Stop W W I N E Q I C Stop T W W S Stop Stop H L
Stop T K L Stop W S S H G I L Stop W Stop Y C H S I M E L R T K F R S K
Stop Stop Y V W Y N F W S I N T W C S Stop P S G W C K W S S N E S K W
Stop F R K Y Stop K Q L Y H Stop Stop S Stop P I L R Stop L L L W Y K Stop
I W R Y K Y S C S K N Y Stop W L Stop Y W T L S N S K R Y Y L G L V P R R
I Q T N K L L W Stop N S N M Stop C Y E H Stop Stop V R Y K I K R L Y T S
S Stop A F Stop L L E R D I K P S S S S T K Stop Stop Stop V Y R Stop Stop
Stop P S Stop P S V R H K Stop I L E G S Stop S K Q H A C G K L L K S S W
I S R W S W R L L K P S R Stop T R M A S Q Y Y Stop Stop N Q T I K R L G
Stop H S N Y N Y L Stop Stop L Stop W Stop L Stop P C L Q S K I T V Stop R
Y Stop R K T R L W T K V T N A C Y F S L Y Stop S K L Y Stop S F I T Stop
S S I C T Stop V Y R I Stop L G H W L S Stop Stop V Stop Stop Stop Stop I
L K Q Y L K H V Stop F Stop Stop K T K N T K T D F R P Stop D R I S S G
Stop I K L

```

Figure 28. Prédiction des séquences protéiques à partir des gènes *acpA* de *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 (A) et de *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS (B). Les codons stop sont notés en rouge.

Nous avons ensuite fait séquencés les régions 5' des gènes *acpA* des souches de notre étude, *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06, à l'aide des amorces S001 et S002, afin de vérifier si la mutation iT48 était présente chez la souche 061/00 et absente chez les souche 278/06 (Figure 29).

```

                .   :   .   :   .   :   .   :   .   :   .   :   .   :
278/06          ATGAAGCTCAATAAAATTACTTTAGGAATTTTAAGTCTAAGTATCGC-AACAACGACTTT      60
061/00          ATGAAGCTCAATAAAATTACTTTAGGAATTTTAAGTCTAAGTATCGC AACAACGACTTT
                .   :   .   :   .   :   .   :   .   :   .   :   .   :
278/06          TGCCACAGATGTGAATAATAGCAAACCAAATGATTATGGAACCTTGTAAAAATAGAACA      120
061/00          TGCCACAGATGTGAATAATAGCAAACCAAATGATTATGGAACCTTGTAAAAATAGAACA
                .   :   .   :   .   :   .   :   .   :   .   :   .   :
278/06          AAAATTATTTAATAATGCGAATACTCTAAAAACTACAACCCCAATAAAGCACGTAGTAAT      180
061/00          AAAATTATTTAATAATGCGAATACTCTAAAAACTACAACCTCCAATAAAGCACGTAGTAAT

```

Figure 29. Alignement de séquences de la région 5' du gène *acpA* de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06. L'alignement ci-dessus correspond à 180 pb de la région 5' du gène *acpA* de 715 pb. La mutation iT48 est surlignée en rouge.

Cette analyse a confirmé l'absence de la mutation iT48 chez *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 et sa présence chez *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00. Nous avons conclu de ce résultat que l'absence d'activité phosphatase dans les surnageants de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 était due à l'insertion iT48, à l'origine d'un décalage du cadre de lecture de l'ARNm correspondant au gène *acpA*.

Après avoir identifié la mutation chez *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS et chez *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00, nous avons souhaité vérifier si iT48 était une caractéristique de la sous-espèce *holarctica*. Afin de vérifier cette hypothèse, l'activité phosphatase acide a été mesurée à partir des surnageants de cultures de 36 souches différentes appartenants à la sous-espèce *holarctica* (Figure 30).

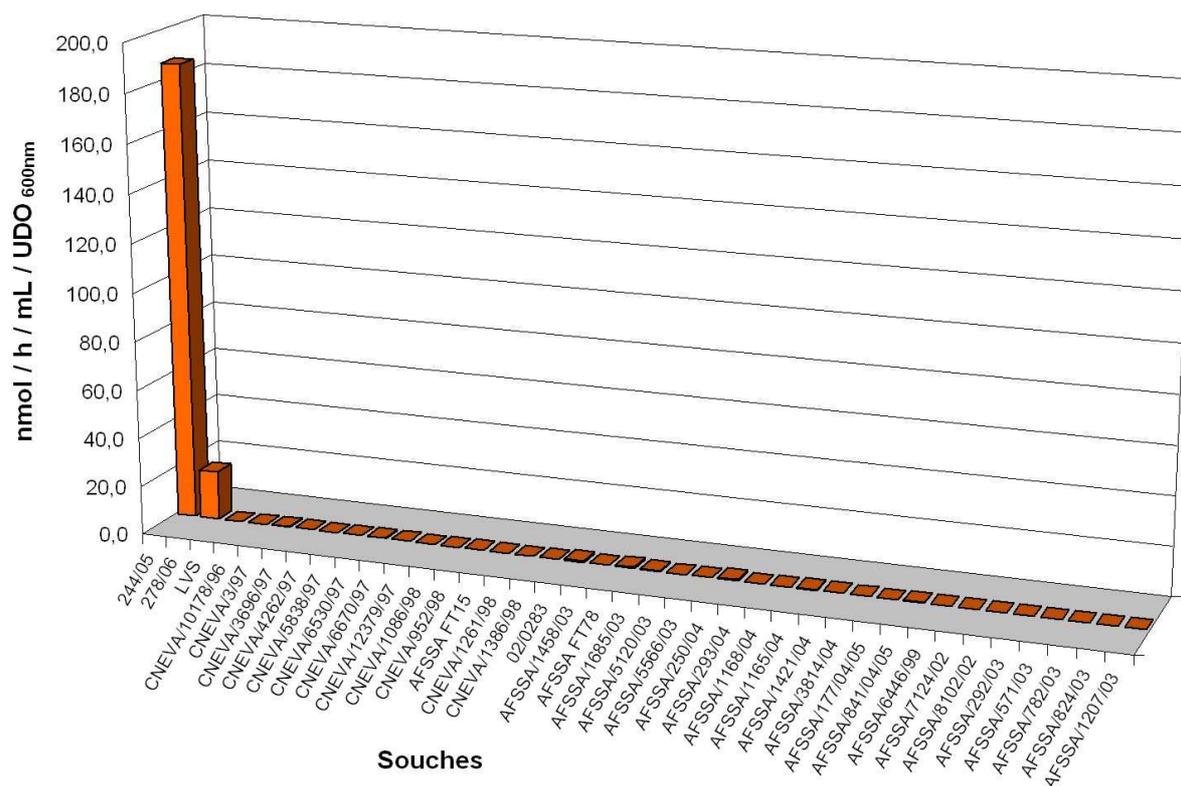


Figure 30. Mesures de l'activité phosphatase acide à partir de surnageants de culture de 36 souches de la sous-espèce *holarctica*. Activité mesurée à partir de cultures de 48 h réalisées dans 5 mL de bouillon BHI-IsoVitaleX™. Témoins positifs : surnageants de culture de *F. novicida* 244/05 et de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06.

Aucune activité phosphatase acide n'a pu être détectée dans les surnageants de culture des 36 souches de la sous-espèce *holarctica* testées, confortant l'hypothèse selon laquelle le gène *acpA* est muté chez cette sous-espèce. Les régions 5' des gènes *acpA* de huit souches de la sous-espèce *holarctica* ont ensuite été séquencées pour vérification.

La comparaison de leurs séquences aux précédentes et aux séquences disponibles sur GenBank a confirmé la présence de l'insertion iT48 dans le gène *acpA* des souches de *F. tularensis* subsp. *holarctica* (Figure 31).

En conclusion de cette analyse, les études phénotypique et génotypique de 38 souches de *F. tularensis* ont montré que l'absence d'activité phosphatase acide dans les surnageants de culture des souches de la sous-espèce *holarctica* était due à la présence d'une mutation du gène *acpA*, spécifique de cette sous-espèce, à l'origine d'une interruption de la traduction de l'ARNm en protéine.

SCHU4	ATGAAGCTCAATAAAAATTACTTTAGGAATTTTAAGTCTAAGTATCGC-AACAACGACTTT	60
FSC198	ATGAAGCTCAATAAAAATTACTTTAGGAATTTTAAGTCTAAGTATCGC-AACAACGACTTT	
WY96-3418	ATGAAGCTCAATAAAAATTACTTTAGGAATTTTAAGTCTAAGTATCGC-AACAACGACTTT	
278/06	ATGAAGCTCAATAAAAATTACTTTAGGAATTTTAAGTCTAAGTATCGC-AACAACGACTTT	
LVS	ATGAAGCTCAATAAAAATTACTTTAGGAATTTTAAGTCTAAGTATCGC-AACAACGACTTT	
OSU18	ATGAAGCTCAATAAAAATTACTTTAGGAATTTTAAGTCTAAGTATCGC-AACAACGACTTT	
FTNF002-00	ATGAAGCTCAATAAAAATTACTTTAGGAATTTTAAGTCTAAGTATCGC-AACAACGACTTT	
061/00	ATGAAGCTCAATAAAAATTACTTTAGGAATTTTAAGTCTAAGTATCGC-AACAACGACTTT	
CNEVA/2115/98	ATGAAGCTCAATAAAAATTACTTTAGGAATTTTAAGTCTAAGTATCGC-AACAACGACTTT	
CNEVA/4540/98	ATGAAGCTCAATAAAAATTACTTTAGGAATTTTAAGTCTAAGTATCGC-AACAACGACTTT	
CNEVA/6011/98	ATGAAGCTCAATAAAAATTACTTTAGGAATTTTAAGTCTAAGTATCGC-AACAACGACTTT	
CNEVA/11263/98	ATGAAGCTCAATAAAAATTACTTTAGGAATTTTAAGTCTAAGTATCGC-AACAACGACTTT	
CNEVA/907/98	ATGAAGCTCAATAAAAATTACTTTAGGAATTTTAAGTCTAAGTATCGC-AACAACGACTTT	
AFSSA FT27	ATGAAGCTCAATAAAAATTACTTTAGGAATTTTAAGTCTAAGTATCGC-AACAACGACTTT	
AFSSA/2772/99	ATGAAGCTCAATAAAAATTACTTTAGGAATTTTAAGTCTAAGTATCGC-AACAACGACTTT	
06/143	ATGAAGCTCAATAAAAATTACTTTAGGAATTTTAAGTCTAAGTATCGC-AACAACGACTTT	

Figure 31. Alignement de séquences de la région 5' des gènes *acpA* de souches de *F. tularensis* – Comparaison entre les sous-espèces *tularensis* et *holarctica*. L'alignement ci-dessus correspond à 60 pb de la région 5' du gène *acpA* sur les 715 pb alignés, à partir des gènes *acpA* de *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 (AJ749949), de *F. tularensis* subsp. *tularensis* FSC198 (AM286280), de *F. tularensis* subsp. *tularensis* WY96-3418 (CP000608), *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06, de *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS (AM233362), de *F. tularensis* subsp. *holarctica* OSU18 (CP000437), de *F. tularensis* subsp. *holarctica* FTNF002-00 (CP000803), de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et de huit souches de la sous-espèce *holarctica* (CNEVA/2115/98, CNEVA/4540/98, CNEVA/6011/98, CNEVA/11263/98, CNEVA/907/98, AFSSA FT27, AFSSA/2772/99, 06/143). La mutation iT48 est surlignée en rouge. Les séquences en gras sont issues de la base de données GenBank, les autres ont été déterminées par séquençage.

III – 3. Mesure des doses létales 50 de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06.

III – 3. 1. Comparaison de deux méthodes pour le dénombrement de *Francisella tularensis*.

Lors de la détermination des DL50, les méthodes de dénombrement en milieu solide par étalement et par inclusion ont été comparées. Les résultats ont montré que la méthode de dénombrement par étalement sous-estimait la concentration bactérienne des suspensions d'environ un log comparativement à la méthode par inclusion. Le [Tableau 21](#) présente les résultats obtenus pour le dénombrement de la suspension mère de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00.

Tableau 21. Détermination de la concentration bactérienne de la suspension mère de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00. Méthodes de dénombrement par inclusion et par étalement.

Méthode	Inclusion (BHI-IsoVitalex™)						Étalement (GC enrichie)					
	10 ⁻⁷		10 ⁻⁸		10 ⁻⁹		10 ⁻⁶		10 ⁻⁷		10 ⁻⁸	
UFC dénombrées ^a	>300	>300	270	240	39	41	270	200	18	12	1	1
UFC.mL ⁻¹	NI	NI	2,7.10 ¹⁰	2,4.10 ¹⁰	3,9.10 ¹⁰	4,1.10 ¹⁰	2,7.10 ⁹	2,0.10 ⁹	NI	NI	NI	NI
UFC.mL ⁻¹ moyen	NI	NI	3,3.10 ¹⁰				2,4.10 ⁹		NI	NI	NI	NI

^a Seules les boîtes comprenant entre 30 et 300 colonies sont considérées comme interprétables²⁸⁸.

NI : non interprétable.

La densité bactérienne de la suspension mère de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 a été estimée à 3,3.10¹⁰ UFC par inclusion et à 2,4.10⁹ UFC par étalement. Des résultats similaires ont été obtenus pour le dénombrement de la suspension mère de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 estimée à 1,2.10⁹ UFC par inclusion et à 2,0.10⁸ UFC par étalement et pour les dénombrements directs des doses utilisées pour l'infection des souris (Tableau 22).

Tableau 22. Comparaison des méthodes de dénombrement par inclusion et par étalement

Suspension bactérienne	Étalement	Inclusion
	Concentration en UFC.mL ⁻¹	Concentration en UFC.mL ⁻¹
Dose 1 (DL50 de 061/00)	2,5.10 ³	6,5.10 ⁴
Dose 2 (DL50 de 061/00)	2,2.10 ³	3,5.10 ⁴
Dose 3 (DL50 de 061/00)	1,2.10 ³	2,0.10 ⁴
Dose 4 (DL50 de 061/00)	1,1.10 ³	8,9.10 ³
Dose 5 (DL50 de 061/00)	1,4.10 ²	2,7.10 ³
Dose 6 (DL50 de 061/00)	25	9,4.10 ²
Dose 1 (DL50 de 278/06)	7,0.10 ²	5,6.10 ³
Dose 2 (DL50 de 278/06)	4,1.10 ²	2,2.10 ³
Dose 3 (DL50 de 278/06)	35	1,1.10 ³
Dose 4 (DL50 de 278/06)	55	1,7.10 ²
Dose 5 (DL50 de 278/06)	10	1,1.10 ²
Dose 6 (DL50 de 278/06)	0	23

Constatant cette variation importante entre le dénombrement par étalement et le dénombrement par inclusion, nous avons choisi d'utiliser la méthode de dénombrement par inclusion pour déterminer les concentrations bactériennes des cultures de *Francisella*

tularensis. En effet, les valeurs obtenues par cette méthode étant supérieures à celles obtenues par le dénombrement par étalement, sont plus proches des valeurs réelles.

III – 3. 2. Développement d'un modèle d'infection expérimentale chez la souris

Afin d'évaluer la virulence de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 chez la souris, un modèle d'infection a été développé à partir de souris Swiss infectées par instillation nasale selon le protocole présenté dans la partie « matériels et méthodes ». La mortalité des souris a été suivie pendant 30 jours après l'infection. Les doses létales 50 (DL50) des deux souches ont été évaluées 7 jours (J7) après l'infection par la méthode de Reed et Muench ²⁸⁹ (Tableau 23, Tableau 24).

Tableau 23. Évaluation de la DL50 de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 - Tableaux de Reed et Muench ²⁸⁹. D'après les relevés de mortalité des souris Swiss (N=8 par dose) 7 jours après infection par instillation nasale avec *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 (A) et *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 (B).

A. *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00

Doses (UFC/souris)	Souris vivantes	Souris mortes	Mortes cumulées	Vivantes cumulées	Mortes cumulées (%)
1940	3	5	16	3	84,2
1050	4	4	11	7	61,1
590	6	2	7	13	35,0
270	8	0	5	21	19,2
80	4	4	5	25	16,7
30	7	1	1	32	3,0

B. *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06

Doses (UFC/souris)	Souris vivantes	Souris mortes	Mortes cumulées	Vivantes cumulées	Mortes cumulées (%)
170	3	5	21	3	87,5
70	4	4	16	7	69,6
30	4	4	12	11	52,2
5	5	3	8	16	33,3
3	5	3	5	21	19,2
1	6	2	2	27	6,9

Tableau 24. Valeurs de DL50 obtenues graphiquement à J7 par la méthode de Reed et Muench²⁸⁹ pour *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et pour *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06.

Souche	DL50 (UFC/souris)
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> 061/00	820
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> 278/06	30

D'après ce modèle animal, réalisé à l'aide de souris Swiss infectées par instillation nasale, les DL50 de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 et de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 ont été estimées respectivement à 30 UFC et à 820 UFC par souris. Les doses infectieuses de ces deux souches sont faibles et la virulence de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 est environ 30 fois plus importante que celle de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00.

III – 4. Construction et complémentation d'un mutant de *F. tularensis* subsp. *tularensis* déficient en AcpA

Afin d'évaluer le rôle de l'AcpA dans la virulence de la sous-espèce *tularensis*, nous avons construit un mutant de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 déficient en phosphatase acide A. Le mutant a été obtenu par mutagenèse dirigée par échange d'allèles à l'aide du vecteur suicide pXL- Δ acpA::Cm, basé sur le plasmide commercial pCR[®]-XL-TOPO non répliquatif chez *Francisella*.

Pour construire le vecteur pXL- Δ acpA::Cm, un fragment de 4 203 pb correspondant à la région codante du gène *acpA* de 1 545 pb, encadrée par deux régions de 1 376 pb en amont et de 1 282 pb en aval, a été clonée dans le plasmide pCR[®]-XL-TOPO. A partir de cette construction, la région codante pour l'AcpA a été extraite et remplacée par le gène de résistance au chloramphénicol du plasmide pACYC184.

Pour construire le mutant, le vecteur pXL- Δ acpA::Cm a été introduit dans *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 par électroporation.

Les clones ont été sélectionnés sur gélose BHI-IsoVitaleXTM additionnée avec 2% d'hémoglobine et avec 2 μ g.mL⁻¹ de chloramphénicol. Les premières colonies sont apparues après 6 jours d'incubation à 37°C et de nouvelles colonies sont apparues après 11 jours

d'incubation. Elles ont toutes été sélectionnées sur des géloses contenant du chloramphénicol à $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Cm2) et contre-sélectionnées sur des géloses contenant de la kanamycine à $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Km5). Seuls les clones résistants au chloramphénicol (Cm^r) et sensibles à la kanamycine (Km^s) ont été conservés : le profil Cm^r indiquant que la construction $\Delta\text{acpA}::\text{Cm}$ a été intégrée au génome de la bactérie par échange d'allèles avec la région sauvage correspondante ; le profil Km^s indiquant que le vecteur pXL- $\Delta\text{acpA}::\text{Cm}$, porteur de la résistance à la kanamycine, n'a pas été intégré au génome bactérien.

Ainsi, trente clones, présentant le profil Cm^r / Km^s ont été cultivés en bouillon BHI-IsoVitaleXTM-Cm2 afin d'en extraire l'ADN génomique. Les clones porteurs de la mutation $\Delta\text{acpA}::\text{Cm}$ ont ensuite été vérifiés par PCR à l'aide des amorces V001 et V002 à partir de leur ADN génomique.

Parmi les trente clones testés par PCR, trois ont présenté un fragment d'une taille de 1 855 pb, caractéristique du gène muté. Le dosage de l'activité enzymatique phosphatase acide dans les surnageants de culture de 48 h a confirmé une diminution importante de l'activité phosphatase acide pour l'un des trois clones : le mutant 10 (Tableau 25).

Tableau 25. Activité enzymatique phosphatase acide mesurée dans les surnageants de culture de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 et des trois mutants sélectionnés déficient en AcpA. L'activité a été mesurée à partir de cultures de 48 h réalisées dans 50 mL de bouillon BHI-IsoVitaleXTM.

Souches	278/06	Mutant 10	Mutant 17	Mutant 18
Activité phosphatase acide en nmol/ h/ mL/UDO	59,7	2,3	55,6	13,2

Le mutant 10, présentant une activité phosphatase acide extrêmement faible par rapport au témoin, a été conservé. Il a été vérifié une seconde fois par PCR avec les amorces V001 et V002 (Figure 32) et a été dénommé M10 $\Delta\text{acpA}::\text{Cm}$. Le gène muté a ensuite été séquencé à partir du produit PCR de 1 855 pb afin de vérifier l'insertion génomique de la cassette $\Delta\text{acpA}::\text{Cm}$. Le résultat du séquençage a confirmé l'échange d'allèles entre le gène sauvage *acpA* et la construction $\Delta\text{acpA}::\text{Cm}$.

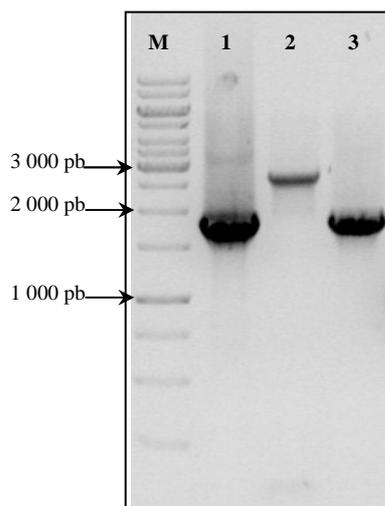


Figure 32. Vérification du mutant M10 Δ acpA::Cm par PCR. Migration des produits PCR par électrophorèse en gel d'agarose 0,8 %-BET. Amplifications PCR réalisées avec les amorces V001 et V002 à partir de l'ADN plasmidique du vecteur suicide pXL- Δ acpA::Cm (ligne 1 - témoin positif), de l'ADN génomique de *F. tularensis* subsp. *tularensis* (ligne 2 - témoin négatif) et de l'ADN génomique de M10 Δ acpA::Cm (ligne 3). L'amplicon du gène sauvage présente une taille de 2 728 pb et celui du gène muté présente une taille de 1 855 pb. M, marqueur de tailles 1-kb (Fermentas, Ontario, Canada).

Afin de caractériser le mutant M10 Δ acpA::Cm et de prouver que l'absence d'activité phosphatase acide observée chez ce dernier était bien due à la mutation du gène *acpA*, nous avons complété ce mutant avec le gène *acpA* de la souche sauvage *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06, puis dosé l'activité phosphatase acide dans les surnageants et dans les extraits intracellulaires du mutant et du mutant complété (Figure 33).

Le mutant a été complété à l'aide du plasmide pKK214-*acpA*, constitué par le plasmide pKK214, répliquatif chez *Francisella*, porteur du gène *acpA* sauvage. Pour construire ce plasmide, le gène *acpA* de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 a été inséré dans le plasmide pKK214, selon le protocole décrit dans la partie « matériels et méthodes ». Pour obtenir le mutant complété, le pKK214-*acpA* a été introduit dans M10 Δ acpA::Cm par électroporation. Les clones ont ensuite été sélectionnés sur BHI-IsoVitaleXTM-Cm2-Tc10. Les clones porteurs de la construction ont été vérifiés par digestion enzymatique de leurs ADN plasmidiques, préalablement extraits par la méthode Kado-Liu. Le mutant complété a été nommé M10 Δ acpA::Cm(pKK214-*acpA*).

Aucune activité phosphatase acide n'a été détectée chez le mutant, contrairement au mutant complémenté. Ce résultat confirme que la mutation du gène *acpA* par échange d'allèles a rendu la souche déficiente pour cette enzyme et que la complémentation avec le gène parental, porté par le vecteur pKK214-*acpA*, a restauré le phénotype sauvage.

L'activité enzymatique mesurée dans les extraits intracellulaires du mutant complémenté atteint des valeurs très élevées. Elle atteint un maximum de 300 nmol/h/mL/UDO après 9 h de culture, puis diminue ensuite jusqu'à atteindre une valeur constante proche de 100 nmol/h/mL/UDO. L'activité enzymatique mesurée dans les surnageants est plus faible que celle mesurée dans les extraits intracellulaires. Elle atteint un maximum de 130 nmol/h/mL/UDO après 11 h de culture, puis diminue jusqu'à atteindre une valeur constante proche de 40 nmol/h/mL/UDO.

Les valeurs importantes obtenues dans les surnageants et dans les extraits intracellulaires au début de la croissance sont probablement dues à l'activité enzymatique résiduelle introduite par la préculture faiblement diluée (dilution 1/20^{ème}). La diminution observée au cours de la phase exponentielle de croissance indique que l'expression du gène n'est pas proportionnelle à l'augmentation de la population bactérienne. Le niveau constant d'activité enzymatique, observé pendant la phase stationnaire, peut être expliqué par une expression constitutive et non régulée du gène *acpA* à partir de la construction pKK214-*acpA* chez le mutant complémenté.

L'activité phosphatase acide mesurée dans les surnageants et dans les extraits intracellulaires du mutant complémenté est beaucoup plus élevée que celle mesurée chez la souche sauvage. Cette différence peut être expliquée par le fait que chez le mutant complémenté, le gène *acpA* est présent en plusieurs copies dans la bactérie, alors que chez la souche sauvage, le gène *acpA* est présent en une seule copie sur le génome. Comme pour la souche sauvage, l'activité intracellulaire est plus élevée que l'activité extracellulaire.

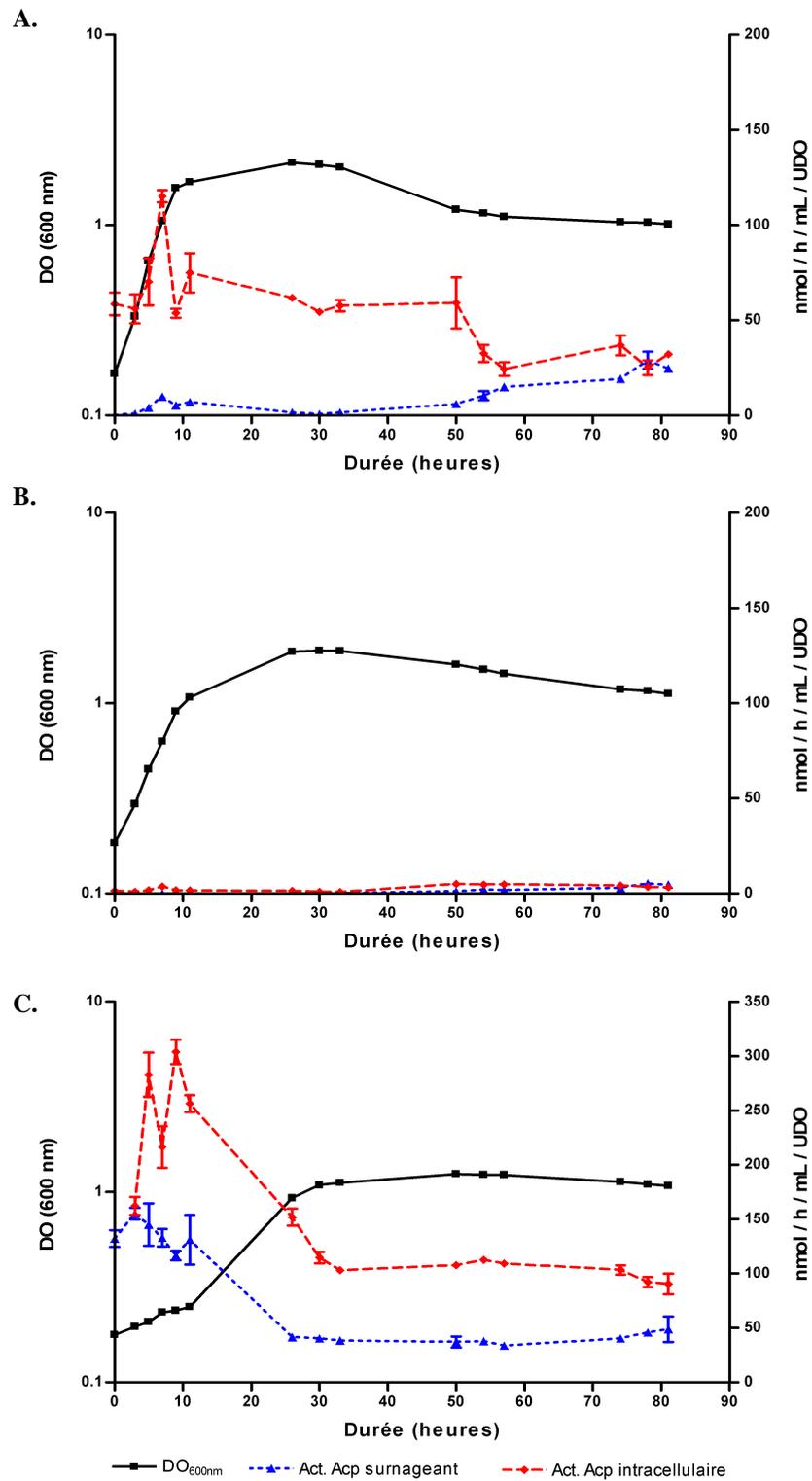


Figure 33. Courbes de croissance (■) et suivi de l'activité phosphatase acide dans le surnageant de culture (▲) et dans les extraits intracellulaires (◆) de la souche sauvage *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 (A), du mutant M10Δ*acpA*::Cm (B) et du mutant complétement M10Δ*acpA*(pKK214-*acpA*) (C). La souche 278/06 a été cultivée dans un bouillon BHI-IsoVitaleX™, M10Δ*acpA*::Cm a été cultivé dans un bouillon BHI-IsoVitaleX™-Cm2 et M10Δ*acpA*(pKK214-*acpA*) dans un bouillon BHI-IsoVitaleX™-Cm2-Tc10. Les valeurs d'activité phosphatase acide reportées correspondent aux moyennes de trois valeurs ± l'écart-type, représenté par les barres d'erreurs.

III – 5. Rôle de l'AcpA dans la virulence de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 chez la souris.

Afin de déterminer l'influence de la protéine AcpA dans la virulence de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06, des souris Swiss femelles de huit semaines ont été infectées par instillation nasale avec la souche sauvage et avec la souche mutée M10 Δ acpA::Cm, à une dose voisine de la DL50 de la souche sauvage. Le relevé de mortalité a été réalisé pendant 24 jours et les courbes de survie des souris infectées avec la souche sauvage ou avec la souche mutée ont été comparées (Figure 34).

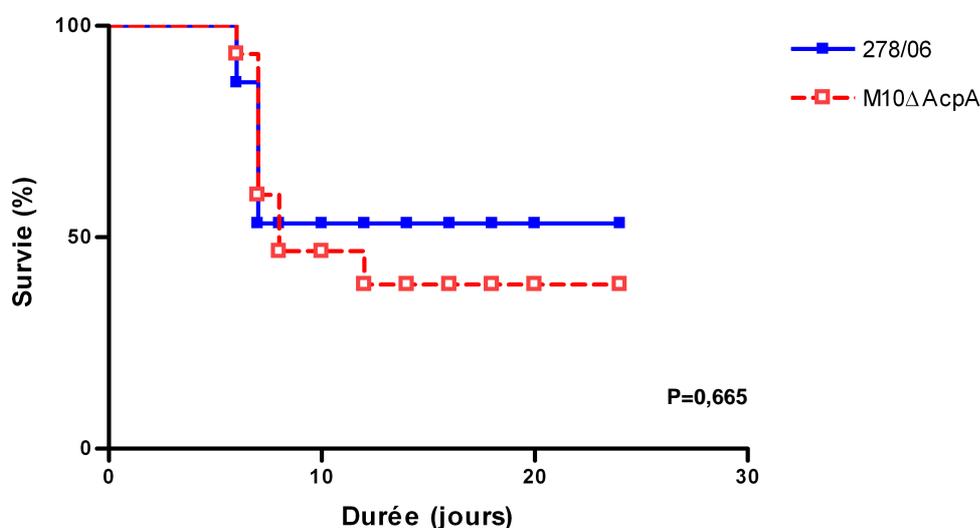


Figure 34. Comparaison des courbes de survie de souris Swiss infectées avec *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 (■) et avec le mutant M10 Δ acpA (□). N=20. Souris Swiss infectées par instillation nasale à une dose de 21 UFC pour 278/06 et de 18 UFC pour M10 Δ acpA::Cm. P est la probabilité d'observer des courbes de survie identiques. L'hypothèse selon laquelle les courbes sont identiques est rejetée pour une probabilité $P \leq 0,05$

La valeur P de 0,665, obtenue par le test log-rank, indique que les deux courbes de survie ne sont pas significativement différentes. La mutation du gène *acpA* de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 et l'absence de production de l'enzyme n'ont pas eu de conséquences sur la virulence de la bactérie.

CHAPITRE II

Identification et caractérisation de deux plasmides naturels de *Francisella* - Construction de vecteurs navettes

I – Introduction

Le manque d'outils moléculaires adaptés au genre *Francisella* a ralenti les études des facteurs de virulence de *Francisella tularensis* et par conséquent la compréhension de la physiopathologie de la tularémie. Au cours des quinze dernières années, plusieurs étapes ont dû être franchies afin de manipuler génétiquement cette bactérie. Tout d'abord, des méthodes de transformation permettant l'introduction d'ADN exogène dans les bactéries du genre *Francisella* ont été développées. Ainsi, aujourd'hui trois méthodes de transformation sont disponibles : la cryotransformation, l'électroporation et la conjugaison^{124, 249, 253, 257}. Ensuite, des outils génétiques ont été développés pour créer des mutants par échange d'allèles ou par utilisation de transposons. La création de mutants par échange d'allèles a permis l'identification de facteurs de virulence de *F. novicida*, de *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS et de *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 ; c'est le cas par exemple de la protéine IglC, du régulateur transcriptionnel MglA et d'une protéine de 58 kDa^{37, 144, 190, 197}. La création de mutants par l'utilisation de transposon a permis l'inactivation des gènes impliqués dans la croissance de *F. novicida* et de *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS dans les macrophages^{182, 207, 259}. Enfin, des vecteurs navettes réplcatifs chez *E. coli* et chez *Francisella* ont été développés pour la complémentation des mutants ou pour la construction de systèmes d'identification de promoteurs actifs au cours de l'infection, potentiellement impliqués dans l'expression de facteurs de virulence de la bactérie.

Les vecteurs navettes aujourd'hui disponibles pour la communauté scientifique ont pu être construits, dès 1994, grâce à l'identification du plasmide naturel pFNL10, porté par la souche *Francisella novicida*-like strain F6168²⁷¹. En effet, pour construire un vecteur navette réplcatif chez *E. coli* et chez *Francisella*, il est nécessaire de posséder un plasmide capable de se répliquer de manière autonome chez *Francisella*, et seul un plasmide à large spectre d'hôte ou un plasmide naturel de *Francisella* possède cette caractéristique.

Ainsi, plusieurs vecteurs navettes basés sur le pFNL10 ont successivement été décrits, dont le pKK202 et le pKK214 construits en 1996²⁵³ et en 2001²⁵⁴, suivis de la série des plasmides pFNLTPn²⁵⁷. En 2006, de nouveaux plasmides basés sur le pFNL10 ont été décrits²⁵⁸ et utilisés pour la création et pour la complémentation de mutants de *F. tularensis* subsp. *tularensis*. Enfin, en 2007, les derniers vecteurs navettes adaptés au genre *Francisella* ont été construits à partir de l'origine de réplcation à large spectre d'hôtes du plasmide pC194 de *Staphylococcus aureus*²⁶⁰. Ils ont permis d'identifier des promoteurs de gènes exprimés lors de l'infection intracellulaire du macrophage.

Afin de poursuivre les études sur le métabolisme et les mécanismes de virulence de *Francisella tularensis*, il est nécessaire d'optimiser les outils moléculaires existants et d'en proposer de nouveaux.

Dans ce travail, nous décrivons l'identification et l'analyse bioinformatique de deux nouveaux plasmides naturels, le pF242 et le pF243, isolés à partir de deux souches distinctes de *Francisella philomiragia*.

Deux générations de vecteurs navettes réplcatifs chez *Francisella* et *E. coli* ont été construites à partir de ces plasmides naturels. Pour cela, nous avons introduit une origine de réplcation spécifique à *E. coli*, un gène de résistance à un antibiotique, un site de clonage multiple et un gène rapporteur codant pour une protéine fluorescente (la GFP pour Green Fluorescent Protein). Nous avons ensuite comparé l'électroporation et la cryotransformation en mesurant l'efficacité de transformation de ces vecteurs navettes chez deux souches pathogènes de *F. tularensis* subsp. *holarctica* et de *F. tularensis* subsp. *tularensis*.

II – Matériels et méthodes

II – 1. Souches, plasmides, amorces et conditions de culture

Les bactéries, les plasmides et les amorces utilisés dans cette étude sont présentés dans le [Tableau 26](#).

Tableau 26. Souches bactériennes et plasmides utilisés au cours de la seconde étude

Souche et plasmide	Description ^a	Référence et source
Souche		
<i>F. philomiragia</i>	Cb ^r , Tp ^r , Ap ^r	ATCC 25016
<i>F. philomiragia</i>	Cb ^r , Tp ^r , Ap ^r	ATCC 25017
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holartica</i> 61/00	Cb ^r , Tp ^r , Ap ^r	Échantillon clinique humain
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> 278/06	Cb ^r , Tp ^r , Ap ^r	Échantillon clinique humain
One shot [®] TOP10 chemically competent <i>E. coli</i> .	<i>F mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen [®]
<i>E. coli</i> 10G chemically competent cells	<i>F mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) <i>endA1 recA1</i> ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 araD139</i> Δ (<i>ara,leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL nupG</i> λ <i>tonA</i>	Lucigen [®] corp.
Plasmide		
pF242	Plasmide naturel de 3,9-kb de <i>F. philomiragia</i> ATCC 25016	Cette étude
pF243	Plasmide naturel de 5,0-kb de <i>F. philomiragia</i> ATCC 25017	Cette étude
pKK202	Plasmide de 7,0-kb. Dérivé du pFNL10, Cm ^r , Tc ^r	253
pKK214	Plasmide de 4,8-kb. Dérivé du pFNL10, Tc ^r	254
pCR [®] 2.1-TOPO	Plasmide de 3,9-kb pour le clonage de produits PCR, Ap ^r , Km ^r	Invitrogen [®]
pCR [®] -XL-TOPO	Plasmide de 3,5-kb pour le clonage de longs produits PCR, Km ^r , zeocin ^r	Invitrogen [®]
pACYC177	Plasmide de 3,9-kb, Km ^r , Ap ^r	292
pACYC184	Plasmide de 4,2-kb, Cm ^r , Tc ^r	284
pGFPmut3.1	Plasmide de 3,3-kb porteur du gène <i>gfp</i> , Ap ^r	Clontech, Mountain View
pCR-Script Amp SK(+)	Plasmide de 3,0-kb pour le clonage de produit PCR, Ap ^r	Stratagene

^a Km^r, Ap^r Cb^r, Tp^r, Cm^r et Tc^r, résistances à la kanamycine, l'ampicilline, la carbénicilline, le triméthoprim, le chloramphénicol et la tétracycline

F. tularensis subsp. *holartica* 061/00 et *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 ont été cultivées à 37°C sous agitation en bouillon BHI-2% IsoVitalex[™] (Becton Dickinson, France) ou sur milieu gélosé BHI-2% IsoVitalex[™]. Si nécessaire, le milieu gélosé a été enrichi avec 2% d'hémoglobine et avec de la kanamycine (10 μ g.ml⁻¹), du chloramphénicol (10 μ g.ml⁻¹) ou de la tétracycline (20 μ g.ml⁻¹). Les sous-espèces *tularensis* et *holartica* ont été manipulées en laboratoire NSB3. Les souches d'*E. coli* ont été cultivées à 37°C en milieu LB (Luria-Bertani), additionné si nécessaire d'ampicilline (100 μ g.ml⁻¹), de kanamycine (50 μ g.ml⁻¹), de tétracycline (30 μ g.ml⁻¹) ou de chloramphénicol (15 μ g.ml⁻¹).

Tous les antibiotiques ont été fournis par Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La densité cellulaire des cultures a été mesurée à 600 nm à l'aide du photomètre Biophotometer (Eppendorf[®], Le Pecq, France)

II – 2. Manipulation de l'ADN

Les PCR ont été réalisées sur un thermocycler PTC 200 (MJ Research, Waltham, Mass.) avec le réactif « PuRe Taq[™] Ready-To-Go[™] PCR beads » (GE Healthcare, Buckinghamshire, GB) ou avec l'ADN polymérase *PfuUltra*[®] High-Fidelity (Stratagene, La Jolla, CA) selon les recommandations des fournisseurs. Les ligations ont été réalisées avec la T4DNA ligase (New England Biolabs, Beverly, Mass.) et les déphosphorylations avec la phosphatase alcaline d'intestin de veau (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, Fermentas, Ontario, Canada) selon les recommandations des fournisseurs. L'ADN plasmidique d'*E. coli* a été préparé à l'aide du « QIAprep Spin Miniprep Kit » ou du « QIAGEN plasmid midi kit » (QIAGEN, France). L'ADN plasmidique de *Francisella* a été extrait par la méthode de Kado-Liu modifiée²⁸⁵ ([Annexe II](#)). L'ADN génomique de *Francisella* a été extrait selon la technique décrite dans l'[Annexe III](#). Les oligonucléotides ont été synthétisés par Eurogentec (Liège, Belgique). Les conditions d'amplification par PCR ont été les suivantes : une étape de 5 min à 95°C, suivie de 30 cycles de 1 min à 95°C, 1 min à la température d'hybridation des amorces et *x* min à 72°C (*x* étant le temps nécessaire à l'élongation en considérant 1 min pour l'amplification d'un fragment de 1 000 pb), et enfin une seule étape de 4 min à 72°C.

II – 3. Transformation des bactéries

Les souches *E. coli* TOP10 (Invitrogen[®], Carlsbad, CA) et *E. coli* 10G (Lucigen[®] corporation, Middleton, WI) ont été transformées par choc thermique selon les recommandations du fournisseur. Les souches de *Francisella* ont été transformées par électroporation²⁵⁷ ([Annexe V](#)) et par cryotransformation²⁸⁷ ([Annexe VI](#)).

II – 4. Construction de la première génération de vecteurs navettes répliatifs chez *E. coli* et chez *Francisella* dérivés du pF242 et du pF243

La première génération de vecteurs navettes construite à partir du pF242 et du pF243 et les amorces utilisées au cours de cette étude sont listées dans le [Tableau 27](#).

Tableau 27. Première génération de vecteurs navettes dérivés du pF242 et du pF243 et amorces utilisés dans la seconde étude

Plasmide / Amorce	Description ^a	Source
Plasmide		
pF242-Tc	Plasmide de 6,3-kb. Dérivé du pF242 contenant l'origine p15A, Tc ^r	Cette étude
pF242-Km	Plasmide de 6,0-kb. Dérivé du pF242 contenant l'origine p15A, Km ^r	Cette étude
pF242-Cm	Plasmide de 5,9-kb. Dérivé du pF242 contenant l'origine p15A, Cm ^r	Cette étude
pF243-Tc	Plasmide de 7,4-kb. Dérivé du pF243 contenant l'origine p15A, Tc ^r	Cette étude
pF243-Km	Plasmide de 7,2-kb. Dérivé du pF243 contenant l'origine p15A, Km ^r	Cette étude
pF243-Cm	Plasmide de 7,0-kb. Dérivé du pF243 contenant l'origine p15A, Cm ^r	Cette étude
pF242-XL	Plasmide de 7,3-kb constitué du pCR [®] -XL-TOPO et du pF242, Km ^r , zeocin ^r	Cette étude
pF243-XL	Plasmide de 8,3-kb constitué du pCR [®] -XL-TOPO et du pF243, Km ^r , zeocin ^r	Cette étude
Amorce		
M13-U	5'-TGTAACACGACGGCCAGT-3'	
M13-R	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'	
T001	5'-CCCTCCTGTTACAGCAGCTGACGGGGTGGTGCG-3' – amorce directe pour p15A-Tc	
T002	5'-TGCGCCGCTGTCGGCAGCTGGAGATGGCGGAC-3' – amorce inverse pour p15A-Tc	
C001	5'-CTTATTCAGGCCCTAGCACCAGG-3' – amorce directe pour p15A-Cm	
C002	5'-CGATAAGGCCCTGACTTCAGG-3' – amorce inverse pour p15A-Cm	
K001	5'-GATCTAGGTGAAGGCCCTTTTTCG-3' – amorce directe pour p15-Km	
K002	5'-CAACAAGGCCCTCCGTCCCGTC-3' – amorce inverse pour p15-Km	
I001	5'-GCGTCGAACACTAAAAAGCTTG-3' – amorce directe pour la PCR-inverse du pF242	
I002	5'-GCGTGCCCTTTTATCCCTGTC-3' – amorce inverse pour la PCR-inverse du pF242	
I003	5'-GGTATTGAAATGCTATAGTGATGC-3' – amorce directe pour la PCR-inverse pF243	
I004	5'-GGAAGCTCTACTGGATAGC-3' – amorce inverse pour la PCR-inverse pF243	
P001	5'-CTATATAGGCGGCCCTATTAC-3' – amorce directe pour le promoteur de l'opéron <i>groES</i>	
P004	5'-GGACGAATGTGCATGCCAATC-3' – amorce inverse pour le promoteur de l'opéron <i>groES</i>	
G001	5'-GAAATTAAGCATGCGTAAAGGAG-3' – amorce directe pour le gène <i>gfp</i>	
G002	5'-CTAATTAAGGCGGCCCTTATTTCG-3' – amorce inverse pour le gène <i>gfp</i>	
PG001	5'-AATTCCTGCAGCCGGGGA-3' – amorce directe pour <i>gro-gfp</i>	
PG002	5'-GCTCTAGCCCTAATTAAGGC-3' – amorce inverse pour <i>gro-gfp</i>	
A001	5'-GCTTGTTTAAAGAGCGAATAGGCGCGCCTCGAACACTAAAAAGCTTGATAC-3' – amorce directe pour la création du site <i>AscI</i>	
A002	5'-GTATCAAGCTTTTAGTGTTCGAGGCGCGCCTATTCGCTTTTAAACAAGC-3' – amorce inverse pour la création du site	
C003	5'-P-CGCGTGGATCCAGATCTGATCAGGTACCGCGCCGAGCTCGTCGACGGCGCCGGCCGTTTAAACA-3' – oligonucléotide pour la construction du SCM	
C004	5'-P-CGCGTGACGTGACGAGCTCGTTTAAACGCGCCGCGGTACCTGCGCAGGATCCGGCGCCCTGCAGGCGCCA-3' – oligonucléotide complémentaire pour la construction du SCM	
M001	5'-GGCTAATAGTCTGACAGCAGCGTAGCCTCAAATTGTCGC-3' – amorce directe pour la création du site <i>MluI</i>	
M002	5'-GCGACAATTTGAAGTGCTACGCGTCTGCAAGACTATTAGCC-3' – amorce inverse pour la création du site <i>MluI</i>	

^a Km^r, Cm^r et Tc^r, résistances à la kanamycine, au chloramphénicol et à la tétracycline. Les régions soulignées correspondent aux sites de coupure des enzymes de restriction de *PvuII* (amorces T001, T002), *StuI* (amorces C001, C002, K001, K002), *AscI* (amorces P001, G002, A001, A002), *SphI* (amorces P004, G001), *MluI* (amorces M001, M002). Le groupement phosphate en 5' est représentée par **P**.

Les plasmides pF242-Tc, pF242-Km, pF242-Cm, pF243-Tc, pF243-Km et pF243-Cm ont été obtenus suite à l'insertion, dans le pF242 ou dans le pF243, d'un fragment porteur de

l'origine de réplication p15A d'*E. coli* et d'une résistance à un antibiotique (kanamycine, chloramphénicol ou tétracycline) (Figure 35).

L'origine p15A et les gènes de résistance aux antibiotiques sont issus des vecteurs d'*E. coli* pACYC184²⁸⁴ ou pACYC177²⁹². Ainsi, les fragments p15A-Tc et p15A-Cm ont été amplifiés par PCR en utilisant respectivement les amorces T001/T002 (porteuses du site *PvuII*) et C001/C002 (porteuses du site *StuI*) à partir de l'ADN plasmidique du pACYC184²⁸⁴ (Tableau 27). Le fragment p15A-Km a été amplifié par PCR à l'aide des amorces K001/K002 (porteuses du site *StuI*) à partir de l'ADN plasmidique du pACYC177²⁹². Les produits PCR p15A-Tc, p15A-Cm et p15A-Km ont ensuite été digérés par les enzymes de restrictions *PvuII* ou *StuI* afin de générer des bouts francs. Les fragments digérés ont été déphosphorylés, puis introduits dans les plasmides pF242 et pF243, préalablement linéarisés par *XbaI* et *NheI*, respectivement, et traités par l'ADN polymérase T4 afin de générer des bouts francs. Les bactéries compétentes *E. coli*[®] 10G ont été transformées avec le produit de ligation, puis les transformants ont été sélectionnés sur des géloses contenant de la kanamycine (50 µg.ml⁻¹), de la tétracycline à (10 µg.ml⁻¹) ou du chloramphénicol (15 µg.ml⁻¹). Les constructions ont été vérifiées par digestions enzymatiques après extraction de l'ADN plasmidique.

Les plasmides pF242-XL et pF243-XL ont été obtenus par insertion des plasmides pF242 et pF243 dans le vecteur de clonage pCR[®]-TOPO-XL. Pour cela, le pF242 (3 807 pb) et le pF243 (4 841 pb) ont été amplifiés par PCR inverse à l'aide de deux couples d'amorces divergentes, respectivement : I001/I002 (séparées de 129 pb) et I003/I004 (séparées de 231 pb). Après migration des produits PCR sur gel d'agarose à 0,8%, contenant du cristal violet à 1,6 µg.ml⁻¹ pour la visualisation de l'ADN, les bandes ont été extraites du gel, puis on été clonées dans le plasmide pCR[®]-TOPO-XL selon les recommandations du fournisseur. Les bactéries *E. coli* One shot[®] TOP10 ont ensuite été transformées avec le produit de clonage. Les transformants ont été sélectionnés sur des géloses contenant de la kanamycine (50 µg.ml⁻¹). Les constructions ont été vérifiées par digestions enzymatiques après extraction de l'ADN plasmidique.

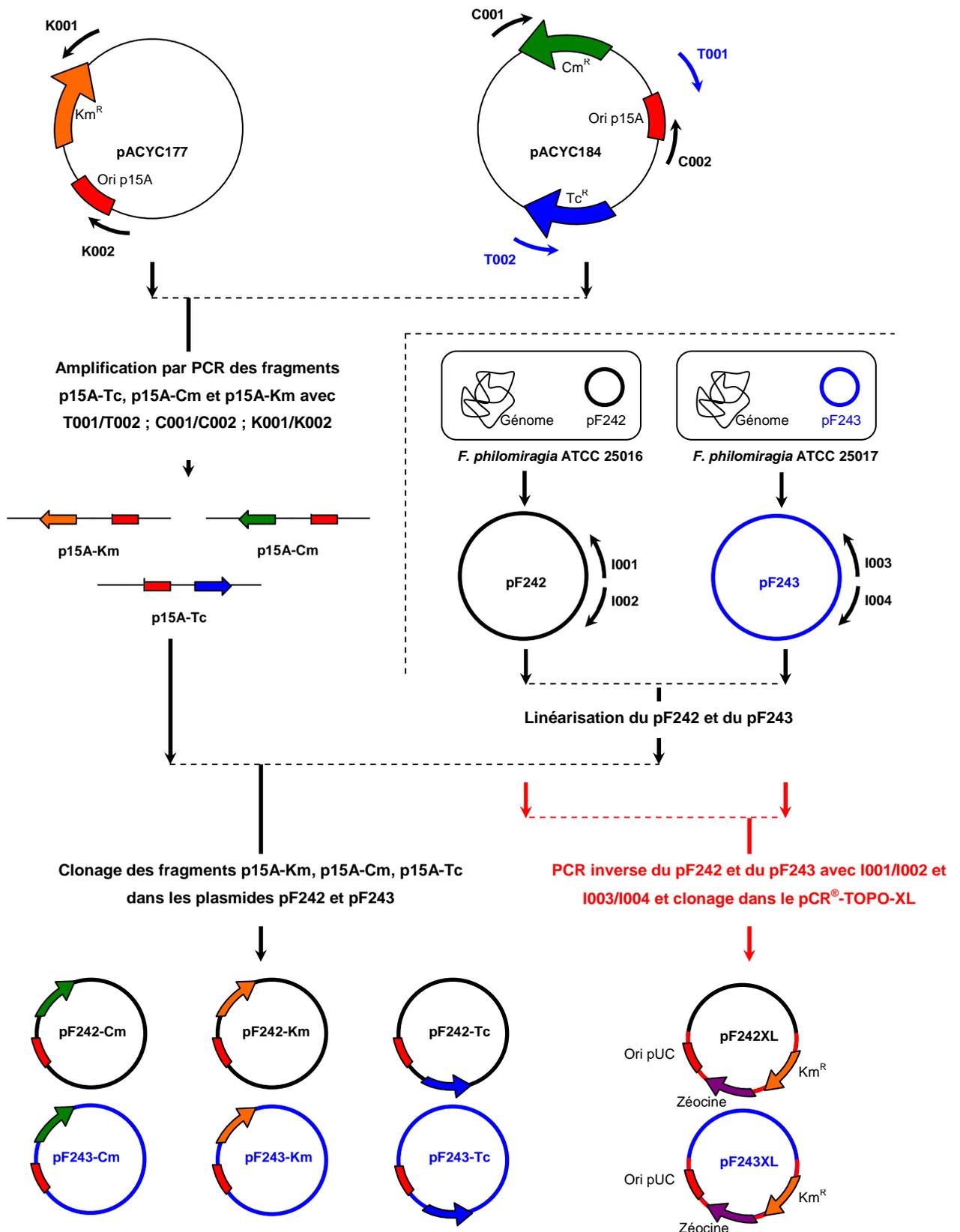


Figure 35. Construction de la première génération de vecteurs navettes dérivés du pF242 et du pF243 répliquatifs chez *E. coli* et chez *Francisella*.

II – 5. Construction de la seconde génération de vecteurs navettes dérivés du pF242 et du pF243 contenant le gène codant pour la GFP et/ou un site de clonage multiple.

Une seconde génération de vecteurs navettes dérivés du pF242 et du pF243 a été construite à partir des vecteurs de première génération ([Tableau 28](#)).

Tableau 28. Seconde génération de vecteurs navettes dérivés du pF242 et du pF243

Plasmide	Description	Source
pF242- <i>gfp</i> -Cm	Plasmide de 6,9-kb. Dérivé du pF242-Cm contenant le promoteur de l'opéron <i>groES</i> de <i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> en amont du gène <i>gfp</i>	Cette étude
pF242-MCS-Cm	Plasmide de 5,9-kb. Dérivé du pF242-Cm porteur du site de clonage multiple <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I, <i>Kpn</i> I, <i>Bcl</i> I, <i>Bgl</i> II, <i>Not</i> I, <i>Sac</i> I, <i>Pvu</i> I, <i>Sal</i> I, <i>Xho</i> I et <i>Stu</i> I	Cette étude
pF242- <i>gfp</i> -MCS-Cm	Plasmide de 6,9-kb. Dérivé du pF242-Cm contenant le promoteur de l'opéron <i>groES</i> de <i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> en amont du gène <i>gfp</i> et le site de clonage multiple <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I, <i>Kpn</i> I, <i>Bcl</i> I, <i>Bgl</i> II, <i>Not</i> I, <i>Sac</i> I, <i>Pvu</i> I, <i>Sal</i> I, <i>Xho</i> I et <i>Stu</i> I	Cette étude
pF242- <i>gfp</i> -Km	Plasmide de 7,0-kb. Dérivé du pF242-Km Cm contenant le promoteur de l'opéron <i>groES</i> de <i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> en amont du gène <i>gfp</i>	Cette étude
pF242-MCS-Km	Plasmide de 6,1-kb. Dérivé du pF242-Km porteur du site de clonage multiple <i>Bam</i> HI, <i>Bgl</i> II, <i>Bcl</i> I, <i>Kpn</i> I, <i>Not</i> I, <i>Sac</i> I, <i>Sal</i> I, <i>Sfo</i> I, <i>Apa</i> I et <i>Pme</i> I	Cette étude
pF242- <i>gfp</i> -MCS-Km	Plasmide de 7,1-kb. Dérivé du pF242-Km contenant le promoteur de l'opéron <i>groES</i> de <i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> en amont du gène <i>gfp</i> et le site de clonage multiple <i>Bam</i> HI, <i>Bgl</i> II, <i>Bcl</i> I, <i>Kpn</i> I, <i>Not</i> I, <i>Sac</i> I, <i>Sal</i> I, <i>Sfo</i> I, <i>Apa</i> I et <i>Pme</i> I	Cette étude
pF243- <i>gfp</i> -Cm	Plasmide de 8,0-kb. Dérivé du pF243-Cm contenant le promoteur de l'opéron <i>groES</i> de <i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> en amont du gène <i>gfp</i>	Cette étude
pF243-MCS-Cm	Plasmide de 7,1-kb. Dérivé du pF243-Cm porteur du site de clonage multiple <i>Asc</i> I, <i>Sma</i> I, <i>Kpn</i> I, <i>Pvu</i> I, <i>Not</i> I, <i>Xho</i> I, <i>Sac</i> I, <i>Stu</i> I et <i>Sal</i> I	Cette étude
pF243- <i>gfp</i> -MCS-Cm	Plasmide de 8,1-kb. Dérivé du pF243-Cm contenant le promoteur de l'opéron <i>groES</i> de <i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> en amont du gène <i>gfp</i> et le site de clonage multiple <i>Asc</i> I, <i>Sma</i> I, <i>Kpn</i> I, <i>Pvu</i> I, <i>Not</i> I, <i>Xho</i> I, <i>Sac</i> I, <i>Stu</i> I et <i>Sal</i> I	Cette étude
pF243- <i>gfp</i> -Km	Plasmide de 8,2-kb. Dérivé du pF243-Km contenant le promoteur de l'opéron <i>groES</i> de <i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> en amont du gène <i>gfp</i>	Cette étude
pF243-MCS-Km	Plasmide de 7,2-kb. Dérivé du pF243-Km porteur du site de clonage multiple <i>Kas</i> I, <i>Sbf</i> I, <i>Asc</i> I, <i>Bam</i> HI, <i>Fsp</i> I, <i>Kpn</i> I, <i>Not</i> I, <i>Pme</i> I, <i>Sac</i> I, <i>Sal</i> I et <i>Zra</i> I	Cette étude
pF243- <i>gfp</i> -MCS-Km	Plasmide de 8,3-kb. Dérivé du pF243-Km contenant le promoteur de l'opéron <i>groES</i> de <i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> en amont du gène <i>gfp</i> et le site de clonage multiple <i>Kas</i> I, <i>Sbf</i> I, <i>Asc</i> I, <i>Bam</i> HI, <i>Fsp</i> I, <i>Kpn</i> I, <i>Not</i> I, <i>Pme</i> I, <i>Sac</i> I, <i>Sal</i> I et <i>Zra</i> I	Cette étude

Toutes les constructions ont été obtenues selon la même procédure. Les amorces et les oligonucléotides utilisés pour la construction de la deuxième génération de vecteur sont présentés dans l'[Annexe VII](#).

Comme exemple, nous décrirons uniquement la construction du vecteur pF242-*gfp*-MCS-Km, qui a nécessité une étape intermédiaire conduisant à la construction du plasmide pF242-*gfp*-Km (Figure 36).

Le pF242-*gfp*-Km a été obtenu par insertion, dans le pF242-Km, d'un fragment d'ADN porteur du promoteur de l'opéron *groES* de *F. tularensis* subsp. *tularensis* placé en amont du gène *gfp*. Pour cela, le promoteur de la protéine GroES a été amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 à l'aide des amorces P001 et P004 (respectivement porteuses des sites *AscI* et *SphI*) (Tableau 27). D'autre part, le gène *gfp* a été amplifié par PCR à partir de l'ADN plasmidique du pGFPmut3.1 (Clontech, Mountain View, CA) à l'aide des amorces G001 et G002 (respectivement porteuses des sites *SphI* et *AscI*) (Tableau 27). Afin d'obtenir le fragment d'ADN *gro-gfp*, le promoteur *groES* et le gène *gfp* ont été clonés séparément dans le vecteur de clonage pCR-Script Amp SK(+) (Stratagène, La Jola, CA). Ces constructions ont été digérées respectivement par les enzymes de restriction *EcoRI* et *SphI* ou *SphI* et *SacI* afin d'en extraire les fragments correspondants au promoteur *groES* et au gène *gfp*. Après migration sur un gel d'agarose à 0,8% - BET, les fragments *groES* et *gfp* ont été extraits et ligés ensemble au niveau du site *SphI*. Le produit de ligation a ensuite été utilisé comme matrice pour amplifier par PCR le fragment d'ADN *gro-gfp* à l'aide des amorces PG001 et PG002 (Tableau 27).

Pour insérer le fragment *gro-gfp* dans le pF242-Km, un site unique *AscI* a été créé dans ce vecteur à l'aide des amorces A001 et A002 (Tableau 27) avec le kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis (Stratagène). Le produit PCR *gro-gfp* a ensuite été digéré par l'enzyme *AscI* et introduit dans le pF242-Km, préalablement digéré par l'enzyme *AscI* et déphosphorylé. Les bactéries compétentes *E. coli*[®] 10G ont été transformées avec le produit de ligation. Les transformants contenant la construction intermédiaire pF242-*gfp*-Km ont été sélectionnés sur des géloses contenant de la kanamycine (50 µg.ml⁻¹). Les constructions ont été vérifiées par digestions enzymatiques après extraction de l'ADN plasmidique.

Le vecteur pF242-*gfp*-MCS-Km a été obtenu après insertion d'un site de clonage multiple (MCS) dans la construction pF242-*gfp*-Km.

Pour construire le MCS, nous avons fait synthétiser deux oligonucléotides complémentaires : C003 de 69 pb et C004 de 73 pb (Tableau 27). Ces deux oligonucléotides ont ensuite été hybridés. Pour cela, un mélange équimolaire de C003 et C004 a été chauffé à

95°C, puis refroidi à température ambiante. Ces deux oligonucléotides ont été synthétisés de manière, après leur hybridation, à contenir les sites de restriction suivants : *Bam*HI, *Bgl*III, *Bcl*II, *Kpn*I, *Not*I, *Sac*I, *Sal*I, *Sfo*I, *Apa*I et *Pme*I et à mimer le site de restriction *Mlu*I digéré à chaque extrémité du MCS. D'autre part, les deux oligonucléotides C003 et C004 présentent un groupement phosphate en 5' pour que la ligation du MCS dans le pF242-*gfp*-Km se produisent correctement.

Afin d'insérer le MCS dans le pF242-*gfp*-Km, un site unique *Mlu*I a été créé dans ce vecteur à l'aide des amorces M001 et M002 (Tableau 27) avec le kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis (Stratagene). Le vecteur résultant a ensuite été linéarisé par l'enzyme de restriction *Mlu*I, puis déphosphorylé et ligué avec le MCS. Les bactéries compétentes *E. coli*[®] 10G ont été transformées avec le produit de ligation. Les transformants contenant le pF242-*gfp*-MCS-Km ont été sélectionnés sur des géloses contenant de la kanamycine (50 µg.ml⁻¹). Les constructions ont ensuite été vérifiées par digestions enzymatiques après extraction de l'ADN plasmidique.

II – 6. Séquençage et analyse des séquences d'ADN plasmidiques.

Les fragments d'ADN clonés dans le pCR[®] 2.1-TOPO dans le but d'être séquencés ont dans un premier temps été amplifiés par PCR à l'aide des amorces M13-U et M13-R. Les produits PCR ont ensuite été séquencés par Cogenics (Meylan, France) à partir de ces mêmes amorces.

Les cartes des ADN plasmidiques ont été créées avec le logiciel PlasmMapper²⁷³. L'analyse bioinformatique a été réalisée à l'aide des programmes BLASTn, BLASTp²⁹³ et ORF finder²⁹⁴ disponible sur le serveur web du NCBI. Les masses molaires (MM) et les pH isoélectriques (pI) ont été prédits à l'aide du programme en ligne « compute Mw/pI tool » (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html, dernière connexion mars 2008). Les séquences protéiques ont été alignées à l'aide du programme en ligne ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>, dernière connexion juin 2008). Les structures secondaires des séquences protéiques ont été prédites à l'aide du programme en ligne Jpred3 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/>, dernière connexion mars 2008).

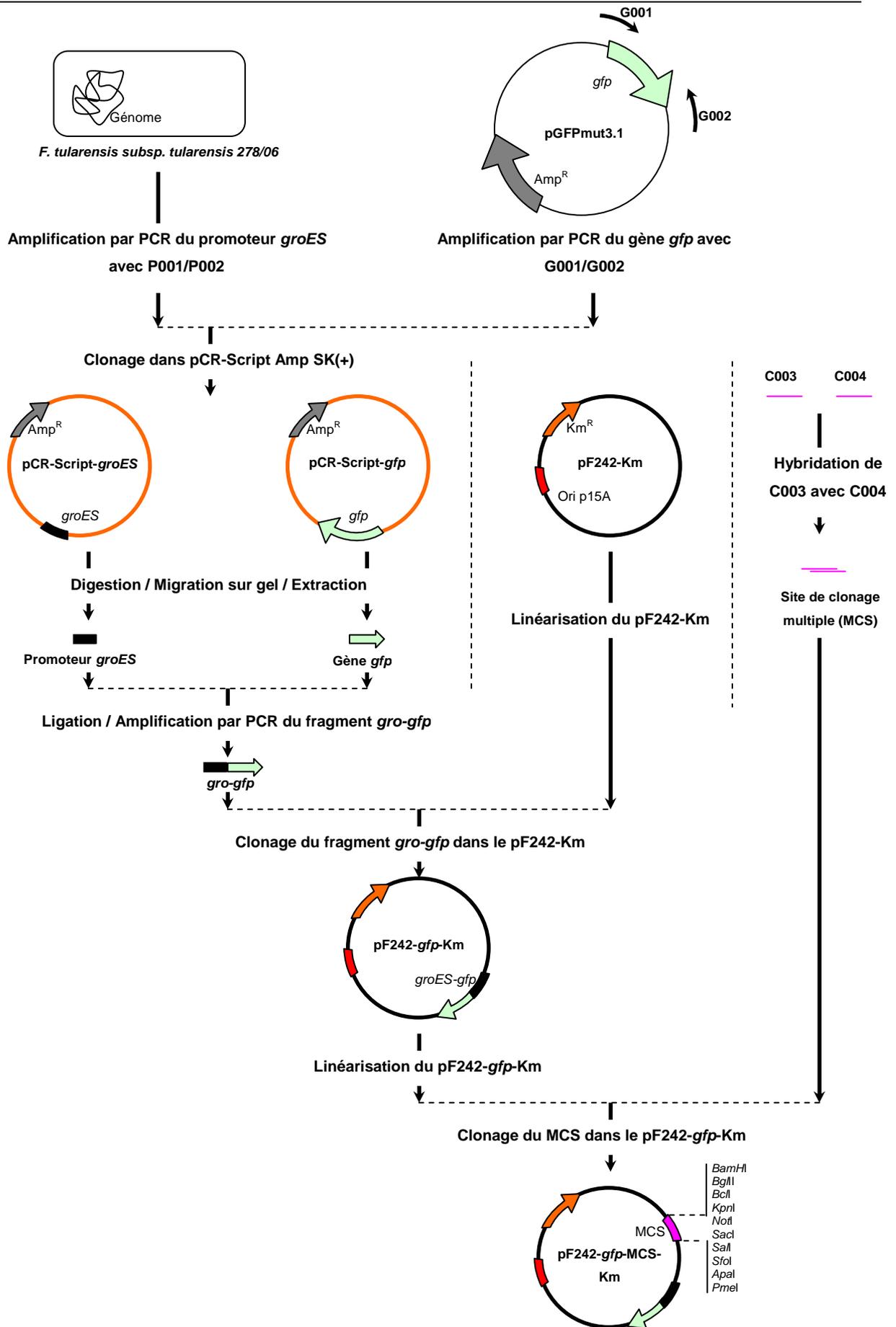


Figure 36. Construction du pF242-*gfp*-Km et du pF242-*gfp*-MCS-Km

III – Résultats

II – 1. Isolation de deux nouveaux plasmides de *Francisella philomiragia* et analyse de leurs séquences

Deux nouveaux plasmides distincts ont été extraits à partir des deux souches de *F. philomiragia* ATCC 25016 et ATCC 25017 par la méthode Kado-Liu. Nous les avons nommés pF242 et pF243. A partir de ces extraits, nous avons réalisé des digestions enzymatiques. Les digestions avec les enzymes *Xba*I et *Nhe*I ont respectivement conduit à la linéarisation des plasmides pF242 et pF243 et les digestions avec l'enzyme *Hind*III ont conduits à des profils caractéristiques des deux plasmides (Figure 37).

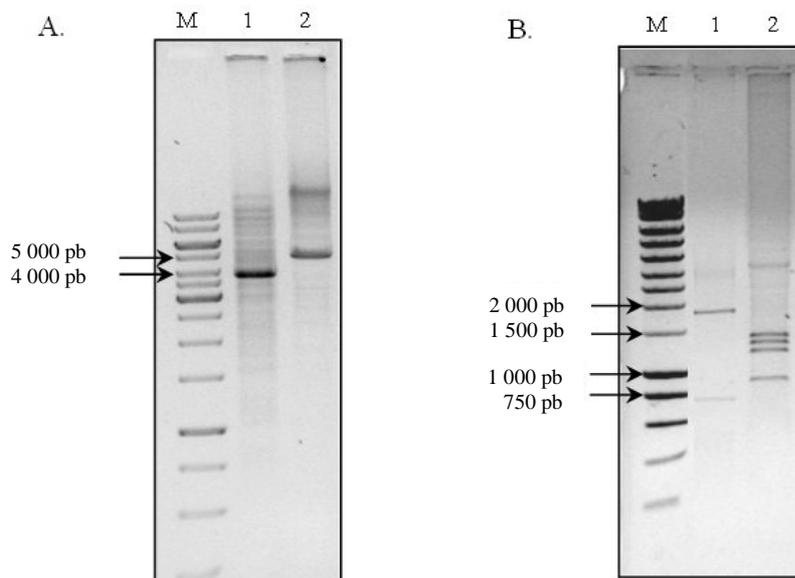


Figure 37. Migration par électrophorèse en gel d'agarose 0,8%-BET des plasmides isolés à partir de *F. philomiragia* ATCC 25016 (ligne 1) et *F. philomiragia* ATCC 25017 (ligne 2). (A) Ligne 1, digestion par *Xba*I du plasmide pF242 (3 936 pb) ; ligne 2, digestion *Nhe*I du plasmide pF243 (5 072 pb). (B) Ligne 1, digestion *Hind*III du plasmide pF242 : 1 790 et 703 pb (402, 344, 322 pb, bandes non visibles) ; ligne 2, digestion *Hind*III du plasmide pF243 : 1 477, 1 378, 1 271 et 946 pb. M, marqueur de taille 1-kb (Fermentas, Ontario, Canada).

Les bandes visibles de 1 790 pb pour le pF242 et de 1 477 pb pour le pF243 ont été extraites du gel d'agarose puis clonées dans le pCR[®]2.1-TOPO. Le clonage de ces fragments d'ADN nous a servi de point de départ pour le séquençage des deux plasmides. En effet, après avoir séquençé ces deux fragments, nous avons pu déterminer les séquences complètes du pF242 et du pF243 de proche en proche en réalisant des séquençages

successifs d'environ 800 pb. A partir des séquences complètes nous avons obtenu les cartes du pF242 et du pF243 (Figure 38)

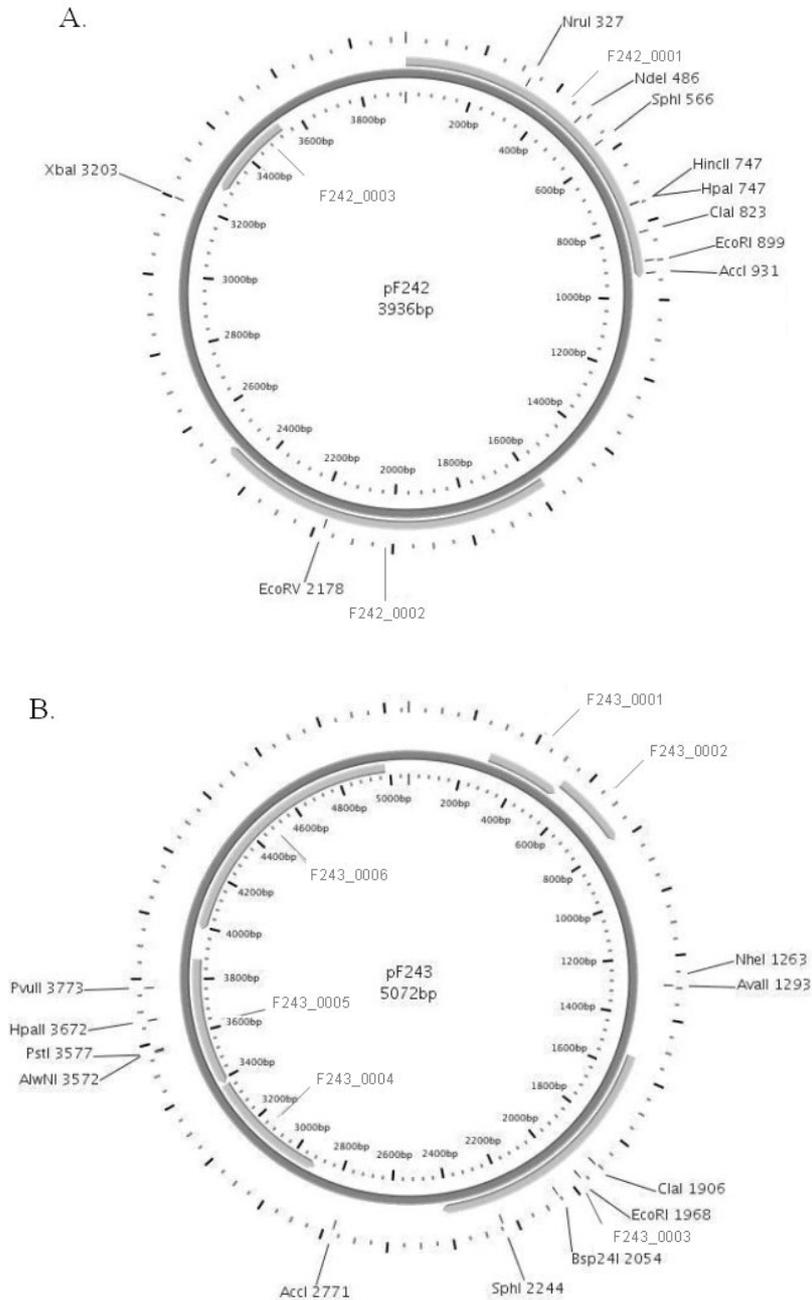


Figure 38. Cartes des plasmides isolés à partir de *F. philomiragia* ATCC 25016 et *F. philomiragia* ATCC 25017. (A) pF242. (B) pF243. Les flèches représentent les régions codantes prédites pour le pF242 (de F242_0001 à F242_0003) et pour le pF243 (de F243_0001 à F243_0006). Les sites de restriction uniques sont indiqués. Dessin réalisé à l'aide du programme en ligne PlasmMapper²⁷³.

Au cours de cette étude, l'équipe de Copeland et collaborateurs, issue de l'« US Department Of Energy Joint Genome Institute », a déposé dans GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) une séquence identique à celle du pF242 sous le numéro CP000938. Ils l'ont nommée pFPHI01 (résultats non publiés). Cependant, nous avons relevé une erreur de leur part : ils ont isolé le pFPHI01 à partir de la souche *Francisella philomiragia* ATCC 25017, alors que nous avons isolé le pF242 à partir de la souche *Francisella philomiragia* ATCC 25016. Après la parution de la séquence du pFPHI01, nous avons vérifié et confirmé l'origine du plasmide pF242 à partir d'un nouvel échantillon provenant de l'ATCC et les séquences complètes du pF242 et le pF243 ont été déposées dans la base de données GenBank sous les numéros d'accession suivants : EU850812 et EU850813 ([Annexe VIII](#) et [Annexe IX](#)).

Le plasmide pF242 présente une taille de 3 936 pb avec un G+C% de 28,5% qui est en adéquation avec le G+C% des génomes des bactéries de la famille des *Francisellaceae* proche de 30% ²¹. Trois régions codantes, notées de F242_0001 à F242_0003, ont été prédites à partir de la séquence nucléotidique du pF242 à l'aide du programme « ORF finder ». Afin d'identifier la fonction des protéines hypothétiques codées par ces régions, nous avons recherché, à l'aide du programme en ligne BLASTn, des homologies entre leur séquence en acides aminés prédite et celles de protéines déjà caractérisées ([Tableau 29](#)).

Tableau 29. Analyse des régions codantes du pF242 de *F. philomiragia* ATCC 25016

Plasmide ou région codante	Position	MM ^a	pI ^b	Identité ^c	Meilleur score dans BLASTn	N° d'accession dans GenBank
pF242						
F242_0001	1-942	37 283	9,10	28%	Hélicase de <i>T. volcanium</i>	BA000011
F242_0002	1 578-2 498	36 410	9,59	35%	Réplicase de <i>S. suis</i>	AAFA020000098
F242_0003	3 275-3 535	9 791	4,52	/	Aucune similarité significative	/

^a MM, masse molaire en Da

^b pI, pH isoélectrique.

^c Identité avec les séquences protéiques enregistrées dans NCBI

La région F242_0001 code pour une protéine de 313 acides aminés (aa), qui montre 28% d'identité avec une hélicase d'ADN simple brin dépendant d'une ATPase (BA000011) présente chez *Thermoplasma volcanium*.

La région F242_0003 code pour une protéine de 86 aa, pour laquelle aucune homologie n'a pu être identifiée.

La région F242_0002 code pour une protéine de 306 aa présentant des homologies de séquences avec les réplicases de la famille des Rep_1, qui sont impliquées dans un mécanisme de réplication en cercle déroulant (rolling circle mechanism), comme celui décrit chez le bactériophage Φ X174²⁹⁵ et dans le plasmide pC194 de *Staphylococcus aureus*^{296, 297}. Cette famille de protéines est caractérisée par la présence dans la séquence en acides aminés d'un domaine pfam01446, lui-même constitué de trois motifs.

Nous avons identifié les trois motifs du domaine pfam01446 dans la séquence en acides aminés de la protéine prédite à partir de la région F242_0002, en la comparant à celles d'autres protéines de la famille des réplicases Rep_1 (Tableau 30).

D'après cette analyse la protéine F242_0002 du pF242 serait donc une réplicase proche de celle du plasmide pC194 de *Staphylococcus aureus*, indiquant que le pF242 se réplique selon un mécanisme en cercle déroulant.

Tableau 30. Caractérisation par alignement de séquence de la réplicase prédite et codée par F242_0002. Alignement des motifs 1, 2, et 3 du pF242 avec des motifs similaires issus de réplicases impliquées dans un mécanisme de réplication en cercle déroulant²⁹⁷. Les acides aminés en caractère gras correspondent à des résidus conservés dans les différents motifs²⁹⁸.

	Séquence protéique du :		
	Motif 1	Motif 2 ^a	Motif 3 ^b
Φ X174	F DTLT L ADD	G RL H F H AV H F M	V G F Y V A K Y V N K K S D M
pC194	F VLTAP K D V	Y NP H F H V L I A V	E L Y E M A K Y S G K D S D Y
pF242	F LTLT V P N C	A HP H F H I A L A V	T V K E L A K Y C I K S T D L

^a Motif 2 : le motif HUH est un domaine de liaison à un métal des réplicases de cette famille^{297, 298} (H: histidine, U: résidu hydrophobe).

^b Motif 3 : domaine catalytique contenant une tyrosine conservée (soulignée) impliquée dans une attaque nucléophile au site d'initiation de la réplication du plasmide.

Un second élément présent sur la séquence nucléotidique du pF242 conforte l'hypothèse d'une réplication en cercle déroulant. En effet, les plasmides qui se répliquent selon ce mécanisme possèdent une région particulière sur leur séquence nucléotidique appelée « région LIC » pour « leading-strand initiation and control ». La région LIC possède une origine de réplication nommée *dso* pour « double-strand origin », qui correspond au site de coupure de la réplicase à partir duquel le plasmide sera répliqué. L'origine *dso* est elle-

même constituée de deux motifs nommés *bind* et *nic*. Le motif *nic* est une région conservée parmi les plasmides à réplication en cercle déroulant ²⁹⁸.

Nous avons identifié dans la séquence nucléotidique du pF242, 99 pb en amont de la région F242_0002, une région présentant une homologie avec le motif *nic* du pC194, (Tableau 31).

Tableau 31. Identification de la région *nic* hypothétique du pF242. Alignement de la région *nic* du pF242 avec celle d'éléments mobiles à réplication en cercle déroulant ²⁹⁸

Plasmide ou phage	Séquence nucléotidique des régions <i>nic</i> ^a :
pC194	TCTTTCTTATCTTG / ATAATA
ΦX174	GCTCCCCCAACTTG / ATATTA
p242 ^b	TTGGTCTTTACTTG / ATACAA

^a Les lettres en caractère gras indiquent les bases conservées de la région *nic*. Le trait horizontal indique le site de coupure de la réplicase.

^b Hypothétique région *nic* du plasmide pF242.

Le plasmide pF243 présente une taille de 5 072 pb avec un G+C% de 31,9% qui est en adéquation avec le G+C% des génomes des bactéries de la famille des *Francisellaceae* ²¹. Six régions codantes, notées de F243_0001 à F243_0006, ont été prédites à partir de la séquence nucléotidique du pF243 à l'aide du programme « ORF finder ». Comme pour l'analyse du pF242, nous avons recherché des homologies entre les séquences en acides aminés prédites à partir des six régions codantes du pF243 et celles de protéines déjà caractérisées (Tableau 32).

Tableau 32. Analyse des régions codantes du pF243 de *F. philomiragia* ATCC 25017

Plasmide ou région codante	Position	MM ^a	pI ^b	Identité ^c	Meilleur score dans BLASTn	N° d'accession dans GenBank
pF243						
F243_0001	282-539	9 875	5,17	98%	Protéine Phd du pFNL10 de <i>F. novicida</i> -like F6168	AF121418
F243_0002	537-790	10 453	9,30	75%	Protéine Doc du pFNL10 de <i>F. novicida</i> -like F6168	AF121418
F243_0003	1 544-2 422	33 586	9,80	92%	Région codante hypothétique du pFNL10	AF121418
F243_0004	2 908-3 375	17 754	9,42	/	Aucune similarité significative	/
F243_0005	3 379-3 875	17 599	6,29	/	Aucune similarité significative	/
F243_0006	3 989-4 981	39 007	8,20	59%	RepA du pFNL10 de <i>F. novicida</i> -like F6168	AF121418

^a MM, masse molaire en Da

^b pI, point isoélectrique.

^c Identité avec les séquences protéiques enregistrées dans NCBI

La région F243_0001 code pour une protéine de 85 aa, qui présente 98% d'identité avec la protéine Phd du plasmide pFNL10 de *Francisella novicida*-like F6168 (AF121418).

La région F243_0002 code pour une protéine de 84 aa, qui montre 75% d'identité avec la protéine Doc de ce même plasmide pFNL10. Les régions F243_0001 et F243_0002 sont disposées en opéron de la même manière que l'opéron *phd-doc* du pFNL10²⁷².

La région F243_0003 code pour une protéine de 292 aa qui montre 92% d'identité avec une des protéines du pFNL10 identifiée comme une intégrase ou une recombinaise²⁷². Notre analyse indique que cette protéine correspondrait à une intégrase, cette dernière présentant 47% d'identité avec l'intégrase du plasmide pHS-Rec d'*Haemophilus parasuis* (AY862436).

Les régions F243_0004 et F243_0005 codent respectivement pour des protéines de 155 et 165 aa, pour lesquelles aucune homologie de séquence n'a pu être identifiée.

La région F243_0006 code pour une protéine de 330 aa présentant des homologies avec les réplicases de la famille des Rep_3, qui sont impliquées dans un mécanisme de réplication thêta²⁹⁸. Cette famille de protéines est caractérisée par la présence dans la séquence en acides aminés d'un domaine pfam1051, lui-même constitué de deux motifs : un motif « leucine zipper » (LZ) situé dans la partie N-terminale de la séquence protéique et impliqué dans une interaction protéine-protéine ; un motif « helix-turn-helix » (HTH) situé dans la partie C-terminale de la séquence protéique et impliqué dans une interaction protéine-ADN²⁹⁸.

Nous avons identifié les motifs LZ et HTH dans la séquence en acides aminés prédite à partir de la région F243_0006 ([Tableau 33](#)), semblant indiquer que le pF243 se réplique selon le mécanisme thêta.

Un second élément présent sur la séquence nucléotidique du pF243 conforte l'hypothèse d'une réplication selon le mécanisme thêta. En effet, deux motifs répétés caractéristiques de l'origine de réplication des éléments mobiles se répliquant selon ce mécanisme ont été identifiés en amont de la région codante F243_0006. Le premier motif répété présente une taille de 12 pb et s'étend de la position 150 à 173. Le deuxième motif répété, identique à celui décrit dans le pFNL10, présente une taille de 31 pb et s'étend de la position 1 à 87. De plus, nous avons identifié, entre la position 79 et 95, une troisième région, présentant un motif inversé-répété, également caractéristique du mécanisme de réplication thêta.

Tableau 33. Caractérisation par alignement de séquence de la réplicase prédite et codée par F243_0006.
Alignement des motifs LZ et HTH de la protéine F243_0006 avec des motifs similaires de plusieurs membres de la famille des réplicases Rep_3²⁹⁸.

	Séquence protéique du :	
	Motif LZ ^a	Motif HTH ^b
pF243	NSLVAGKYHLTKEEQNLI FLVASQINS	VDEIINRF-----SMPDTYKIRYSHFKESFLHKSLEEIN
pFNL10	N TLVAGKYSLTKEEQNLI FLVASMVKR	VDDMINDF-----DLPKSYSNRYSHFKESFLHKSLEEIN
pPS10	NKLI ESSHTLTLNEKRLVLC AASLIDS	LAQLREMF-----DLGDKYQD-VKDMRKRVLYPAL EEVN
pECB2	NRLVEASHTLTLNEKRLVLC AASLIDP	LDQLRQML-----DLGDKYQD-VKNLRVRVLDPALKELN
pUCP26	NALVEAAYRLSVQEQRIVLACISQVKR	IDQLRKWF-----QLEGRYPS-IKDFKLRVLDPAVTQIN
pCM1	NALVEASYRLTPAEQRIMLGCITQVRR	VAWLREAF-----QLDGKYPA-IKDLKRWVIEPATAQIN
pFA3	NSLIEANYRLSIDEIRILAL TIGTMDP	VEKLKEWL-----QVENKYPR-FNSLNQRVLEPAITEIN
pCU1	NELTEAAYYLP LQAKRVLWLC LMQAYF	HDWLCERF-----MLPASQKNNIAEMKRTFLEPALKKIN
pSC101	NELAISRYDLTEHETK LILCCVAL LNP	LDEFKFML-----MLENNYHE-FKRLNQVWLKPI SKDLN

Jpred^c 

^a Motif « leucine zipper » caractérisé par trois ou quatre leucines (lettres en caractères gras) séparés de six résidus (description du motif LZ dans la base de données Prosite sous le numéro PS00029).

^b Motif « helix-turn-helix » (description du motif HTH dans la base de données Prosite sous le numéro PS50943).

^c Prédiction de la structure secondaire à l'aide du logiciel en ligne Jpred. Hélice α (rectangle gris) ; Feuillet β (flèche grise).

II – 2. Première génération de vecteurs navettes dérivés du pF242 et du pF243

Une première génération de vecteurs navettes répliatifs chez *E. coli* et chez *Francisella* a été construite à partir des plasmides pF242 et pF243. Deux approches nous ont permis d'atteindre cet objectif.

Dans la première approche, nous avons introduit l'origine de répliation p15A d'*E. coli*, pour le maintien des vecteurs dans cette espèce bactérienne, et un gène de résistance à un antibiotique pour la sélection des clones. Au cours de cette approche, nous avons introduit des gènes de résistance à la tétracycline, au chloramphénicol et à la kanamycine afin de tester l'expression de gènes hétérologues chez *Francisella*.

Dans la seconde approche, nous avons inséré les plasmides pF242 et pF243 dans le vecteur de clonage pCR[®]XL-TOPO, qui porte déjà une origine de répliation spécifique à *E. coli* et un gène de résistance à un antibiotique pour la sélection des clones.

A l'issue de ce travail, nous avons obtenu huit vecteurs navettes répliatifs chez *E. coli* et chez *Francisella* : le pF242-Tc, le pF242-Km, le pF242-Cm, le pF243-Tc, le pF243-Km, le pF243-Cm, le pF242-XL et le pF243-XL (Tableau 27, Figure 35).

II – 3. Optimisation du milieu de culture pour l'isolement de *Francisella*

Les premiers essais de transformation ont été réalisés avec les constructions de première génération, en sélectionnant les clones sur gélose BHI-2% IsoVitalex™ additionnée de l'antibiotique adéquat, mais ces derniers n'ont pas fonctionné. Des clones ont seulement été obtenus avec les vecteurs témoins, pKK214 et pKK202, mais aucun transformant n'a été obtenu avec les constructions de première génération basées sur le pF242 et le pF243.

Afin de résoudre ce problème, nous avons réalisé de nouveaux essais en ajoutant de l'hémoglobine à 2% final dans le milieu de sélection. Cette modification de la composition du milieu a nettement amélioré l'efficacité de transformation des vecteurs témoins et a réduit le temps d'incubation nécessaire à l'apparition des clones. Ainsi, après quatre jours d'incubation à 37°C, nous sommes passés de 200 à 1 000 clones avec *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et de 50 à 500 clones avec *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 transformées avec le pKK214. L'addition d'hémoglobine a également permis d'obtenir pour la première fois des clones de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 à partir du pF242-XL, pF243-XL, pF243-Cm et pF242-Cm.

Après ces premiers résultats positifs, les méthodes de cryotransformation et d'électroporation ont été normalisées en utilisant toujours la même quantité d'ADN (100 ng) pour la transformation des bactéries et en estimant le nombre de bactéries transformées, à l'aide de la méthode de dénombrement par étalement en milieu solide sur gélose chocolat enrichie. Nous avons exprimé les efficacités de transformation des deux méthodes en nombre de transformants par µg d'ADN pour une quantité initiale de bactéries transformées de 10⁹ UFC (transformants/µg ADN/10⁹ UFC).

II – 4. Efficacité de transformation de la première génération de vecteurs navettes

Nous avons comparé l'efficacité de la cryotransformation et de l'électroporation à l'aide des vecteurs de première génération en utilisant deux souches virulentes : *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06.

Les efficacités de transformation suivantes ont été obtenues, respectivement, suite à l'électroporation et à la cryotransformation de la souche *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 : ~10⁶ et ~4.10⁵ avec le pKK214 ; ~2.10⁵ et ~7.10⁴ avec le pKK202 ; ~2.10³ et ~10³

avec le pF242-Cm ; $\sim 5.10^5$ et $\sim 7.10^4$ avec le pF243-Cm ; $\sim 4.10^5$ et $\sim 2.10^5$ avec le pF242-Km ; $\sim 10^3$ et $\sim 10^2$ avec le pF242-XL (Figure 39A).

Les efficacités de transformation suivantes ont été obtenues, respectivement, suite à l'électroporation et à la cryotransformation de la souche *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 : $\sim 2.10^5$ avec le pKK214 avec les deux méthodes ; $\sim 2.10^4$ et $\sim 2.10^3$ avec le pKK202 ; $\sim 8.10^4$ et $\sim 10^4$ avec le pF242-Km ; ~ 50 et $\sim 10^3$ avec le pF243-Km (Figure 39B). Les vecteurs pF243-Cm, pF242-XL et pF243-XL ont pu être introduits dans cette bactérie uniquement par électroporation avec une efficacité de ~ 5 transformants/ μg ADN/ 10^9 UFC. Aucun transformant n'a pu être isolé après l'électroporation ou après la cryotransformation de cette souche avec le vecteur pF242-Cm.

Par ailleurs, aucun transformant n'a été isolé à partir des souches *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 ni avec le pF242-Tc ni avec le pF243-Tc quelque soit la méthode de transformation utilisée.

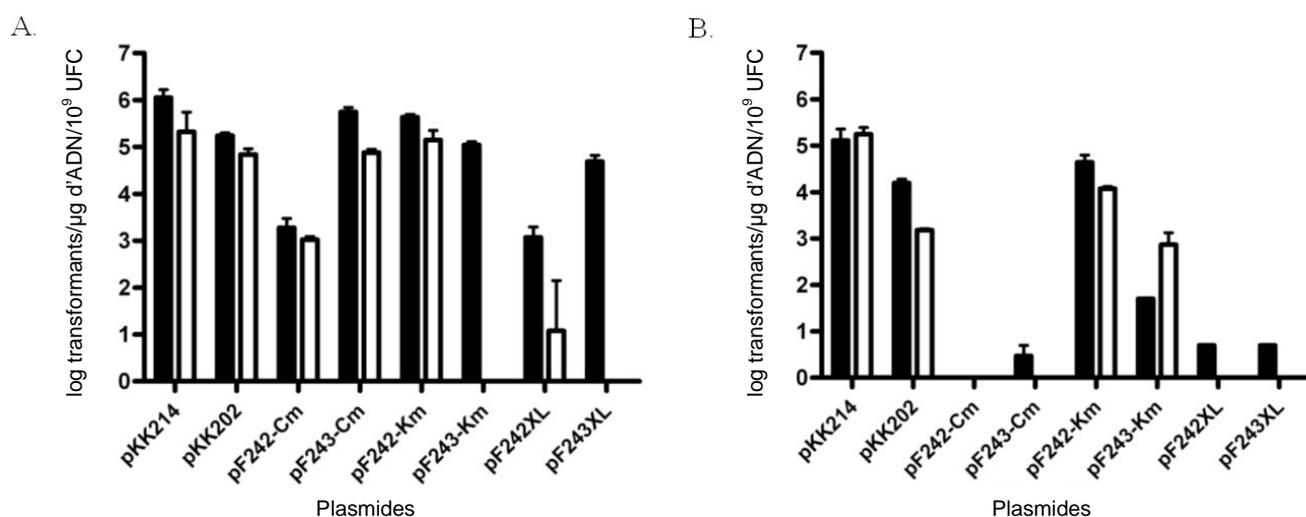


Figure 39. Efficacité d'électroporation (barres noires) et efficacité de cryotransformation (barres blanches) avec les vecteurs de première génération introduits dans *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 (A) et *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 (B). L'efficacité de transformation, exprimée en log de transformants par microgramme d'ADN pour 10^9 UFC transformées (\pm l'écart-type), a été déterminée à partir de trois échantillons de bactéries compétentes. Plasmides témoins positifs : pKK214²⁵⁴ et pKK202²⁵³.

Cette expérience a montré que l'efficacité de transformation variait en fonction de la méthode et de la souche réceptrice.

En effet, en utilisant l'une ou l'autre des deux méthodes, la transformation a été moins efficace avec la souche de la sous-espèce *tularensis* comparativement à la souche de la sous-espèce *holarctica*. Par électroporation, huit constructions ont été introduites dans *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00, mais seulement sept dans *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06. De la même manière, suite à la cryotransformation, six constructions ont été introduites dans *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et seulement quatre dans *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06. Ceci explique probablement que nous n'ayons pas réussi à introduire le pF242-Cm dans *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06, ce dernier présentant déjà une faible efficacité de transformation chez *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00. LoVullo et collaborateurs^{258, 299} avaient fait la même observation lorsqu'ils avaient comparé l'efficacité de transformation du pFNLTP1 chez *F. tularensis* subsp. *holarctica* et chez *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4.

D'autre part, l'électroporation est mieux adaptée que la cryotransformation pour introduire de l'ADN chez *Francisella tularensis*. En effet, cette méthode a permis d'introduire les vecteurs navettes dans les deux souches de *Francisella tularensis* avec une efficacité de transformation de 0,3 à 1 log supérieurs à celle de la cryotransformation (excepté pour le pF243-Km dans la sous-espèce *tularensis*).

Au cours de ces expériences, nous avons également observé des différences de cinétique de croissance des transformants selon les vecteurs navettes introduits. Par exemple, le pF243-Cm et le pF242-Km ont été introduits par électroporation dans la sous-espèce *holarctica* avec une efficacité de transformation proche de celle des plasmides témoins pKK214 et pKK202 ($\sim 5 \cdot 10^5$) et de larges colonies sont apparues rapidement après quatre jours d'incubation à 37°C. Au contraire, le pF242-Cm et le pF242-XL ont été introduits avec une efficacité de transformation inférieure de 2 log ($\sim 2 \cdot 10^3$) et les colonies sont apparues plus tardivement après 6 à 7 jours d'incubation à 37°C. Ce retard de croissance a également été observé avec les transformants porteurs du pF243-XL. Nous n'avons pas trouvé d'explications justifiant ces observations. En effet, ces différences ne semblent dues, ni à l'origine de répllication puisque celles du pF243-Cm et du pF242-Km sont différentes, ni à la nature des gènes de résistance aux antibiotiques puisque ceux du pF242-Cm et du pF243-Cm sont identiques et enfin, ni à la taille du plasmide puisque le

vecteur pF243-XL présentant la taille la plus importante (8,3 kb) a été introduit avec une efficacité de transformation élevée ($\sim 10^5$).

Par ailleurs, des études précédentes ont montré que certains gènes hétérologues, dont les gènes de résistance aux antibiotiques provenant d'*E. coli*, n'étaient pas correctement exprimés chez *Francisella*^{258, 299}, probablement à cause d'une mauvaise reconnaissance de leurs promoteurs par l'ARN polymérase. Grâce aux vecteurs de première génération, nous avons souhaité tester l'expression des gènes de résistance à la tétracycline, au chloramphénicol et à la kanamycine, provenant du pACYC184 et du pACYC177.

Ainsi, aucun transformant de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 n'a été isolé après introduction des constructions porteuses du gène de résistance à la tétracycline, suggérant que ce gène n'est pas correctement exprimé par ces souches. Nous avons également constaté que l'expression de certains gènes était dépendante de la souche considérée. Par exemple, le gène de résistance au chloramphénicol du pKK202 ne semble pas être exprimé chez *F. novicida* CIP 5612 contrairement à ce qui a été observé chez *F. tularensis* (résultats non présentés).

Ces observations confirment que certains gènes hétérologues ne sont pas correctement exprimés chez *Francisella*. Afin de résoudre ce type de problèmes, il sera envisageable de cloner un promoteur de *Francisella* en amont de ces gènes, ce qui assurera leur expression dans ce genre bactérien.

II – 5. Expression de la GFP chez *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06

Une deuxième génération de vecteurs navettes a été construite à partir des vecteurs de première génération capables de se maintenir chez *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 (Tableau 28). De nouveaux éléments fonctionnels y ont été ajoutés, dont le gène *gfp* placé sous le contrôle du promoteur de l'opéron *groES* de *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*, permettant la production par cette souche d'une protéine fluorescente (Green Fluorescent Protein – GFP) et un site de clonage multiple afin de faciliter l'insertion de gènes d'intérêt dans ces vecteurs.

Nous avons testé l'expression de la GFP par *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 à partir du pF242-*gfp*-MCS-Km. Après électroporation de ce vecteur dans la

bactérie, nous avons obtenu des colonies vertes démontrant que *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 produisait la GFP (Figure 40).

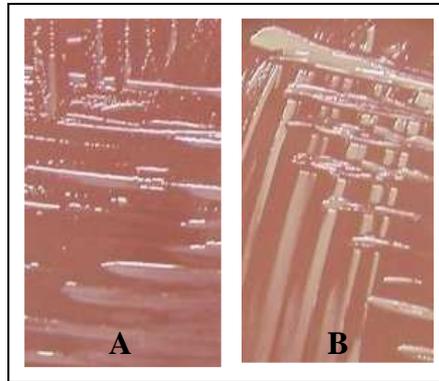


Figure 40. Isolement sur gélose chocolat de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 (A) et de *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 (pF242-*gfp*-MCS-Km) (B) – incubation de 72 h à 37°C sous atmosphère normale.

II – 6. Coexistence de vecteurs dérivés du pF242 et du pF243 dans *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00

Le résultat de l'analyse bioinformatique des séquences nucléotidiques des plasmides pF242 et pF243 a indiqué que ces derniers se répliquent selon des mécanismes différents et par conséquent qu'ils appartiennent à deux groupes d'incompatibilité distincts. Ainsi, nous avons vérifié la possibilité de maintenir deux de leurs dérivés dans la même bactérie hôte.

Pour cela, nous avons introduit par électroporation le pF242-Km et le pF242-Cm dans *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00. Après extraction de l'ADN plasmidique et digestion enzymatique, nous avons révélé la présence des deux plasmides, de 8 000 et de 6 000 pb, dans la bactérie (Figure 41).

Le fait d'avoir réussi à faire maintenir le pF242-Km et le pF243-Cm dans la même souche confirme les conclusions de notre analyse en ce qui concerne les groupes d'incompatibilité différents du pF242 et du pF243.

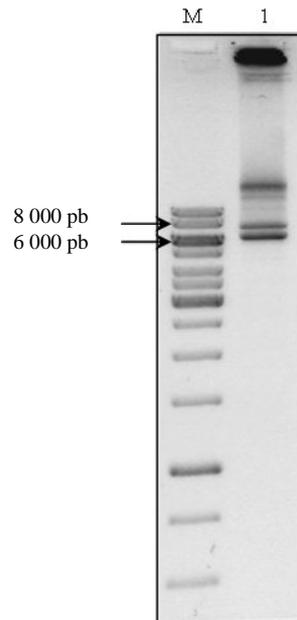


Figure 41. Électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%-BET des vecteurs pF242-Km (6 043 pb) et pF243-Cm (7 037 pb) après linéarisation par l'enzyme de restriction *SphI*. ADN plasmidique extrait de *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 complémenté avec le pF242-Km et le pF243-Cm. M, marqueur de taille de 1-kb (Fermentas, Ontario, Canada).

DISCUSSION

DISCUSSION

Francisella tularensis est la bactérie responsable de la tularémie, zoonose des petits mammifères. Les trois sous-espèces responsables de la maladie sont *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* isolée en Amérique du Nord, *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, isolée dans tout l'hémisphère Nord et *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*, isolée en Asie Centrale et en Russie. La tularémie, dont l'expression clinique est polymorphe selon la voie de pénétration de l'agent infectieux, se manifeste sporadiquement chez l'Homme. En France, depuis 2002, une trentaine de cas ont été décrits en moyenne par an⁸⁰. Toutefois, le fort potentiel infectieux de *Francisella tularensis* et les conséquences que pourraient engendrer une utilisation agressive de cette bactérie justifie la surveillance de l'émergence des foyers infectieux et de l'apparition de la tularémie chez l'Homme et chez l'animal.

L'étude des bactéries hautement pathogènes, telles que *Francisella tularensis*, pose un problème de sécurité biologique et leurs manipulations doivent être réalisées dans des laboratoires adaptés de niveaux de sécurité biologique 3 (NSB3). L'étude de *Francisella tularensis* a en partie été ralentie par cette contrainte technique. Aussi, la possibilité de manipuler dans un laboratoire NSB2 *Francisella novicida*, opportuniste chez l'Homme et la souche atténuée *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* LVS explique que ces dernières aient majoritairement été utilisées comme modèles d'études des mécanismes de virulence de *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*.

Francisella tularensis est un pathogène intracellulaire facultatif, qui infecte préférentiellement les macrophages. La virulence de la bactérie repose sur sa capacité à survivre et à se multiplier dans les cellules hôtes. Actuellement, aucun facteur de pathogénicité majeur, tel qu'une toxine ou une enzyme particulière, sur lequel reposerait la

virulence de la bactérie n'a pu être mis en évidence. Le seul élément clé identifié jusqu'à présent est constitué d'une région de 33 kb dupliquée sur les génomes des sous-espèces les plus pathogènes. Cette région nommée « îlot de pathogénicité » (FPI – *Francisella Pathogenicity Island*) comporte de nombreux gènes impliqués dans la croissance intracellulaire et dans la virulence de *Francisella tularensis* ou de *Francisella novicida*⁹⁶. Cependant, d'autres gènes également impliqués dans la virulence ou dans la croissance intracellulaire de ces bactéries n'appartiennent pas à cet îlot²⁰²⁻²⁰⁴. Ainsi, les études réalisées jusqu'à présent semblent indiquer que la virulence de *Francisella tularensis* est plurifactorielle. Tous les gènes qui participent au métabolisme de la bactérie sont potentiellement des facteurs de virulence, comme par exemple les gènes *pur* impliqués dans la croissance intracellulaire et dans la virulence de *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*^{219, 220}.

Dans le cadre de cette thèse, nous voulions progresser dans la compréhension de la virulence de *Francisella tularensis* et particulièrement dans celles des deux sous-espèces les plus pathogènes pour l'Homme : *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* et *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. Ce travail a débuté dans un contexte où très peu d'outils moléculaires étaient disponibles pour l'étude de la bactérie et peu d'éléments étaient connus sur la virulence de *Francisella tularensis*.

Parmi les gènes pressentis pour leur implication dans la virulence de *Francisella tularensis* figure une enzyme, l'AcpA, présentant deux activités enzymatiques : une activité phosphatase acide et une activité phospholipase C. Cette caractéristique classe cette enzyme parmi les membres de la superfamille des PLCs/phosphatases, comme les PLCs de *Mycobacterium tuberculosis*, de *Bordetella* spp., et de *Burkholderia pseudomallei*^{239, 240}.

Certains membres de la famille des phosphatases acides (ACP) participent à la virulence de bactéries intracellulaires, comme chez *Legionella micdadei*¹¹⁶ et chez *Coxiella burnetii*²²⁸. Ces enzymes interviennent dans l'inhibition du stress oxydant des cellules phagocytaires, favorisant ainsi la survie des bactéries dans la cellule.

Les phospholipases peuvent également intervenir dans la virulence des bactéries. Elles peuvent provoquer la rupture des membranes, comme la listeriolysine de *Listeria monocytogenes*²⁴⁰ ou perturber des signaux intracellulaires, conduisant ainsi à l'inhibition de la maturation du phagosome, comme la PLC de *Mycobacterium tuberculosis*²⁴³ ou à

l'inhibition du stress oxydant des cellules phagocytaires comme la PLC de *Pseudomonas aeruginosa*²⁴⁴.

L'AcpA de *Francisella tularensis*, identifiée et caractérisée en 1996, est impliquée dans l'inhibition du stress oxydant des polynucléaires neutrophiles¹⁴², suggérant que cette enzyme est un facteur de virulence de la bactérie. Pourtant, une première étude a démontré que l'AcpA ne jouait pas de rôle dans la virulence de *Francisella novicida* chez la souris²⁴⁶. Au contraire, une seconde étude, réalisée en 2007 par une équipe américaine, a démontré la participation de l'AcpA dans la virulence et dans croissance intracellulaire de *Francisella novicida* à partir de modèles d'infections expérimentales *in vivo* ou *in vitro*²³⁶. Les auteurs ont extrapolé les conclusions sur la virulence de *Francisella novicida* à celle de *Francisella tularensis*.

Dans ce contexte, notre objectif a été d'évaluer, pour la première fois, l'implication de l'AcpA dans la virulence de la sous-espèce la plus pathogène *F. tularensis* subsp. *tularensis*.

Dans un premier temps, nous avons développé des outils moléculaires pour la construction d'un mutant déficient en AcpA à partir des méthodologies existantes. Pour cela, nous avons construit un vecteur suicide porteur du gène *acpA* muté par délétion puis insertion d'un gène de résistance à un antibiotique. Ce vecteur suicide a ensuite été utilisé pour créer une mutation par échange d'allèles. L'application de cette méthode, rendue difficile par la culture fastidieuse de *Francisella tularensis* et par les variations individuelles des souches, a été optimisée et nous a permis d'obtenir le mutant recherché.

Dans un deuxième temps, nous avons comparé l'activité enzymatique exprimée lors d'une culture en milieu liquide chez *Francisella novicida*, chez *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* et chez *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. L'activité enzymatique a également été caractérisée chez le mutant déficient en AcpA et chez le mutant complétement avec le gène sauvage afin de vérifier la mutation. Enfin, un modèle d'infection expérimentale par voie respiratoire a été développé chez la souris afin d'évaluer l'implication de l'enzyme dans la virulence de *Francisella tularensis*.

Nos résultats ont démontré que les profils d'expression de l'AcpA observés chez les trois souches étudiées étaient différents.

Francisella tularensis subsp. *holarctica* 061/00 ne produit pas l'AcpA. En effet, une très faible activité phosphatase acide a été détectée dans les surnageants de culture et dans les

extraits intracellulaires. D'autre part, nous avons démontré et caractérisé une mutation par insertion dans la région 5' du gène *acpA*, qui semble être caractéristique des souches de la sous-espèce *holarctica*. Cette insertion, que nous avons nommé iT48, serait à l'origine d'un décalage du cadre de lecture de l'ARN messager correspondant, conduisant à l'interruption de la traduction après le 25^{ème} résidu de la séquence protéique. Nos résultats rejoignent ceux de Hernychova et collaborateurs ²⁴⁷, ainsi que ceux de Hubalek et collaborateurs ²⁴⁸, qui ont successivement démontré par l'analyse protéomique que la souche atténuée *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, ainsi que cinq autres souches de la sous-espèce *holarctica* ne produisaient pas l'AcpA.

Au contraire, *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 et *Francisella novicida* produisent l'AcpA mais la sécrétion de l'enzyme est différente entre ces deux espèces. Alors que l'activité AcpA chez *Francisella novicida* CIP 5612 est majoritairement extracellulaire, celle de *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 est majoritairement intracellulaire. Il est possible que la différence observée entre ces deux espèces soit liée à la nature ou à la régulation de leurs systèmes de sécrétions respectifs, mais ceci n'a jamais été démontré.

Nous avons développé un modèle d'infection expérimentale chez l'animal à l'aide de souris Swiss. L'infection a été réalisée par instillation nasale car la voie respiratoire serait celle privilégiée lors d'une utilisation agressive d'agents pathogènes. Historiquement, les souches BALB/c, C57BL/6 et les AKR/J ont été les plus utilisées lors des expériences avec *Francisella*. La sensibilité des souris varie en fonction des souches, de leurs caractéristiques génétiques ^{300, 301, 302} et de la voie d'inoculation de l'agent infectieux ³⁰¹. En effet, les souris sont plus sensibles lorsque l'inoculum est injecté par voie intrapéritonéale, la souche C57BL/6 est une des souches les plus sensibles et au contraire, la souche Swiss a montré une résistance importante après une infection par *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* LVS ^{300, 301}. Ainsi, nous avons choisi la souche Swiss pour nos expérimentations, d'une part, car il s'agit d'une population hétérozygote dont les variabilités individuelles sont représentatives d'une population normale, et d'autre part, car elle fait partie des souches qui résistent le mieux à l'infection, ce qui constitue un avantage au regard des très faibles doses infectieuses de *F. tularensis*.

A partir de ce modèle d'infection expérimentale, nous avons estimé les doses létales 50 (DL50) de *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et de *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* 278/06, sept jours après l'infection.

Afin d'optimiser la détermination de ces DL50, nous avons comparé deux méthodes de dénombrement bactérien en milieu solide. La méthode employée jusqu'à présent pour le dénombrement de *Francisella* est la méthode par étalement de 100 µL de suspension bactérienne à la surface de la gélose^{191, 301-305}. Le choix de cette méthode est justifié par l'utilisation, pour la culture de *Francisella*, de milieux riches rendus opaques par la présence d'hémoglobine. Nous avons mis au point une méthode de dénombrement en milieu solide par inclusion de 1 mL de suspension bactérienne dans de la gélose BHI-2% IsoVitaleXTM. Cette dernière, basée sur un volume d'échantillon supérieur à la méthode par étalement, est plus précise. Nous l'avons vérifié lors de notre étude puisque les dénombrements des suspensions bactériennes par étalement ont été sous-estimés d'environ 1 log comparativement à la méthode par inclusion. La différence de résultats obtenus avec ces deux méthodes de dénombrement en milieu solide est non négligeable et souligne l'importance de connaître la nature du système utilisé pour le dénombrement bactérien lors de la détermination de DL50 ou lors d'infections expérimentales.

La DL50 de *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* 278/06 a été estimée à 30 UFC par souris et celle de *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 à 820 UFC par souris, indiquant que la sous-espèce *tularensis* est plus virulente que la sous-espèce *holarctica* dans ce modèle. Ces valeurs de DL50 sont en accord avec les valeurs reportées dans la littérature après une infection par voie intranasale. En effet, Wu et collaborateurs³⁰⁵ ont montré que moins de 10 UFC d'une souche de la sous-espèce *tularensis* suffisaient à provoquer, après sept jours d'infection, la mort de souris BALB/c, C57BL/6, DBA/2 et C3H/HeN. Conlan et collaborateurs³⁰³ ont démontré la même chose avec la souche *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 en utilisant des souris BALB/c et C57BL/6. Fortier et collaborateurs³⁰¹, quant à eux, ont déterminé une valeur de DL50 de 300 UFC pour la souche *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS avec des souris BALB/c.

Après avoir déterminé les DL50, nous avons évalué l'influence de la mutation du gène *acpA* sur la virulence d'une souche de la sous-espèce *tularensis*. Ainsi, à partir du modèle d'infection expérimentale précédemment développé, nous avons montré que l'AcpA n'intervient pas dans la virulence de *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* chez la souris Swiss infectée par voie respiratoire.

D'après l'ensemble de ces données, l'extrapolation des conclusions obtenues sur le rôle de l'AcpA dans la virulence de *Francisella novicida* à celle de *Francisella tularensis* n'est pas justifiée. En effet, le profil d'expression et la sécrétion de l'enzyme est différente chez ces deux espèces et l'AcpA n'est pas impliquée dans la virulence de *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* contrairement à ce qui a été démontré chez *Francisella novicida*.

A ce stade, plusieurs hypothèses peuvent être formulées en ce qui concerne le rôle de l'AcpA dans la virulence des souches du genre *Francisella*.

Première hypothèse : « l'AcpA n'est pas un facteur de virulence de *Francisella tularensis* ».

Cette hypothèse est confortée par le résultat de notre étude, mais remet en question ce qui a récemment été démontré chez *Francisella novicida* par Mohapatra et collaborateurs²³⁶. Cependant, en considérant les trois études déjà réalisées sur l'AcpA de *Francisella novicida*, quelques éléments contradictoires soutiennent cette hypothèse.

En effet, Baron et collaborateurs ont dans un premier temps démontré que l'AcpA n'était pas impliquée dans la virulence de *Francisella novicida*, en utilisant un modèle murin infecté à une dose de 2 000 UFC par voie intra péritonéale²⁴⁶.

D'autre part, dans l'étude de Mohapatra et collaborateurs, la mutation du gène *acpA* chez cette bactérie a seulement provoqué un retard de mortalité au cours de trois jours qui suivirent l'infection, à une dose de 100 UFC par voie intrapéritonéale. Ceci démontre que la contribution de l'AcpA dans la virulence de cette bactérie, qui intervient au début de l'infection, est minime²³⁶. Par ailleurs, cette étude ayant été réalisée avec des lots de cinq souris, mériterait d'être renouvelée avec des effectifs de souris plus importants afin de gagner en significativité. Les auteurs suggèrent que, dans l'étude de Baron et collaborateurs, la mutation incomplète du gène, se traduisant par la délétion de 162 résidus dans la région C-terminale de la protéine, ne fut pas suffisante pour abolir totalement l'activité de l'enzyme et par conséquent la virulence de la bactérie. Cependant, cette hypothèse n'a jamais été vérifiée. D'après la structure secondaire de l'AcpA²³⁹, on observe que parmi les résidus mutés par délétion, dans l'étude de Baron et collaborateurs, figurent les résidus Asp-386 et Asp-387, impliqués dans le site actif de l'enzyme, tout comme les groupes de résidus suivants : 426 à 430, 417 à 420, et 379 à 385, impliqués dans la structure du noyau central de l'enzyme. Par conséquent, il n'est pas certain que l'hypothèse de Mohapatra et collaborateurs soit vraie.

Enfin, lors d'une seconde étude cette même équipe n'a pas mis en évidence l'influence de la mutation de l'AcpA sur la virulence de *Francisella novicida*²³⁷. Dans le modèle d'infection expérimentale utilisée, les souris ont été infectées par une dose de 1 000 UFC par instillation nasale et le relevé de mortalité a été réalisé au delà de 10 jours.

Deuxième hypothèse : « l'AcpA contribue à la virulence de la bactérie au début de l'infection, mais cette contribution serait plus importante chez *Francisella novicida* comparativement à *Francisella tularensis* ».

Cette hypothèse expliquerait que nous n'ayons pas observé d'effets de la mutation du gène *acpA* sur la virulence de *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* et que la mutation naturelle du gène chez *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* n'affecte pas la virulence de cette sous-espèce chez l'Homme. Il n'est pas exclu que les mécanismes de virulence mis en œuvre par *Francisella novicida* soient différents de ceux de *Francisella tularensis*. En effet, *Francisella novicida* recrute et infecte de manière plus importante les polynucléaires neutrophiles comparativement à *Francisella tularensis*¹⁶². Sachant que les défenses antibactériennes des polynucléaires neutrophiles sont essentiellement basées sur le stress oxydant et que l'AcpA est impliquée dans l'inhibition de ce mécanisme, une différence dans la nature des cellules phagocytaires recrutées et infectées par ces deux espèces pourrait expliquer l'implication différente de l'AcpA dans la virulence de ces deux espèces bactériennes.

Par ailleurs, dans le cadre de cette deuxième hypothèse, le défaut de sécrétion de l'AcpA chez *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* comparativement à *Francisella novicida* et la mutation du gène chez *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* pourraient être des phénomènes évolutifs de la virulence de *Francisella tularensis*, comme nous avons pu l'observer pour le gène *pdpD* absent chez la sous-espèce *holarctica*⁹⁶ et pour le gène *pepO* absent chez *Francisella tularensis* mais présent chez *Francisella novicida*²⁰². L'AcpA ne serait plus indispensable à la virulence de *Francisella tularensis* alors qu'elle le serait encore à celle de *Francisella novicida*.

Troisième hypothèse : « l'AcpA contribue à la virulence de *Francisella novicida* et de *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*, mais notre modèle animal ne nous a pas permis de le démontrer ».

En effet, d'après Conlan et collaborateurs¹⁶⁰, les polynucléaires neutrophiles ne sont pas essentiels à la prise en charge de l'infection par *Francisella novicida* par voie respiratoire. L'utilisation d'un modèle d'infection par voie respiratoire ne nous a peut-être pas permis

d'observer l'effet de la mutation du gène *acpA* chez *Francisella tularensis* comparativement à l'étude réalisée avec *Francisella novicida*, basée sur un modèle animal infecté par voie intrapéritonéale²³⁶. Cette hypothèse rejoindrait le fait que Mohapatra et collaborateurs²³⁷, dans leur seconde étude, n'aient pas observé d'effet de la mutation du gène *acpA* sur la virulence de *Francisella novicida* au delà de 10 jours, alors qu'ils avaient infectés les souris par instillation nasale.

Dans le cadre de cette troisième hypothèse, plusieurs propositions peuvent être formulées sur le rôle de l'AcpA dans la virulence de *Francisella tularensis*.

Tout d'abord, l'AcpA présentant une large gamme de substrats¹⁴², pourrait agir dans le macrophage sur de nombreux messagers intracellulaires et conduire à une perturbation de la réponse cellulaire. L'AcpA pourrait alors intervenir dans le devenir de la bactérie dans les cellules phagocytaires, comme cela a déjà été suggéré chez *Francisella novicida*²³⁶. Par exemple, l'activité phosphatase acide étant optimale à pH acide, il est fort probable que cette enzyme soit active dans le phagosome après acidification de ce dernier. Mohapatra et collaborateurs ont d'ailleurs démontré que les mutants de *Francisella novicida* déficients en AcpA étaient séquestrés dans les phagosomes des macrophages et suggèrent que l'AcpA, grâce à sa deuxième activité enzymatique PLC, soit impliquée dans la rupture de la membrane du phagosome permettant ainsi à la bactérie de s'échapper et d'atteindre le cytoplasme²³⁶.

Par ailleurs, l'AcpA purifiée de *Francisella tularensis* inhibe la production d'ions superoxyde par les polynucléaires neutrophiles¹⁴². Ceci suggère que l'enzyme ait une influence directe ou indirecte sur l'activation de la NADPH oxydase. Récemment, il a été montré que l'assemblage des sous-unités de la NADPH oxydase était inhibé dans les polynucléaires neutrophiles infectés par *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* LVS¹⁴³. Les auteurs suggèrent que l'AcpA soit impliquée dans ce mécanisme. Toutefois, nous avons montré dans cette étude que l'AcpA de *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* LVS était mutée et non fonctionnelle, il est donc peu probable que l'AcpA soit impliquée dans l'inhibition de l'assemblage de la NADPH oxydase.

Le mécanisme d'inhibition du stress oxydant par l'AcpA de *Francisella tularensis* n'est pas encore élucidé. Une des caractéristiques de l'enzyme est sa capacité à inhiber ce mécanisme lorsque les cellules phagocytaires sont activées par le *N*-Formyl-méthionyl-leucyl-

phénylalanine (fMLP) qui implique les voies des inositols phosphates, ou par du phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) qui active la protéine kinase C (PKC) ¹⁴² (Figure 6, p.53).

Cette donnée indique que l'AcpA de *Francisella tularensis* agit entre l'activation de la PKC et l'activation de la NADPH oxydase et ne provoquerait pas la déplétion de l'IP₃ et du DAG comme les ACPs déjà décrites ¹⁴². Cependant, l'AcpA, grâce à sa double activité, pourrait agir à plusieurs niveaux du mécanisme intracellulaire d'activation de la NADPH oxydase, en tant que phosphatase acide, comme celles de certains pathogènes intracellulaires qui inhibent le stress oxydant uniquement lorsque les cellules phagocytaires sont activées par le fMLP ^{116, 228, 229}, ou en tant que phospholipase C comme celle de *Pseudomonas aeruginosa* qui inhibe le stress oxydant uniquement lorsque les polynucléaires neutrophiles sont activés par le PMA ²⁴⁵. Ainsi, l'inhibition du stress oxydant par l'AcpA de *Francisella tularensis*, à la fois lorsque les cellules phagocytaires sont activées par le fMLP ou par le PMA, pourrait être la conséquence de sa double activité enzymatique ACP/PLC.

Dans le cadre d'une poursuite des études sur l'AcpA de *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*, plusieurs points pourraient être approfondis.

Actuellement, nous avons caractérisé l'activité phosphatase acide de l'AcpA de *Francisella novicida*, de *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* et de *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. Nous pourrions désormais caractériser l'activité phospholipase C afin de vérifier si des différences phénotypiques entre ces trois souches sont également observées pour cette activité enzymatique.

Pour l'instant, l'AcpA de *Francisella* est classée parmi les PLC/phosphatases, cependant cette enzyme présente des caractéristiques physico-chimiques et structurales nouvelles. Ainsi, une étude biochimique plus approfondie de l'AcpA permettrait de déterminer si cette enzyme constitue une nouvelle famille de protéine et si des différences physico-chimiques, structurales ou fonctionnelles marquées sont présentes parmi les AcpA des bactéries du genre *Francisella*.

Dans le cadre de la troisième hypothèse, selon laquelle l'AcpA contribue à la virulence de *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*, nous pourrions vérifier, à l'aide du mutant construit dans cette étude, les hypothèses formulées au sujet du rôle de l'AcpA dans la virulence de *Francisella novicida*. Ainsi, nous pourrions envisager d'étudier l'effet de la mutation sur l'inhibition du stress oxydant des cellules phagocytaires par la bactérie ¹⁴², sur

l'inhibition de l'assemblage de la NADPH oxydase ¹⁴³ et sur la séquestration de *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* dans les phagosomes ²³⁶.

En fonction des résultats, nous pourrions déterminer si l'expression du gène *acpA* est induite à pH acide, ce qui permettrait de savoir si cette enzyme est produite après l'acidification de la lumière du phagosome.

L'étude des mécanismes de sécrétion de l'enzyme chez *Francisella novicida* et chez *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* permettrait de déterminer si ces derniers sont différents.

Enfin, le développement d'un modèle d'infection chez l'animal infecté par voie intrapéritonéale permettrait de démontrer si le résultat de notre expérience a été influencé par la nature des cellules phagocytaires recrutées lors d'une infection par voie respiratoire.

Par ailleurs, l'identification d'une mutation par insertion dans le gène *acpA* des souches de la sous-espèce *holarctica* pourrait servir de base pour le développement d'un outil de diagnostic par PCR en temps réel pour l'identification différentielle des sous-espèces *holarctica* et *tularensis*.

Les résultats présentés dans la deuxième partie dans ce mémoire portent sur le développement d'outils moléculaires pour la réalisation d'expériences de complémentation des bactéries du genre *Francisella*. Ce travail a débuté alors que peu de vecteurs navettes répliquatifs chez *Francisella* et chez *E. coli* avaient été construits. Seuls les vecteurs pKK202, pKK214 et les plasmides pFNLTPn, basés sur l'unique plasmide naturel de *Francisella*, le pFNL10 isolé en 1994, avaient été décrits ^{254, 255, 257}. Entre 2005 et aujourd'hui, de nouveaux vecteurs navettes ont été construits ^{77, 258, 259, 280}, mais la majorité d'entre eux sont basés sur le pFNL10, à l'exception des plasmides récents pCU18, pCUG1 et pCUG2, dont la répllication est rendue possible grâce à l'origine de répllication du plasmide à large spectre d'hôte de *Staphylococcus aureus*, pC194 ²⁶⁰.

Dans notre travail, nous avons isolé et séquencé deux nouveaux plasmides naturels, le pF242 (EU850812) et le pF243 (EU850813) à partir des deux souches de *Francisella philomiragia* ATCC 25016 et ATCC 25017.

A partir des séquences nucléotidiques du pF242 et du pF243, nous avons réalisé une analyse bioinformatique, qui nous a permis de prédire les protéines codées par ces deux

plasmides. Le pF242 présente trois régions, dont une qui code pour une réplicase et deux qui codent pour des protéines de fonctions inconnues. Le pF243 présente six régions, parmi lesquelles deux codent pour des protéines de fonctions inconnues et quatre sont très proches des régions codantes décrites dans le pFNL10. Parmi ces quatre régions, une d'entre-elles code pour une réplicase.

L'analyse de la séquence en acides aminés des réplicasés du pF242 et du pF243 et l'identification de régions nucléotidiques spécifiques, nous ont permis de prédire le mode de répllication de ces deux plasmides. Le pF242, proche du plasmide à large spectre d'hôtes pC194 de *Staphylococcus aureus*, se répliquerait selon le mécanisme en cercle déroulant. Cette hypothèse est cohérente avec une précédente étude qui a montré que le pC194, se réliquant par ce même mécanisme, pouvait être maintenu chez *Francisella*²⁷⁶. Le pF243, comme le pFNL10 de *Francisella novicida*-like strain F6168²⁷², se répliquerait selon le mécanisme thêta.

L'introduction et le maintien du pF242-Km et du pF243-Cm, dans la même bactérie, *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* 061/00, ont conforté les hypothèses concernant le mécanisme de répllication du pF242 et du pF243 et ont prouvé que ces deux plasmides n'appartiennent pas au même groupe d'incompatibilité. D'autre part, ce résultat est cohérent avec celui de Rasko et collaborateurs²⁶⁰ qui ont démontré que des vecteurs navettes répllicatifs chez *E. coli* et chez *Francisella*, construits à l'aide de l'origine de répllication du plasmide pC194, pouvaient être maintenus dans une même bactérie avec des vecteurs dérivés du pFNL10.

Cette caractéristique est un avantage car elle offre la possibilité de faire coexister les vecteurs issus du pF242 et du pF243 dans la même bactérie. Ce type d'expérience permettrait, par exemple, de co-exprimer deux protéines ou deux marqueurs dans la même cellule et d'étudier l'interaction entre des protéines impliquées dans le métabolisme ou dans la virulence de la bactérie.

Après avoir été caractérisés, ces deux plasmides nous ont servi de base pour la construction de deux générations de vecteurs navettes répllicatifs chez *Francisella* et chez *E. coli*. Au total 18 vecteurs navettes ont été construits à partir du pF242 et du pF243.

La première génération de vecteurs nous a permis d'optimiser et de comparer les deux méthodes décrites pour la transformation des bactéries du genre *Francisella*, l'électroporation²⁵⁷ et la cryotransformation²⁸⁷. Nous avons montré que l'électroporation était la méthode la plus efficace pour introduire de l'ADN dans les souches de *Francisella*

tularensis que nous avons étudiées. Les travaux de Maier et collaborateurs²⁵⁷ avaient conduit à la même conclusion lors de la mise au point de cette méthode et du développement des vecteurs pFNLTPn. La première génération de vecteurs nous a également permis de sélectionner les constructions présentant les meilleures efficacités de transformation pour les deux souches pathogènes *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* 278/06. Ainsi, les vecteurs pF243-Cm et le pF242-Km, qui ont été introduits dans *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 avec une bonne efficacité, tout comme le vecteur pF242-Km dans *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* 278/06, pourront être utilisés pour l'étude ou la complémentation de ces souches.

La deuxième génération de vecteurs construite dans cette étude est plus élaborée. Les vecteurs portent un site de clonage multiple afin de faciliter l'insertion de fragments d'ADN d'intérêt, et le gène *gfp*, codant pour une protéine fluorescente, placé sous le contrôle d'un promoteur de *Francisella tularensis*. L'expression de la GFP a été vérifiée chez *F. tularensis* subsp. *holarctica* 061/00 et chez *F. tularensis* subsp. *tularensis* 278/06.

Ainsi, les vecteurs de deuxième génération pourront être utilisés pour la complémentation de bactéries du genre *Francisella*, pour l'étude du devenir de souches pathogènes dans les cellules phagocytaires et pour l'étude de la physiopathologie de la tularémie. En effet, l'expression de gènes rapporteurs codant pour la GFP ou pour la luciférase permettra de suivre la bactérie au cours de l'infection *in vitro* en cultures cellulaires ou *in vivo* chez la souris. La GFP a déjà été utilisée comme gène rapporteur chez *Francisella* pour le suivi de la bactérie au cours d'une infection intracellulaire⁷⁷ ou pour l'identification de promoteurs actifs à certains stades de l'infection²⁶⁰, mais cela n'a jamais été réalisé avec la sous-espèce *tularensis*.

La caractérisation de deux nouveaux plasmides naturels de *Francisella* ouvre également des perspectives de recherche fondamentale. Jusqu'à présent un seul plasmide, le pFNL10 isolé il y a 14 ans, avait été décrit chez *Francisella*. L'identification et la caractérisation du pF242 et du pF243, n'est pas seulement une source d'innovation pour la construction de nouveaux vecteurs navettes, mais il s'agit également d'une source potentielle d'informations pour la compréhension du genre *Francisella*. Une caractérisation expérimentale du pF242 et du pF243, confirmera nos hypothèses sur leurs mécanismes de répllication, et fournira des informations sur les régions codantes, pour lesquelles aucune homologie de séquence, avec des protéines déjà caractérisées, n'a pu être identifiée. Il serait également intéressant d'étudier

le fonctionnement du système d'addiction *phd-doc*, commun au pFNL10 et au pF243²⁷² et de déterminer si les souches porteuses de ces plasmides sont capables de les transférer à d'autres bactéries. Ainsi, de nouvelles données fondamentales permettraient de comprendre les fonctions de ces plasmides, soit en tant qu'éléments mobiles nécessaires à l'adaptation environnementale de *Francisella* ou en tant que support de la virulence.

CONCLUSION

CONCLUSION

Le travail présenté dans ce mémoire avait pour objectif d'évaluer le rôle de la phosphatase acide AcpA dans la virulence de *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* et de proposer une réflexion au sujet de l'extrapolation des conclusions sur les mécanismes de virulence de *Francisella novicida*, opportuniste chez l'Homme, à ceux de *Francisella tularensis*, pathogène chez l'Homme.

Nos résultats ont démontré d'une part, que l'AcpA n'était pas impliquée dans la virulence de *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* par voie intranasale, et d'autre part, que l'extrapolation des résultats d'une espèce à l'autre, en ce qui concerne l'expression et le rôle de l'AcpA dans la virulence des bactéries, n'était pas justifiée.

Malgré les relations phylogénétiques proches entre les espèces *novicida* et *tularensis*, très certainement liées au fait qu'il s'agisse de bactéries intracellulaires, ces dernières ont des caractéristiques phénotypiques différentes en terme d'exigences nutritionnelles et de virulence. D'autre part, certains gènes exprimés chez *Francisella novicida* ne le sont pas chez *Francisella tularensis*, et inversement. Devant ces considérations, développées dans ce travail, il nous semble peu pertinent d'extrapoler les résultats obtenus avec une espèce à une autre espèce du genre *Francisella*. Aussi, même si les études réalisées avec *Francisella novicida* fournissent des informations importantes, l'amélioration des propositions diagnostiques et thérapeutiques au sujet de la tularémie doit passer par des modèles d'études de *Francisella tularensis*, et ce malgré les difficultés techniques liées à la manipulation de cette bactérie.

D'autre part, au cours de ce travail nous avons développé nos propres outils moléculaires. En effet, une méthode de mutagenèse par échange d'allèle nous a permis d'obtenir un mutant de *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* déficient en phosphatase acide. De plus, deux générations de vecteurs navettes répliatifs chez *Francisella* et chez

E. coli, basées sur deux nouveaux plasmides naturels caractérisés dans cette étude, ont été construites.

Grâce à ces outils, le laboratoire de bactériologie du DBAT du CRSSA pourra envisager d'étudier de nombreux gènes potentiellement impliqués dans la virulence ou dans le métabolisme de la bactérie. Les méthodologies développées pourront par exemple être utilisées pour la mutation des pompes à efflux et des porines lors des études sur les résistances bactériennes. Les vecteurs navettes permettront la complémentation des mutants et l'étude de la physiopathologie de la tularémie *in vivo* grâce notamment aux gènes rapporteurs.

REFERENCES

1. Dennis, D. T., *et al.* 2001. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *Jama*. **285**: 2763-73.
2. Stephenson, J. 1996. Confronting a biological Armageddon : experts tackle prospect of bioterrorism *JAMA*. **276**: 349-51.
3. Buisson Y., C. J. D., Kowalski J. J., Renaudeau C., Treguier J. Y. 2004. Les risques NRBC savoir pour agir. Xavier Montauban.
4. De Revel Thierry, G. P., Vidal Dominique, Renaudeau Claude. 2005. Menace terroriste approche medicale NRBC. John Libbey Eurotext.
5. Rotz, L. D., *et al.* 2002. Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis*. **8**: 225-30.
6. AFSSAPS. 2005. Biotox/Piratox - <http://afssaps.sante.fr/htm/10/piratox/indpira.htm>.
7. NATO. 1996. NATO Handbook on medical aspects of NBC defensive operations AMedP-6(B) Part II - Biological: 443.
8. Harris, S. 1992. Japanese biological warfare research on humans: a case study of microbiology and ethics. *Ann N Y Acad Sci*. **666**: 21-52.
9. Alibek, K. 1999. Random House. New York. Biohazard: 29-38.
10. Christopher, G. W., *et al.* 1997. Biological warfare. A historical perspective. *Jama*. **278**: 412-7.
11. McCrumb Fr, J., M. J. Snyder & T. E. Woodward. 1957. Studies on human infection with *Pasteurella tularensis*; comparison of streptomycin and chloramphenicol in the prophylaxis of clinical disease. *Trans Assoc Am Physicians*. **70**: 74-9; discussion 79-80.
12. Sawyer, W. D., *et al.* 1966. Antibiotic prophylaxis and therapy of airborne tularemia. *Bacteriol Rev*. **30**: 542-50.
13. Kaufmann, A. F., M. I. Meltzer & G. P. Schmid. 1997. The economic impact of a bioterrorist attack: are prevention and postattack intervention programs justifiable? *Emerg Infect Dis*. **3**: 83-94.
14. McCoy, G. W. & C. W. Chapin. 1912. Further observations on a plague like disease of rodents with a preliminary note on the causative agent *Bacterium tularense*. *The Journal of infectious diseases*. **10**: 61-72.
15. Vaissaire, J., *et al.* 2005. Tularemia. The disease and its epidemiology in France. *Med Mal Infect*. **35**: 273-80.
16. Wilson, G. S. & A. A. Miles. 1964. *Brucella tularensis*. In Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity. The Williams & Wilkons Co. Baltimore. Vol. 1: 1013-1014.

17. Ritter, D. B. & R. K. Gerloff. 1966. Deoxyribonucleic acid hybridization among some species of the genus *Pasteurella*. *J Bacteriol.* **92**: 1838-9.
18. Forsman, M., G. Sandstrom & A. Sjostedt. 1994. Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *Int J Syst Bacteriol.* **44**: 38-46.
19. Dorofe'ev, K. A. 1947. Classification of the causative agent of tularemia. Symp. Res. Works Inst. Epidemiol. Mikrobiol. Chita. **1**: 170-180.
20. Fryer, J. L., *et al.* 1992. *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov., the causative agent of an epizootic disease in salmonid fishes. *Int J Syst Bacteriol.* **42**: 120-6.
21. Sjöstedt, A. B. 2005. Genu I. *Francisella* Dorofe'ev 1947, 176 AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. Vol. 2. Springer, Ed.: 200-210. New-York.
22. Olsufjev, N. G., O. S. Emelyanova & T. N. Dunayeva. 1959. Comparative study of strains of *B. tularensis* in the old and new world and their taxonomy. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* **3**: 138-49.
23. Olsufjev, N. G. 1970. Taxonomy and characteristic of the genus *Francisella* Dorofeev, 1947. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* **14**: 67-74.
24. Olsufjev, N. G. & I. S. Meshcheryakova. 1982. Intraspecific taxonomy of tularemia agent *Francisella tularensis* McCoy et Chapin. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* **26**: 291-9.
25. Larson, C. L., W. Wicht & W. L. Jellison. 1955. A new organism resembling *P. tularensis* isolated from water. *Public Health Rep.* **70**: 253-8.
26. Hollis, D. G., *et al.* 1989. *Francisella philomiragia* comb. nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup *novicida* (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. *J Clin Microbiol.* **27**: 1601-8.
27. TOBA (Taxonomic Outline of the Bacteria an Archea) - Part 5 - <http://www.taxonomicoutline.org/>.
28. Euzeby, J. P. LPSN (List of Procaryotic names with Standing in Nomenclature) - <http://www.bacterio.cict.fr>.
29. Jensen, W. I., C. R. Owen & W. L. Jellison. 1969. *Yersinia philomiragia* sp. n., a new member of the *Pasteurella* group of bacteria, naturally pathogenic for the muskrat (*Ondatra zibethica*). *J Bacteriol.* **100**: 1237-41.
30. Ursing, J., A. Steigerwalt & D. Brenner. 1980. Lack of genetic relatedness between *Yersinia philomiragia* (the "philomiragia" bacterium) and *Yersinia* species. *Current Microbiology.* **4**: 231-233.

31. Bercovier, H. & H. H. Mollaret. 1984. *Yersinia*. In Bergey's manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. Krieg, N. a. H., JG. , Ed.: 503-506. The Williams &Wilkins Co. Baltimore.
32. Ottem, K. F., *et al.* 2007. Characterization of *Francisella* sp., GM2212, the first *Francisella* isolate from marine fish, Atlantic cod (*Gadus morhua*). Arch Microbiol. **187**: 343-50.
33. Ottem, K. F., *et al.* 2007. New species in the genus *Francisella* (Gammaproteobacteria; *Francisellaceae*); *Francisella piscicida* sp. nov. isolated from cod (*Gadus morhua*). Arch Microbiol. **188**: 547-50.
34. Sandstrom, G., *et al.* 1992. Characterization and classification of strains of *Francisella tularensis* isolated in the central Asian focus of the Soviet Union and in Japan. J Clin Microbiol. **30**: 172-5.
35. Euzeby, J. B. 2008. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire - <http://www.bacdico.net>.
36. The World Organization for Animal Health. 2004. In Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Tularemia. - Part 2 - Section 2.8 - Chapter 2.8.2 - http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00116.htm.
37. Payne, M. P. & R. J. Morton. 1992. Effect of culture media and incubation temperature on growth of selected strains of *Francisella tularensis*. J Vet Diagn Invest. **4**: 264-9.
38. Baker, C. N., D. G. Hollis & C. Thornsberry. 1985. Antimicrobial susceptibility testing of *Francisella tularensis* with a modified Mueller-Hinton broth. J Clin Microbiol. **22**: 212-5.
39. Bernard, K., *et al.* 1994. Early recognition of atypical *Francisella tularensis* strains lacking a cysteine requirement. J Clin Microbiol. **32**: 551-3.
40. Tresselt, H. B. & M. K. Ward. 1964. Blood-Free Medium for the Rapid Growth of *Pasteurella Tularensis*. Appl Microbiol. **12**: 504-7.
41. Chamberlain, R. E. 1965. Evaluation of Live Tularemia Vaccine Prepared in a Chemically Defined Medium. Appl Microbiol. **13**: 232-5.
42. Vaissaire J., L. D. C., Dufrêne M., Chevalerias H. 1997. Antibiotypie des souches de *Francisella tularensis*. Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France. **70**: 287-294.
43. Marchette, N. J. & P. S. Nicholes. 1961. Virulence and citrulline ureidase activity of *Pasteurella tularensis*. J Bacteriol. **82**: 26-32.
44. Jantzen, E., B. P. Berdal & T. Omland. 1979. Cellular fatty acid composition of *Francisella tularensis*. J Clin Microbiol. **10**: 928-30.
45. Larsson, P., *et al.* 2005. The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. Nat Genet. **37**: 153-9.

46. Rohmer, L., *et al.* 2007. Comparison of *Francisella tularensis* genomes reveals evolutionary events associated with the emergence of human pathogenic strains. *Genome Biol.* **8**: R102.
47. Chaudhuri, R. R., *et al.* 2007. Genome sequencing shows that European isolates of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* are almost identical to US laboratory strain Schu S4. *PLoS ONE.* **2**: e352.
48. Petrosino, J. F., *et al.* 2006. Chromosome rearrangement and diversification of *Francisella tularensis* revealed by the type B (OSU18) genome sequence. *J Bacteriol.* **188**: 6977-85.
49. Beckstrom-Sternberg, S. M., *et al.* 2007. Complete genomic characterization of a pathogenic A.II strain of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *PLoS ONE.* **2**: e947.
50. Farlow, J., *et al.* 2001. *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. *J Clin Microbiol.* **39**: 3186-92.
51. Johansson, A., *et al.* 2004. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J Bacteriol.* **186**: 5808-18.
52. Broekhuijsen, M., *et al.* 2003. Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *J Clin Microbiol.* **41**: 2924-31.
53. Parkhill, J., *et al.* 2001. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature.* **413**: 523-7.
54. Parkhill, J., *et al.* 2003. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet.* **35**: 32-40.
55. Moore, R. A., *et al.* 2004. Contribution of gene loss to the pathogenic evolution of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Infect Immun.* **72**: 4172-87.
56. Cole, S. T., *et al.* 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* **409**: 1007-11.
57. Jellison, W. L. & G. M. Kohls. 1955. Tularemia in sheep and in sheep industry workers in western United States. *Public Health Monogr.* **28**: 1-19.
58. Petersen, J. M. & M. E. Schriefer. 2005. Tularemia: emergence/re-emergence. *Vet Res.* **36**: 455-67.
59. Ashford, R. W. 2003. When is a reservoir not a reservoir? *Emerg Infect Dis.* **9**: 1495-6.

60. Mailles Alexandra, V. V. 2005. Surveillance de la tularémie chez l'Homme en France en 2003 et 2004. Recommandations pour l'investigation des cas sporadiques et groupés. InVS: 1-16 - http://www.invs.sante.fr/publications/2005/tularemie_france_2003_2004/index.html.
61. Sjostedt, A. 2007. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann N Y Acad Sci.* **1105**: 1-29.
62. Whipp, M. J., *et al.* 2003. Characterization of a *novicida*-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. *J Med Microbiol.* **52**: 839-42.
63. Clarridge, J. E., 3rd, *et al.* 1996. Characterization of two unusual clinically significant *Francisella* strains. *J Clin Microbiol.* **34**: 1995-2000.
64. Friis-Moller, A., *et al.* 2004. Problems in identification of *Francisella philomiragia* associated with fatal bacteremia in a patient with chronic granulomatous disease. *J Clin Microbiol.* **42**: 1840-2.
65. Mailman, T. L. & M. H. Schmidt. 2005. *Francisella philomiragia* adenitis and pulmonary nodules in a child with chronic granulomatous disease. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* **16**: 245-8.
66. Sicherer, S. H., *et al.* 1997. *Francisella philomiragia* sepsis in chronic granulomatous disease. *Pediatr Infect Dis J.* **16**: 420-2.
67. Wenger, J. D., *et al.* 1989. Infection caused by *Francisella philomiragia* (formerly *Yersinia philomiragia*). A newly recognized human pathogen. *Ann Intern Med.* **110**: 888-92.
68. Jellison, W. L. 1950. Tularemia; geographical distribution of deerfly fever and the biting fly, *Chrysops discalis* Williston. *Public Health Rep.* **65**: 1321-9.
69. Anda, P., *et al.* 2001. Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing. *Emerg Infect Dis.* **7**: 575-82.
70. Perez-Castrillon, J. L., *et al.* 2001. Tularemia epidemic in northwestern Spain: clinical description and therapeutic response. *Clin Infect Dis.* **33**: 573-6.
71. Tarnvik, A., H. S. Priebe & R. Grunow. 2004. Tularaemia in Europe: an epidemiological overview. *Scand J Infect Dis.* **36**: 350-5.
72. Eliasson, H. & E. Back. 2007. Tularaemia in an emergent area in Sweden: an analysis of 234 cases in five years. *Scand J Infect Dis.* **39**: 880-9.
73. Payne, L., *et al.* 2005. Endemic tularemia, Sweden, 2003. *Emerg Infect Dis.* **11**: 1440-2.
74. Pang, Z. C. 1987. The investigation of the first outbreak of tularemia in Shandong Peninsula. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* **8**: 261-3.
75. Ohara, Y., T. Sato & M. Homma. 1998. Arthropod-borne tularemia in Japan: clinical analysis of 1,374 cases observed between 1924 and 1996. *J Med Entomol.* **35**: 471-3.

76. Parker, R. R., *et al.* 1951. Contamination of natural waters and mud with *Pasteurella tularensis* and tularemia in beavers and muskrats in the northwestern United States. Bull Natl Inst Health. **193**: 1-161.
77. Abd, H., *et al.* 2003. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. Appl Environ Microbiol. **69**: 600-6.
78. Berdal, B. P., *et al.* 1996. Field investigations of tularemia in Norway. FEMS Immunol Med Microbiol. **13**: 191-5.
79. Reintjes, R., *et al.* 2002. Tularemia outbreak investigation in Kosovo: case control and environmental studies. Emerg Infect Dis. **8**: 69-73.
80. Maladies à déclaration obligatoire. 2004-2008. Tularémie. Données épidémiologiques de l'Institut de Veille Sanitaire - <http://www.invs.sante.fr/surveillance/tularemie/donnees.htm>.
81. Vaissaire J., Le Coustumier A., Arlet G, Fenollar F. 2007. Des agents très spéciaux en bactériologie. Bioforma, Formation continue des biologistes. PARIS - <http://www.bioforma.net/cahiers/somcahier40.pdf>.
82. Tarnvik, A. & M. C. Chu. 2007. New approaches to diagnosis and therapy of tularemia. Ann NY Acad Sci annals. **105**: 378-404
83. Waag, D. M., *et al.* 1995. Cell-mediated and humoral immune responses after vaccination of human volunteers with the live vaccine strain of *Francisella tularensis*. Clin Diagn Lab Immunol. **2**: 143-8.
84. Waag, D. M., *et al.* 1996. Immunogenicity of a new lot of *Francisella tularensis* live vaccine strain in human volunteers. FEMS Immunol Med Microbiol. **13**: 205-9.
85. Carlsson, H. E., *et al.* 1979. Enzyme-linked immunosorbent assay for immunological diagnosis of human tularemia. J Clin Microbiol. **10**: 615-21.
86. Petersen, J. M., *et al.* 2004. Methods for enhanced culture recovery of *Francisella tularensis*. Appl Environ Microbiol. **70**: 3733-5.
87. Fulop, M., D. Leslie & R. Titball. 1996. A rapid, highly sensitive method for the detection of *Francisella tularensis* in clinical samples using the polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg. **54**: 364-6.
88. Higgins, J. A., *et al.* 2000. Detection of *Francisella tularensis* in infected mammals and vectors using a probe-based polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg. **62**: 310-8.
89. Johansson, A., *et al.* 2000. Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia. J Clin Microbiol. **38**: 22-6.
90. Sjostedt, A., *et al.* 1997. Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. J Clin Microbiol. **35**: 1045-8.

91. Sjostedt, A., *et al.* 1992. The 17 kDa lipoprotein and encoding gene of *Francisella tularensis* LVS are conserved in strains of *Francisella tularensis*. *Microbial Pathogenesis*. **13**: 243-249.
92. Golovliov, I., *et al.* 1997. Identification of proteins of *Francisella tularensis* induced during growth in macrophages and cloning of the gene encoding a prominently induced 23-kilodalton protein. *Infect Immun*. **65**: 2183-9.
93. Thomas, R., *et al.* 2003. Discrimination of Human Pathogenic Subspecies of *Francisella tularensis* by Using Restriction Fragment Length Polymorphism. *J. Clin. Microbiol*. **41**: 50-57.
94. Bystrom, M., *et al.* 2005. Tularemia in Denmark: Identification of a *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* Strain by Real-Time PCR and High-Resolution Typing by Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis. *J. Clin. Microbiol*. **43**: 5355-5358.
95. Petersen, J. M., *et al.* 2004. Laboratory analysis of tularemia in wild-trapped, commercially traded prairie dogs, Texas, 2002. *Emerg Infect Dis*. **10**: 419-25.
96. Nano, F. E., *et al.* 2004. A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. *J Bacteriol*. **186**: 6430-6.
97. Celebi, G., *et al.* 2006. Tularemia, a reemerging disease in northwest Turkey: epidemiological investigation and evaluation of treatment responses. *Jpn J Infect Dis*. **59**: 229-34.
98. Eliasson, H., A. Sjostedt & E. Back. 2005. Clinical use of a diagnostic PCR for *Francisella tularensis* in patients with suspected ulceroglandular tularaemia. *Scand J Infect Dis*. **37**: 833-7.
99. Gurcan, S., *et al.* 2006. Tularemia re-emerging in European part of Turkey after 60 years. *Jpn J Infect Dis*. **59**: 391-3.
100. Kantardjiev, T., P. Padeshki & I. N. Ivanov. 2007. Diagnostic approaches for oculoglandular tularemia: advantages of PCR. *Br J Ophthalmol*. **91**: 1206-8.
101. Skottman, T., *et al.* 2007. Simultaneous real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **26**: 207-11.
102. Tomioka, K., *et al.* 2005. A multiplex polymerase chain reaction microarray assay to detect bioterror pathogens in blood. *J Mol Diagn*. **7**: 486-94.
103. Fulop, M., *et al.* 2001. Role of antibody to lipopolysaccharide in protection against low- and high-virulence strains of *Francisella tularensis*. *Vaccine*. **19**: 4465-72.
104. Tärnvik, A. 2007. WHO guidelines on Tularaemia. Epidemic and pandemic alert response.

105. Ikaheimo, I., *et al.* 2000. In vitro antibiotic susceptibility of *Francisella tularensis* isolated from humans and animals. *J Antimicrob Chemother.* **46**: 287-90.
106. Maurin, M., N. F. Mersali & D. Raoult. 2000. Bactericidal activities of antibiotics against intracellular *Francisella tularensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**: 3428-31.
107. Tigertt, W. D. 1962. Soviet viable *Pasteurella tularensis* vaccines. A review of selected articles. *Bacteriol Rev.* **26**: 354-73.
108. El'bert B.I. , I. S. T., and T.I. Puchkeva. 1947. The cutaneous method of the specific prophylaxis of tumaremia. *Rostov.* **6**: 7-20.
109. Pollitzer, R. 1967. History and incidence of tularemia in the Soviet Union. A review. Bronx, N.Y. Institute of Contemporary Russian Studies, Fordham University: 314-366.
110. Eigelsbach, H. T. & C. M. Downs. 1961. Prophylactic effectiveness of live and killed tularemia vaccines. I. Production of vaccine and evaluation in the white mouse and guinea pig. *J Immunol.* **87**: 415-25.
111. Burke, D. S. 1977. Immunization against tularemia: analysis of the effectiveness of live *Francisella tularensis* vaccine in prevention of laboratory-acquired tularemia. *J Infect Dis.* **135**: 55-60.
112. Conlan, J. W., *et al.* 2002. Mice vaccinated with the O-antigen of *Francisella tularensis* LVS lipopolysaccharide conjugated to bovine serum albumin develop varying degrees of protective immunity against systemic or aerosol challenge with virulent type A and type B strains of the pathogen. *Vaccine.* **20**: 3465-71.
113. Fortier, A. H., *et al.* 1992. Activation of macrophages for destruction of *Francisella tularensis*: identification of cytokines, effector cells, and effector molecules. *Infect Immun.* **60**: 817-25.
114. Hall, J. D., *et al.* 2007. *Francisella tularensis* replicates within alveolar type II epithelial cells *in vitro* and *in vivo* following inhalation. *Infect Immun.* **75**: 1034-9.
115. Paretzky, D. 1990. The biology of *Coxiella burnetii* and the pathobiochemistry of Q fever and its endotoxicosis. *Ann N Y Acad Sci.* **590**: 416-21.
116. Dowling, J. N., A. K. Saha & R. H. Glew. 1992. Virulence factors of the family *Legionellaceae*. *Microbiol Rev.* **56**: 32-60.
117. Drevets, D. A. & M. S. Bronze. 2008. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **53**: 151-65.
118. Lee, W. L., R. E. Harrison & S. Grinstein. 2003. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect.* **5**: 1299-306.
119. Akira, S. & K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* **4**: 499-511.

120. Oxidative stress oxydants and antioxidants. 1991. Helmut Sies. London. Academic press: 1-650.
121. Aderem, A. & D. M. Underhill. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* **17**: 593-623.
122. Haas, A. 1998. Reprogramming the phagocytic pathway-intracellular pathogens and their vacuoles (review). *Mol Membr Biol.* **15**: 103-21.
123. Desjardins, M., *et al.* 1994. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol.* **124**: 677-88.
124. Anthony, L. D., R. D. Burke & F. E. Nano. 1991. Growth of *Francisella* spp. in rodent macrophages. *Infect Immun.* **59**: 3291-6.
125. Clemens, D. L., B. Y. Lee & M. A. Horwitz. 2004. Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. *Infect Immun.* **72**: 3204-17.
126. Babior, B. M. 2000. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.* **109**: 33-44.
127. DeLeo, F. R. & M. T. Quinn. 1996. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukoc Biol.* **60**: 677-91.
128. Nauseef, W. M., *et al.* 1991. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components. *J Biol Chem.* **266**: 5911-7.
129. Allen, L. A., *et al.* 2005. *Helicobacter pylori* disrupts NADPH oxidase targeting in human neutrophils to induce extracellular superoxide release. *J Immunol.* **174**: 3658-67.
130. Dahlgren, C. & A. Karlsson. 1999. Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods.* **232**: 3-14.
131. DeLeo, F. R., *et al.* 1999. NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. *J Immunol.* **163**: 6732-40.
132. Prossnitz, E. R. 1997. Desensitization of N-formylpeptide receptor-mediated activation is dependent upon receptor phosphorylation. *J Biol Chem.* **272**: 15213-9.
133. Schiffmann, E., B. A. Corcoran & S. M. Wahl. 1975. N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **72**: 1059-62.
134. Dewald, B., T. G. Payne & M. Baggiolini. 1984. Activation of NADPH oxidase of human neutrophils. Potentiation of chemotactic peptide by a diacylglycerol. *Biochem Biophys Res Commun.* **125**: 367-73.
135. Repine, J. E., *et al.* 1974. The influence of phorbol myristate acetate on oxygen consumption by polymorphonuclear leukocytes. *J Lab Clin Med.* **83**: 911-20.

136. Clemens, D. L. & M. A. Horwitz. 2007. Uptake and intracellular fate of *Francisella tularensis* in human macrophages. *Ann N Y Acad Sci.* **1105**: 160-86.
137. McLendon, M. K., M. A. Apicella & L. A. Allen. 2006. *Francisella tularensis*: taxonomy, genetics, and Immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare. *Annu Rev Microbiol.* **60**: 167-85.
138. Clemens, D. L., B. Y. Lee & M. A. Horwitz. 2005. *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infect Immun.* **73**: 5892-902.
139. Hilbi, H. 2006. Modulation of phosphoinositide metabolism by pathogenic bacteria. *Cell Microbiol.* **8**: 1697-706.
140. Tilney, L. G. & D. A. Portnoy. 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol.* **109**: 1597-608.
141. Horwitz, M. A. 1984. Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell.* **36**: 27-33.
142. Reilly, T. J., *et al.* 1996. Characterization and sequencing of a respiratory burst-inhibiting acid phosphatase from *Francisella tularensis*. *J Biol Chem.* **271**: 10973-83.
143. McCaffrey, R. L. & L. A. Allen. 2006. *Francisella tularensis* LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape. *J Leukoc Biol.* **80**: 1224-30.
144. Golovliov, I., *et al.* 2003. An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells. *Infect Immun.* **71**: 5940-50.
145. Chong, A., *et al.* 2008. The early phagosomal stage of *Francisella tularensis* determines optimal phagosomal escape and *Francisella* Pathogenicity Island protein expression. *Infect Immun.* **76**: 5488-5499.
146. Parsa, K. V., *et al.* 2006. Macrophage pro-inflammatory response to *Francisella novicida* infection is regulated by SHIP. *PLoS Pathog.* **2**: e71.
147. Telepnev, M., I. Golovliov & A. Sjostedt. 2005. *Francisella tularensis* LVS initially activates but subsequently down-regulates intracellular signaling and cytokine secretion in mouse monocytic and human peripheral blood mononuclear cells. *Microb Pathog.* **38**: 239-47.
148. Lai, X. H. & A. Sjostedt. 2003. Delineation of the molecular mechanisms of *Francisella tularensis*-induced apoptosis in murine macrophages. *Infect Immun.* **71**: 4642-6.
149. Mariathasan, S., *et al.* 2005. Innate immunity against *Francisella tularensis* is dependent on the ASC/caspase-1 axis. *J Exp Med.* **202**: 1043-9.

150. Hybiske, K. & R. S. Stephens. 2008. Exit strategies of intracellular pathogens. *Nat Rev Microbiol.* **6**: 99-110.
151. Gavrilin, M. A., *et al.* 2006. Internalization and phagosome escape required for *Francisella* to induce human monocyte IL-1beta processing and release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**: 141-6.
152. Henry, T., *et al.* 2007. Type I interferon signaling is required for activation of the inflammasome during *Francisella* infection. *J Exp Med.* **204**: 987-94.
153. Weiss, D. S., *et al.* 2007. *In vivo* negative selection screen identifies genes required for *Francisella* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**: 6037-42.
154. Appelberg, R. 2007. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends Microbiol.* **15**: 87-92.
155. Kobayashi, S. D., *et al.* 2003. Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 10948-53.
156. Mandic-Mulec, I., J. Weiss & A. Zychlinsky. 1997. *Shigella flexneri* is trapped in polymorphonuclear leukocyte vacuoles and efficiently killed. *Infect Immun.* **65**: 110-5.
157. Weinrauch, Y., *et al.* 2002. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature.* **417**: 91-4.
158. Brown, A. E., T. J. Holzer & B. R. Andersen. 1987. Capacity of human neutrophils to kill *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* **156**: 985-9.
159. Sjostedt, A., J. W. Conlan & R. J. North. 1994. Neutrophils are critical for host defense against primary infection with the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* in mice and participate in defense against reinfection. *Infect Immun.* **62**: 2779-83.
160. Conlan, J. W., *et al.* 2002. Different host defences are required to protect mice from primary systemic vs pulmonary infection with the facultative intracellular bacterial pathogen, *Francisella tularensis* LVS. *Microb Pathog.* **32**: 127-34.
161. Lindgren, H., *et al.* 2004. Distinct roles of reactive nitrogen and oxygen species to control infection with the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis*. *Infect Immun.* **72**: 7172-82.
162. Hall, J. D., *et al.* 2008. Infected host cell repertoire and cellular response in the lung following inhalation of *Francisella tularensis* Schu S4, LVS, or U112. *Infect Immun.* **76**: 5843-5852.
163. Sandstrom, G., *et al.* 1992. Immunogenicity and toxicity of lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* LVS. *FEMS Microbiol Immunol.* **5**: 201-10.
164. Sandstrom, G., S. Lofgren & A. Tarnvik. 1988. A capsule-deficient mutant of *Francisella tularensis* LVS exhibits enhanced sensitivity to killing by serum but diminished sensitivity to killing by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun.* **56**: 1194-202.

165. Sorokin, V. M., N. V. Pavlovich & L. A. Prozorova. 1996. *Francisella tularensis* resistance to bactericidal action of normal human serum. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **13**: 249-52.
166. Cherwonogrodzky, J. W., M. H. Knodel & M. R. Spence. 1994. Increased encapsulation and virulence of *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) by subculturing on synthetic medium. *Vaccine.* **12**: 773-5.
167. Ancuta, P., *et al.* 1996. Inability of the *Francisella tularensis* lipopolysaccharide to mimic or to antagonize the induction of cell activation by endotoxins. *Infect Immun.* **64**: 2041-6.
168. Hajjar, A. M., *et al.* 2006. Lack of *in vitro* and *in vivo* recognition of *Francisella tularensis* subspecies lipopolysaccharide by Toll-like receptors. *Infect Immun.* **74**: 6730-8.
169. Telepnev, M., *et al.* 2003. *Francisella tularensis* inhibits Toll-like receptor-mediated activation of intracellular signalling and secretion of TNF-alpha and IL-1 from murine macrophages. *Cell Microbiol.* **5**: 41-51.
170. Phillips, N. J., *et al.* 2004. Novel modification of lipid A of *Francisella tularensis*. *Infect Immun.* **72**: 5340-8.
171. Vinogradov, E. & M. B. Perry. 2004. Characterisation of the core part of the lipopolysaccharide O-antigen of *Francisella novicida* (U112). *Carbohydr Res.* **339**: 1643-8.
172. Prior, J. L., *et al.* 2003. Characterization of the O antigen gene cluster and structural analysis of the O antigen of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. *J Med Microbiol.* **52**: 845-51.
173. Thirumalapura, N. R., *et al.* 2005. Structural analysis of the O-antigen of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* strain OSU 10. *J Med Microbiol.* **54**: 693-5.
174. Vinogradov, E., *et al.* 2004. Characterization of the lipopolysaccharide O-antigen of *Francisella novicida* (U112). *Carbohydr Res.* **339**: 649-54.
175. Vinogradov, E. V., *et al.* 1991. Structure of the O-antigen of *Francisella tularensis* strain 15. *Carbohydr Res.* **214**:289-97.
176. Hartley, G., *et al.* 2006. Grey variants of the live vaccine strain of *Francisella tularensis* lack lipopolysaccharide O-antigen, show reduced ability to survive in macrophages and do not induce protective immunity in mice. *Vaccine.* **24**: 989-96.
177. Li, J., *et al.* 2007. Attenuation and protective efficacy of an O-antigen-deficient mutant of *Francisella tularensis* LVS. *Microbiology.* **153**: 3141-53.
178. Thomas, R. M., *et al.* 2007. The immunologically distinct O antigens from *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* and *Francisella novicida* are both virulence determinants and protective antigens. *Infect Immun.* **75**: 371-8.

179. Raynaud, C., *et al.* 2007. Role of the *wbt* locus of *Francisella tularensis* in lipopolysaccharide O-antigen biogenesis and pathogenicity. *Infect Immun.* **75**: 536-41.
180. Cowley, S. C., S. V. Myltseva & F. E. Nano. 1996. Phase variation in *Francisella tularensis* affecting intracellular growth, lipopolysaccharide antigenicity and nitric oxide production. *Mol Microbiol.* **20**: 867-74.
181. Kieffer, T. L., *et al.* 2003. *Francisella novicida* LPS has greater immunobiological activity in mice than *F. tularensis* LPS, and contributes to *F. novicida* murine pathogenesis. *Microbes Infect.* **5**: 397-403.
182. Cowley, S. C., C. J. Gray & F. E. Nano. 2000. Isolation and characterization of *Francisella novicida* mutants defective in lipopolysaccharide biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett.* **182**: 63-7.
183. Nano, F. E. & C. Schmerk. 2007. The *Francisella* pathogenicity island. *Ann N Y Acad Sci.* **1105**:122-37.
184. Baron, G. S. & F. E. Nano. 1998. MglA and MglB are required for the intramacrophage growth of *Francisella novicida*. *Mol Microbiol.* **29**: 247-59.
185. Brotcke, A., *et al.* 2006. Identification of MglA-Regulated Genes Reveals Novel Virulence Factors in *Francisella tularensis*. *Infection and Immunity.* **74**: 6642-6655.
186. Deng, K., *et al.* 2006. Identification of *Francisella tularensis* genes affected by iron limitation. *Infect Immun.* **74**: 4224-36.
187. Lenco, J., *et al.* 2007. Proteomics analysis of the *Francisella tularensis* LVS response to iron restriction: induction of the *F. tularensis* pathogenicity island proteins IglABC. *FEMS Microbiol Lett.* **269**: 11-21.
188. De Bruin, O. M., J. S. Ludu & F. E. Nano. 2007. The *Francisella* pathogenicity island protein IglA localizes to the bacterial cytoplasm and is needed for intracellular growth. *BMC Microbiol.* **7**: 1.
189. Gray, C. G., *et al.* 2002. The identification of five genetic loci of *Francisella novicida* associated with intracellular growth. *FEMS Microbiol Lett.* **215**: 53-6.
190. Lauriano, C. M., *et al.* 2003. Allelic exchange in *Francisella tularensis* using PCR products. *FEMS Microbiology Letters.* **229**: 195-202.
191. Lauriano, C. M., *et al.* 2004. MglA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**: 4246-9.
192. Liu, J., *et al.* 2007. Construction of targeted insertion mutations in *Francisella tularensis* subsp. *novicida*. *Biotechniques.* **43**: 487-90, 492.

193. Ludu, J. S., *et al.* 2008. The *Francisella* Pathogenicity Island Protein PdpD is required for full virulence and associates with homologues of the type VI secretion system. *J. Bacteriol.* **190**: 4584-4595.
194. Santic, M., *et al.* 2005. The *Francisella tularensis* pathogenicity island protein IglC and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm. *Cell Microbiol.* **7**: 969-79.
195. Lindgren, H., *et al.* 2004. Factors affecting the escape of *Francisella tularensis* from the phagolysosome. *J Med Microbiol.* **53**: 953-8.
196. Bonquist, L., *et al.* 2008. MglA and Igl proteins contribute to the modulation of *Francisella tularensis* live vaccine strain-containing phagosomes in murine macrophages. *Infect Immun.* **76**: 3502-10.
197. Twine, S., *et al.* 2005. A mutant of *Francisella tularensis* strain SCHU S4 lacking the ability to express a 58-kilodalton protein is attenuated for virulence and is an effective live vaccine. **73**: 8345-8352.
198. Tempel, R., *et al.* 2006. Attenuated *Francisella novicida* transposon mutants protect mice against wild-type challenge. *Infect Immun.* **74**: 5095-105.
199. Kostakioti, M., *et al.* 2005. Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. *J Bacteriol.* **187**: 4306-14.
200. Gil, H., J. L. Benach & D. G. Thanassi. 2004. Presence of pili on the surface of *Francisella tularensis*. *Infect Immun.* **72**: 3042-7.
201. Chakraborty, S., *et al.* 2008. Type IV pili in *Francisella tularensis*: roles of pilF and pilT in fiber assembly, host cell adherence, and virulence. *Infect Immun.* **76**: 2852-61.
202. Hager, A. J., *et al.* 2006. Type IV pili-mediated secretion modulates *Francisella* virulence. *Mol Microbiol.* **62**: 227-37.
203. Forslund, A. L., *et al.* 2006. Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of *Francisella tularensis*. *Mol Microbiol.* **59**: 1818-30.
204. Gil, H., *et al.* 2006. Deletion of TolC orthologs in *Francisella tularensis* identifies roles in multidrug resistance and virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**: 12897-902.
205. Barker, J. R. & K. E. Klose. 2007. Molecular and genetic basis of pathogenesis in *Francisella tularensis*. *Ann N Y Acad Sci.* **1105**: 138-59.
206. Baron, G. S. & F. E. Nano. 1999. An erythromycin resistance cassette and mini-transposon for constructing transcriptional fusions to cat. *Gene.* **229**: 59-65.
207. Kawula, T. H., *et al.* 2004. Use of transposon-transposase complexes to create stable insertion mutant strains of *Francisella tularensis* LVS. *Appl Environ Microbiol.* **70**: 6901-4.

208. Charity, J. C., *et al.* 2007. Twin RNA polymerase-associated proteins control virulence gene expression in *Francisella tularensis*. PLoS Pathog. **3**: e84.
209. Mohapatra, N. P., *et al.* 2007. Identification of an orphan response regulator required for the virulence of *Francisella* spp. and transcription of pathogenicity island genes. Infect Immun. **75**: 3305-14.
210. Brotcke, A. & D. M. Monack. 2008. Identification of fevR, a novel regulator of virulence gene expression in *Francisella*. Infect Immun. **76**: 3473-3480.
211. Anthony, L. S., *et al.* 1994. Isolation of a *Francisella tularensis* mutant that is sensitive to serum and oxidative killing and is avirulent in mice: correlation with the loss of MinD homologue expression. FEMS Microbiol Lett. **124**: 157-65.
212. Mdluli, K. E., *et al.* 1994. Serum-sensitive mutation of *Francisella novicida*: association with an ABC transporter gene. Microbiology. **140**: 3309-18.
213. McDonald, M. K., S. C. Cowley & F. E. Nano. 1997. Temperature-sensitive lesions in the *Francisella novicida* valA gene cloned into an *Escherichia coli* msbA lpxK mutant affecting deoxycholate resistance and lipopolysaccharide assembly at the restrictive temperature. J Bacteriol. **179**: 7638-43.
214. Qin, A. & B. J. Mann. 2006. Identification of transposon insertion mutants of *Francisella tularensis tularensis* strain Schu S4 deficient in intracellular replication in the hepatic cell line HepG2. BMC Microbiol. **6**: 69.
215. Qin, A., D. W. Scott & B. J. Mann. 2008. *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* Schu S4 disulfide bond formation protein B, but not an RND-type efflux pump, is required for virulence. Infect Immun. **76**: 3086-92.
216. Bakshi, C. S., *et al.* 2006. Superoxide Dismutase B Gene (sodB)-Deficient Mutants of *Francisella tularensis* Demonstrate Hypersensitivity to Oxidative Stress and Attenuated Virulence. J Bacteriol. **188**: 6443-8.
217. Lindgren, H., *et al.* 2007. Resistance of *Francisella tularensis* strains against reactive nitrogen and oxygen species with special reference to the role of KatG. Infect Immun. **75**: 1303-9.
218. Rohmer, L., *et al.* 2006. Potential source of *Francisella tularensis* live vaccine strain attenuation determined by genome comparison. Infect Immun. **74**: 6895-906.
219. Quarry, J. E., *et al.* 2007. A *Francisella tularensis* subspecies *novicida* purF mutant, but not a purA mutant, induces protective immunity to tularemia in mice. Vaccine. **25**: 2011-8.
220. Pechous, R., *et al.* 2006. Construction and Characterization of an Attenuated Purine Auxotroph in a *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain. Infection and Immunity. **74**: 4452-4461.

221. Kiss, K., *et al.* 2008. Characterization of fig operon mutants of *Francisella novicida* U112. FEMS Microbiol Lett. **285**: 270-7.
222. Ramakrishnan, G., A. Meeker & B. Dragulev. 2008. fsIE is necessary for siderophore-mediated iron acquisition in *Francisella tularensis* Schu S4. J Bacteriol. **190**: 5353-61.
223. Milne, T. S., *et al.* 2007. A 55 kDa hypothetical membrane protein is an iron-regulated virulence factor of *Francisella tularensis* subsp. *novicida* U112. J Med Microbiol. **56**: 1268-76.
224. Ratledge, C. 2007. Iron metabolism and infection. Food Nutr Bull. **28**: S515-23.
225. Janckila, A. J., *et al.* 2007. Tartrate-resistant acid phosphatase as an immunohistochemical marker for inflammatory macrophages. Am J Clin Pathol. **127**: 556-66.
226. ExPASy. <http://www.expasy.ch/enzyme/3.1.3.2>.
227. Rossolini, G. M., *et al.* 1998. Bacterial nonspecific acid phosphohydrolases: physiology, evolution and use as tools in microbial biotechnology. Cell Mol Life Sci. **54**: 833-50.
228. Baca, O. G., *et al.* 1993. Acid phosphatase activity in *Coxiella burnetii*: a possible virulence factor. Infect Immun. **61**: 4232-9.
229. Remaley, A. T., *et al.* 1984. Leishmanial phosphatase blocks neutrophil O-2 production. J Biol Chem. **259**: 11173-5.
230. Bliska, J. B., *et al.* Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by an essential *Yersinia* virulence determinant. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Feb 15;88(4):1187-91.
231. Guan, K. L. & J. E. Dixon. 1990. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. Science. **249**: 553-6.
232. Kaniga, K., *et al.* 1996. A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol. **21**: 633-41.
233. Mueller, P. & J. Pieters. 2006. Modulation of macrophage antimicrobial mechanisms by pathogenic mycobacteria. Immunobiology. **211**: 549-56.
234. Saleh, M. T. & J. T. Belisle. 2000. Secretion of an acid phosphatase (SapM) by *Mycobacterium tuberculosis* that is similar to eukaryotic acid phosphatases. J Bacteriol. **182**: 6850-3.
235. Vergne, I., *et al.* 2005. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. **102**: 4033-8.
236. Mohapatra, N. P., *et al.* 2007. AcpA is a *Francisella* acid phosphatase that affects intramacrophage survival and virulence. Infect Immun. **75**: 390-6.

237. Mohapatra, N. P., *et al.* 2008. Combined deletion of four *Francisella novicida* acid phosphatases attenuates virulence and macrophage vacuolar escape. *Infect Immun.* **76**: 3690-9.
238. Reilly, T. J., *et al.* 2006. Characterization of recombinant *Francisella tularensis* acid phosphatase A. *Protein Expr Purif.* **45**: 132-41.
239. Felts, R. L., T. J. Reilly & J. J. Tanner. 2006. Structure of *Francisella tularensis* AcpA: prototype of a unique superfamily of acid phosphatases and phospholipases C. *J Biol Chem.* **281**: 30289-98.
240. Stonehouse, M. J., *et al.* 2002. A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C. *Mol Microbiol.* **46**: 661-76.
241. Songer, J. G. 1997. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol.* **5**: 156-61.
242. Titball, R. W. 1993. Bacterial phospholipases C. *Microbiol Rev.* **57**: 347-66.
243. Raynaud, C., *et al.* 2002. Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* **45**: 203-17.
244. Coutinho, I. R., R. S. Berk & E. Mammen. 1988. Platelet aggregation by a phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *Thromb Res.* **51**: 495-505.
245. Terada, L. S., *et al.* 1999. *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect Immun.* **67**: 2371-6.
246. Baron, G. S., T. J. Reilly & F. E. Nano. 1999. The respiratory burst-inhibiting acid phosphatase AcpA is not essential for the intramacrophage growth or virulence of *Francisella novicida*. *Fems Microbiol Lett.* **176**: 85-90.
247. Hernychova, L., *et al.* 2001. Construction of a *Francisella tularensis* two-dimensional electrophoresis protein database. *Proteomics.* **1**: 508-15.
248. Hubalek, M., *et al.* 2004. Comparative proteome analysis of cellular proteins extracted from highly virulent *Francisella tularensis* ssp. *tularensis* and less virulent *F. tularensis* ssp. *holarctica* and *F. tularensis* ssp. *mediaasiatica*. *Proteomics.* **4**: 3048-60.
249. Golovliov, I., *et al.* 2003. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. *FEMS Microbiol Lett.* **222**: 273-80.
250. Anthony, L. S., *et al.* 1991. Transformation and allelic replacement in *Francisella* spp. *J Gen Microbiol.* **137**: 2697-703.
251. Tyeryar, F. J., Jr. & W. D. Lawton. 1969. Transformation of *Pasteurella novicida*. *J Bacteriol.* **100**: 1112-3.
252. Tyeryar, F. J. & W. D. Lawton. 1970. Factors Affecting Transformation of *Pasteurella novicida*. *J Bacteriol.* **104**: 1312-1317.

253. Pavlov, V. M., A. N. Mokrievich & K. Volkovoy. 1996. Cryptic plasmid pFNL10 from *Francisella novicida*-like F6168: the base of plasmid vectors for *Francisella tularensis*. FEMS Immunol Med Microbiol. **13**: 253-56.
254. Kuoppa, K., A. Forsberg & A. Norqvist. 2001. Construction of a reporter plasmid for screening *in vivo* promoter activity in *Francisella tularensis*. FEMS Microbiol Lett. **205**: 77-81.
255. Norqvist, A., K. Kuoppa & G. Sandstrom. 1996. Construction of a shuttle vector for use in *Francisella tularensis*. FEMS Immunol Med Microbiol. **13**: 257-60.
256. Pomerantsev, A. P., M. Obuchi & Y. Ohara. 2001. Nucleotide Sequence, Structural Organization, and Functional Characterization of the Small Recombinant Plasmid pOM1 That Is Specific for *Francisella tularensis*. Plasmid. **46**: 86-94.
257. Maier, T. M., *et al.* 2004. Construction and characterization of a highly efficient *Francisella* shuttle plasmid. Appl Environ Microbiol. **70**: 7511-9.
258. LoVullo, E. D., *et al.* 2006. Genetic tools for highly pathogenic *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. Microbiology. **152**: 3425-35.
259. Maier, T. M., *et al.* 2006. In vivo Himar1-based transposon mutagenesis of *Francisella tularensis*. Appl Environ Microbiol. **72**: 1878-85.
260. Rasko, D. A., C. D. Esteban & V. Sperandio. 2007. Development of novel plasmid vectors and a promoter trap system in *Francisella tularensis* compatible with the pFLN10 based plasmids. Plasmid. **58**: 159-66.
261. Gallagher, L. A., *et al.* 2007. A comprehensive transposon mutant library of *Francisella novicida*, a bioweapon surrogate. Proc Natl Acad Sci U S A. **104**: 1009-14.
262. Thomas, R. M., *et al.* 2006. The immunologically distinct O-antigens from *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* and *novicida* are both virulence determinants and protective antigens. Infection and Immunity. **75**: 371-378.
263. Zahrt, T. C. & D. W. Frank. 2007. Genetics and genetic manipulation in *Francisella tularensis*. Ann N Y Acad Sci. **1105**:67-97
264. Eigelsbach, H. T., W. Braun & R. D. Herring. 1951. Studies on the variation of *Bacterium tularensis*. J Bacteriol. **61**: 557-69.
265. Berg, J. M., K. E. Mdluli & F. E. Nano. 1992. Molecular cloning of the recA gene and construction of a recA strain of *Francisella novicida*. Infect Immun. **60**: 690-3.
266. Cole, L. E., *et al.* 2008. Macrophage proinflammatory response to *Francisella tularensis* live vaccine strain requires coordination of multiple signaling pathways. J Immunol. **180**: 6885-91.

267. Sullivan, J. T., *et al.* 2006. Characterization of the Siderophore of *Francisella tularensis* and Role of fslA in Siderophore Production. *The Journal of Bacteriology*. **188**: 3785-3795.
268. McLendon, M. K., *et al.* 2007. Identification of LpxL, a Late Acyltransferase of *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* **75**: 5518-5531.
269. Buchan, B. W., M. K. McLendon & B. D. Jones. 2008. Identification of differentially regulated *Francisella tularensis* genes using a newly developed Tn5-based transposon delivery system. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.02882-07.
270. Su, J., *et al.* 2007. Genome-wide identification of *Francisella tularensis* virulence determinants. *Infect Immun.* **75**: 3089-101.
271. Pavlov, V. M., *et al.* 1994. Isolation and molecular-genetic characteristic of a cryptic plasmid from the *Francisella novicida* like F6168 strain. *Mol Gen Mikrobiol Virusol* 139-40.
272. Pomerantsev, A. P., *et al.* 2001. Genetic organization of the *Francisella* plasmid pFNL10. *Plasmid*. **46**: 210-22.
273. Dong, X., *et al.* 2004. PlasMapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps. *Nucleic Acids Res.* **32**: W660-4.
274. Gazit, E. & R. T. Sauer. 1999. The Doc toxin and Phd antidote proteins of the bacteriophage P1 plasmid addiction system form a heterotrimeric complex. *J Biol Chem.* **274**: 16813-8.
275. Magnuson, R. & M. B. Yarmolinsky. 1998. Corepression of the P1 addiction operon by Phd and Doc. *J Bacteriol.* **180**: 6342-51.
276. Pomerantsev, A. P., *et al.* 1991. Study of CAT gene expression in Sa and pC194 plasmids in *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, and *Bacillus subtilis* cells. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*. 21-4.
277. Pomerantsev, A. P., *et al.* 1991. Behavior of Sa plasmid in tularemia pathogen cells. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*. 17-21.
278. Pomerantsev, A. P., *et al.* 1991. Transfer of bacteriophage PRD1 genes into modified plasmid Sa of *Escherichia coli* and *Francisella tularensis* cells. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*. 24-7.
279. Pomerantsev, A. P. & V. M. Pavlov. 1999. pCSE4 plasmid for cloning of promoter-containing DNA fragments in *Francisella tularensis*. *Vestn Ross Akad Med Nauk*. 29-32.
280. Bina, X. R., *et al.* 2006. The Bla2 beta-lactamase from the live-vaccine strain of *Francisella tularensis* encodes a functional protein that is only active against penicillin-class beta-lactam antibiotics. *Arch Microbiol.* **186**: 219-28.
281. Das, S., *et al.* 1986. Hydrolysis of phosphoproteins and inositol phosphates by cell surface phosphatase of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol.* **20**: 143-53.

282. Saha, A. K., *et al.* 1988. *Legionella micdadei* phosphatase catalyzes the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in human neutrophils. *Arch Biochem Biophys.* **265**: 94-104.
283. Allen, L. A. & R. L. McCaffrey. 2007. To activate or not to activate: distinct strategies used by *Helicobacter pylori* and *Francisella tularensis* to modulate the NADPH oxidase and survive in human neutrophils. *Immunol Rev.* **219**: 103-17.
284. Rose, R. E. 1988. The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res.* **16**: 355.
285. Kado, C. I. & S. T. Liu. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol.* **145**: 1365-73.
286. Chung, C. T., S. L. Niemela & R. H. Miller. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**: 2172-5.
287. Mokrievich A., F. V. V., Pavlov V.M. 1994. Plasmid cryotransformation. *Problemy Osobo Opasnyn Infektsy Saratov.* **4**: 189-90.
288. Leyral G., J. C. J. J. N., Bourdais E. Larpent J.P. 1994. Activités technologiques en microbiologie - Terminale BGB. Bordeaux. Centre régional de documentation pédagogique: 1-158.
289. Reed, L. J., Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene.* **27**: 493-497.
290. Kaplan, E. L. M., P. 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* **53**: 457-481.
291. Peto, R. P., Julian. 1972. Asymptotically Efficient Rank Invariant Test Procedures. *Journal of the Royal Statistical Society.* **135**: 185-207.
292. Rose, R. E. 1988. The nucleotide sequence of pACYC177. *Nucleic Acids Res.* **16**: 356.
293. Altschul, S. F., *et al.* 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-402.
294. Wheeler, D. L., *et al.* 2003. Database resources of the National Center for Biotechnology. *Nucleic Acids Res.* **31**: 28-33.
295. Ilyina, T. V. & E. V. Koonin. 1992. Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaebacteria. *Nucleic Acids Res.* **20**: 3279-85.
296. Erauso, G., *et al.* 1996. Sequence of plasmid pGT5 from the archaeon *Pyrococcus abyssi*: evidence for rolling-circle replication in a hyperthermophile. *J Bacteriol.* **178**: 3232-7.

297. Koonin, E. V. & T. V. Ilyina. 1993. Computer-assisted dissection of rolling circle DNA replication. *Biosystems*. **30**: 241-68.
298. Del Solar, G., *et al.* 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*. **62**: 434-64.
299. Frank, D. W. & T. C. Zahrt. 2007. Genetics and genetic manipulation in *Francisella tularensis*. *Ann N Y Acad Sci*. **1105**: 67-97.
300. Eigelsbach, H. T., *et al.* 1975. Murine model for study of cell-mediated immunity: protection against death from fully virulent *Francisella tularensis* infection. *Infect Immun*. **12**: 999-1005.
301. Fortier, A. H., *et al.* 1991. Live vaccine strain of *Francisella tularensis*: infection and immunity in mice. *Infect Immun*. **59**: 2922-8.
302. Anthony, L. S., E. Skamene & P. A. Kongshavn. 1988. Influence of genetic background on host resistance to experimental murine tularemia. *Infect Immun*. **56**: 2089-93.
303. Conlan, J. W., *et al.* 2003. Experimental tularemia in mice challenged by aerosol or intradermally with virulent strains of *Francisella tularensis*: bacteriologic and histopathologic studies. *Microb Pathog*. **34**: 239-48.
304. Elkins, K. L., *et al.* 1996. Minimal requirements for murine resistance to infection with *Francisella tularensis* LVS. *Infect Immun*. **64**: 3288-93.
305. Wu, T. H., *et al.* 2005. Intranasal vaccination induces protective immunity against intranasal infection with virulent *Francisella tularensis* biovar A. *Infect Immun*. **73**: 2644-54.
-

ANNEXES

- ANNEXE I :** Séquence nucléotidique du gène *acpA* de *Francisella novicida* et séquence protéique déduite.
- ANNEXE II :** Extraction de l'ADN plasmidique par la technique de KADO-LIU.
- ANNEXE III :** Extraction de l'ADN génomique de *Francisella*.
- ANNEXE IV :** Transformation d'*E. coli*.
- ANNEXE V :** Électroporation de *Francisella*.
- ANNEXE VI :** Cryotransformation de *Francisella*.
- ANNEXE VII :** Amorces et oligonucléotides utilisés pour la construction de la deuxième génération de vecteurs navettes.
- ANNEXE VIII :** Séquence nucléotidique du pF242 (EU850812).
- ANNEXE IX :** Séquence nucléotidique du pF243 (EU850813).

ANNEXE I

Séquence nucléotidique du gène *acpA* de *Francisella novicida* et séquence protéique déduite

(d'après Reilly et collaborateurs 1996¹⁴²)

Zone promotrice : TATA box (-10) et région -35

Site de liaison des ribosomes à l'ARNm : région Shine Dalgarno (SD)

Peptide signal en N-terminal : résidus en bleu.

```
1 tctagagcaaaaatataaatattta
26 aatctttttcttaaaaaaatTTTTTttagcaataatttattttaatt
                               -35
71 ttgttattaatatttccttttgagtctaacaactaaagggtatcat
                               -10                               SD
116 atgaagctcaataaaaattacttttaggaattttaagtctaagtatc
    M K L N K I T L G I L S L S I
161 gcaacaacgacttttgccacagatgtgaataatagcaaaccaaat
    A T T T F A T D V N N S K P N
206 gattatggaactcttgtaaaaaatagaacaaaaattatttaataat
    D Y G T L V K I E Q K L F N N
251 gcgaataactctaaaaactacaactccaataaagcacgtagtaata
    A N T L K T T T P I K H V V I
296 atattccaagagaataactccttttgatagatactttggaatgtac
    I F Q E N N S F D R Y F G M Y
341 cctaatgccaaaaaccagaggggtgagccaaaatttgtagccaaa
    P N A K N P E G E P K F V A K
386 gaaaatactccaaatgttaatggctctgacaaaacaattattagag
    E N T P N V N G L T K Q L L E
431 aataatccaaatacaaaaaatccttatcgtttagatagaaaatttc
    N N P N T K N P Y R L D R N F
476 caaccttgctcacaaaatcatgagtaccatcaagaaatttcttct
    Q P C S Q N H E Y H Q E I S S
521 tttaatgggtggattaatgaacaaatttggtgaacatgggtggatcat
    F N G G L M N K F V E H G G H
566 gataatgacacctataaacaactgtgatgggtcaagtcattggga
    D N D T Y K Q N C D G Q V M G
611 tattatgatggtaataactgtcacagcattatggaattacgcacaa
    Y Y D G N T V T A L W N Y A Q
656 aatttcgctctaaatgataatacgtttgggtacaacttttgggtcca
    N F A L N D N T F G T T F G P
701 tcaacacctgggtgcccttaacctagtggctgggtgcaaattgggtcca
    S T P G A L N L V A G A N G P
746 gcaatgagtcgaagtggttaatttagaaaatattgaaaacaactat
    A M S P S G N L E N I E N N Y
791 atcattgatgatcctaaccatactacgatgattgctcttatgggt
    I I D D P N P Y Y D D C S Y G
836 acaagtaaactctggcgatacaatacagctgtagcaaaaattact
    T S K S G D T N T A V A K I T
881 gatggttataatattggacactatctaactcaaaaagggtattact
    D G Y N I G H Y L T Q K G I T
926 tgggggttgggtccaaggaggattcaaccaacaagctactctgggt
    W G W F Q G G F K P T S Y S G
971 aaaacagcaatatgtgatgctatgagcactaataagttcgggtgta
```

K T A I C D A M S T N K F G V
 1016 aaatcaagagactatatacctcatcatgagccttttaactactgg
 K S R D Y I P H H E P F N Y W
 1061 aaagagacatcaaaccctcatcatttagcaccaagtgatgataag
 K E T S N P H H L A P S D D K
 1106 tatataggtagtaatgaccaagctaatcatcagtacgacataagt
 Y I G S N D Q A N H Q Y D I S
 1151 gaattctggaaggctcttgatcaaaacaacatgcctgcggttaagt
 E F W K A L D Q N N M P A V S
 1196 tacttaaaagctcctggctaccaagatggctcatggaggctactca
 Y L K A P G Y Q D G H G G Y S
 1241 aaccctctagatgaacaagaatggctagtcaataccattaataga
 N P L D E Q E W L V N T I N R
 1286 atccagcaatcaaaagactgggatagcacagcaattataattatt
 I Q Q S K D W D S T A I I I I
 1331 tatgatgactctgatgggtgactatgaccatgtctacagcccaaaa
 Y D D S D G D Y D H V Y S P K
 1376 tcacagtttagcgatatcaaaggaagacaaggttatggaccaaga
 S Q F S D I K G R Q G Y G P R
 1421 ttaccaatgcttggtattttctccttatgctaaagcaaactatggt
 L P M L V I S P Y A K A N Y V
 1466 gatcattcattacttaatacaagcatctgtacttaagtttatagag
 D H S L L N Q A S V L K F I E
 1511 tataactggggcatcggctcagtttagtaagtatagtaatgataaa
 Y N W G I G S V S K Y S N D K
 1556 tactcaaacaatatcttaaacatgtttgattttaataaagaacaa
 Y S N N I L N M F D F N K E Q
 1601 aaaacactaaaactgatttttagatcctaagacaggatttagtgatg
 K T L K L I L D P K T G L V M
 1646 gataaattaaactaaaaatatttactcggtaagttgctttaatct
 D K L N *
 1691 attgttttcgtttatcgcctctttctaaact 1720

ANNEXE II

Extraction de l'ADN plasmidique par la technique de KADO-LIU²⁸⁵

(adaptation du protocole au genre *Francisella*)

Réactifs :

TE-KADO 10X

Tris-base..... 48,5 g
EDTA-Na₂, 2H₂O 1,15 mL
Eau distillée..... qsp 1 000 mL
Dissoudre dans 800 mL d'eau distillée. Ajuster à pH 7,9 avec de l'acide acétique glacial. Compléter à 1 000 mL avec de l'eau distillée. Stériliser à l'autoclave 20 min à 110°C. Conserver à température ambiante.

Solution de base pour lyse

Tris-base..... 3 g
SDS 20% 75 mL
Eau distillée..... qsp 500 mL
Stériliser à l'autoclave 20 min à 110°C. Conserver à température ambiante.

NaOH 4N

NaOH 10N (lessive de soude)..... 2 mL
Eau distillée..... 3 mL
Préparation extemporanée.

Solution de lyse « KADO ».

Solution de base pour lyse 10 mL
NaOH 4N 200 µL
Préparation extemporanée.

Solution III : Acétate de potassium, 3M, pH 4,8.

Acétate de potassium 5M..... 6 mL
Acide acétique glacial 1,15 mL
Eau distillée..... qsp 10 mL
Conserver 2 semaines à +4°C.

TE : Tris-HCl 10mM, pH 8,0, EDTA 1mM

Tris 1 M, pH 8,0..... 10 mL
EDTA 0,5 M 2 mL
Eau distillée..... 1 000 mL
Stériliser à l'autoclave 20 min à 110°C. Conserver à température ambiante.

TE ou eau RNase

Eau distillée / TE stérile 10 mL

RNase à 20 mg.mL⁻¹ 10 µL

Conserver à +4°C.

Protocole :

- Préparer une culture de 24 h dans 3 mL de bouillon LB-IsoVitalexTM ou BHI-IsoVitalexTM
- Centrifuger 1,5 mL de cette culture dans un tube Eppendorf de 2 mL – 3 minutes à 8 000 g – Eliminer le surnageant.
- Resuspendre parfaitement le culot dans 200 µL de TE-KADO 1X
- Ajouter 400 µL de solution de lyse « KADO » – Agiter vigoureusement à la main.
- Incuber 20 minutes à 60°C (*Attention cette étape est dépendante du GC% de l'ADN de la bactérie traitée*).
- Ajouter 600 µL de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1).
- Ajouter 100 µL de solution III – Agiter vigoureusement à la main jusqu'à l'obtention d'une suspension laiteuse – Laisser reposer 30 minutes dans la glace.
- Centrifuger 10 minutes à 8 000 g.
- Transférer 500 µL de surnageant dans un nouveau tube Eppendorf de 2 mL.
- Ajouter 1 mL d'alcool absolu à température ambiante. Mélanger par inversion du tube.
- Centrifuger 10 minutes à 8 000 g. Eliminer l'alcool absolu.
- Ajouter 500 µL d'alcool à 70% (vol/vol). Mélanger par inversion du tube.
- Centrifuger 5 minutes à 8 000 g. Eliminer l'alcool à 70%. Bien essuyer les bords du tube de façon à éliminer les traces d'alcool.
- Dessécher le culot d'ADN durant 10 minutes au Speed-Vac.
- Remettre en suspension le culot dans 30 µL de TE-RNase pour une conservation, ou d'eau-RNase pour continuer les manipulations, telles que des digestions enzymatiques.
- Incuber 10 minutes à 65°C. Agiter. Incuber 5 minutes à 65°C. Agiter.
- Conservation de l'ADN +4°C ou -20°C.

ANNEXE III

Extraction de l'ADN génomique de *Francisella*

Réactifs :

TE-KADO 10X

Tris-base..... 48,5 g
EDTA-Na₂, 2H₂O 1,15 mL
Eau distillée..... qsp 1 000 mL

Dissoudre dans 800 mL d'eau distillée. Ajuster à pH 7,9 avec de l'acide acétique glacial. Compléter à 1 000 mL avec de l'eau distillée. Stériliser à l'autoclave 20 min à 110°C. Conserver à température ambiante.

Solution de base pour lyse

Tris-base..... 3 g
SDS 20% 75 mL
Eau distillée..... qsp 500 mL

Stériliser à l'autoclave 20 min à 110°C. Conserver à température ambiante.

NaOH 4N

NaOH 10N (lessive de soude)..... 2 mL
Eau distillée..... 3 mL

Préparation extemporanée.

Solution de lyse « génome ».

Solution de base pour lyse 10 mL
NaOH 4N 100 µL

Préparation extemporanée.

Solution III : Acétate de potassium, 3M, pH 4,8.

Acétate de potassium 5M..... 6 mL
Acide acétique glacial 1,15 mL
Eau distillée..... qsp 10 mL

Conserver 2 semaines à +4°C.

Protocole :

- Préparer une culture de 24 h dans 3 mL de bouillon LB-IsoVitalexTM ou BHI-IsoVitalexTM
- Centrifuger 1,5 mL de cette culture dans un tube Eppendorf de 2 mL – 3 minutes à 8 000 g – Eliminer le surnageant.
- Resuspendre parfaitement le culot dans 200 µL de TE-KADO 1X
- Ajouter 400 µL de solution de lyse « génome » – Agiter vigoureusement à la main.
- Incuber 20 minutes à 60°C

- Ajouter 600 μ L de phénol-chloroforme- alcool isoamylique (25:24:1).
 - Ajouter 50 μ L de solution III – Agiter vigoureusement à la main jusqu’à l’obtention d’une suspension laiteuse – Laisser reposer 10 minutes dans la glace.
 - Centrifuger 10 minutes à 8 000 g.
 - Transférer 500 μ L de surnageant dans un nouveau tube Eppendorf de 2 mL.
 - Ajouter 1 mL d’alcool absolu à température ambiante. Mélanger par inversion du tube jusqu’à l’apparition d’une « pelote » d’ADN.
 - Centrifuger 10 minutes. Eliminer l’alcool absolu.
 - Ajouter 500 μ L d’alcool à 70% (vol/vol). Mélanger par inversion du tube.
 - Centrifuger 5 minutes à 8 000 g. Eliminer l’alcool à 70%. Bien essuyer les bords du tube de façon à éliminer les traces d’alcool.
 - Dessécher le culot d’ADN durant 10 minutes au Speed-Vac.
 - Remettre en suspension le culot dans 100 μ L de TE-RNase pour une conservation, ou d’eau-RNase pour continuer les manipulations, telles que des digestions enzymatiques.
 - Incuber 10 minutes à 65°C. Agiter. Incuber 5 minutes à 65°C. Agiter.
 - Conservation de l’ADN +4°C ou -20°C.
-

ANNEXE IV

Transformation d'*E. coli*²⁸⁶

Préparation et stockage de bactéries compétentes

Réactifs :

TSS : transformation storage solution (PEG 3350 10%, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM, DMSO 5%, HCl 0,1N)

PEG 3350.....	1 g
MgCl ₂ 1M	0,1 mL
MgSO ₄ 1M.....	0,1 mL
DMSO.....	0,5 mL
HCl.....	150 µL
Bouillon Luria Bertani	qsp 10 mL

Conserver à +4°C.

Protocole :

- Préparer une préculture d'*E. coli* – 18h à 37°C sous une agitation de 200 rpm.
- Diluer la préculture au 1/100^e dans 50 mL de LB – Incuber à 37°C jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 0,3 à 0,4.
- Centrifuger 1 mL de la culture – 3 minutes à 8 000 g
- Eliminer le surnageant et suspendre le culot dans 1/10^e du volume initial de culture centrifugée avec du TSS à 4°C (soit 100 µL).
- Ajouter l'ADN (100 pg) et incuber 5 à 30 minutes sur la glace.
- Ajouter 900 µL de solution TSS.
- Incuber 1 heure à 37°C sous une agitation de 200 rpm.
- Sélection sur gélose LB + antibiotique (étalement 100 µL, centrifuger le reste, reprendre le culot dans 100 µL de LB et étalement).

ANNEXE V

Électroporation de *Francisella* ²⁵⁷

Réactifs :

Saccharose à 0,5 M

Saccharose (M=342,3 g/mol)..... 34,23 g

Eau distillée..... qsp 200 mL

Conserver à +4°C.

Protocole :

- Préparer une préculture dans 3 mL de bouillon BHI-IsoVitaleX™ à partir d'un isolement sur gélose chocolat enrichie (de 2 à 4 jours) – 18 h à 37°C sous une agitation de 200 rpm.
- Diluer la préculture dans 25 mL de bouillon BHI-IsoVitaleX™, au 1/10^e pour les sous-espèces *tularensis* et *holarctica*, ou au 1/20^e pour *F. novicida* et *F. philomiragia*. Incuber à 37°C à 200 rpm jusqu'à atteindre une DO_{600nm} comprise entre 0,3 et 0,6 (environ 2 h pour *F. novicida* et *F. philomiragia* et environ 5 h *F. tularensis*).
- Centrifuger la culture – 15 minutes à 4 500 g – éliminer le surnageant.
- Laver le culot deux fois avec une solution de saccharose à 0,5 M : dans 10 mL, puis 5 mL.
- Reprendre le culot avec la solution de saccharose 0,5 M de manière à obtenir une suspension d'environ 10¹⁰ cellules/mL (On considère 10¹⁰ UFC/mL/UDO_{600nm} pour la sous-espèce *holarctica* et 10⁹ UFC/mL/UDO_{600nm} pour la sous-espèce *tularensis*).
- Mélanger 200 µL de ces cellules compétentes avec 1 µL d'ADN plasmidique à 100 µg/mL.
- Incuber à température du laboratoire pendant 10 min.
- Electroporer dans une cuvette de 0,2 cm (2,5 kV, 25 µF et 600 Ω) avec l'appareil Biorad Micropulser™ programme Ec2 (Biorad, Marnes-la-Coquette, France).
- Reprendre les cellules dans 1 mL de bouillon BHI-IsoVitaleX™, et incuber à 37°C pendant 2 h à 200 rpm.
- Étaler sur le milieu de sélection adéquat : BHI-IsoVitaleX™- 2% d'hémoglobine, additionné de l'antibiotique adéquat (étaler 100 µL, centrifuger le reste, reprendre le culot dans 100 µL de BHI, et étaler).
- Les clones apparaissent après 2 à 6 jours d'incubation à 37°C.

ANNEXE VI

Cryotransformation de *Francisella*²⁸⁷

Réactifs :

KCl 0,2 M

KCl (M=74,56 g/mol) 2,98 g
Eau distillée..... qsp 200 mL

Conserver à +4°C.

Tampon de cryotransformation : 0,2 M MgSO₄, 0,02 M Tris acetate, pH 7,5

MgSO₄ 7H₂O (M=246,48 g/mol) 9,86 g
Tris-base (M=121,1 g/mol) 0,48 g
Eau distillée..... qsp 200 mL

Dissoudre dans 160 mL d'eau distillée, ajuster le pH à 7,5 avec de l'acide acétique glacial et compléter à 200 mL avec de l'eau distillée.

Conserver à +4°C.

Protocole :

- Isolement sur gélose chocolat enrichie de 48 h à 37°C pour les sous-espèces *tularensis* ou *holarctica* ou de 24 h à 37°C pour *F. novicida*.
- Gratter la culture à l'oese (10 µL) et suspension de la culture dans 400 µL KCl 0,2 M.
- Mélanger 25 µL de cellules compétentes et 25 µL de tampon de cryotransformation, et 1 µL d'ADN à 100 µg/mL dans un tube eppendorf de 1,5 mL.
- Incuber 10 minutes à température ambiante.
- Incuber 5 minutes dans de l'azote liquide.
- Incuber 5 minutes dans un bain-marie à 37°C.
- Déposer 50 µL du mélange au centre d'une gélose chocolat enrichie.
- Incuber 4 h à 37°C pour *F. novicida*, et 7 h à 37°C pour les sous-espèces *tularensis* ou *holarctica*.
- Récupérer la culture de 4 h ou 7 h avec l'oese (10 µL) par grattage, et la suspendre dans 400 µL KCl 0,2M.
- Étaler sur le milieu de sélection adéquat : 400 µL de la suspension répartis sur 4 géluses BHI-IsoVitaleXTM- 2% d'hémoglobine, additionné de l'antibiotique adéquat (soit 100 µL par boîte).

ANNEXE VII

Amorces et oligonucléotides utilisés pour la construction de la deuxième génération de vecteurs navettes

Amorces / oligonucléotides	Description
P001	5'-CTATATAGGCGCGCCTTATTAC-3' – amorce « forward » pour l'amplification du promoteur <i>groES</i> de <i>F. t. tularensis</i> pour pF242-Cm et pF242-Km
P002	5'-CTATTGTATGGATCCTAGTCGAG-3' – amorce « forward » pour l'amplification du promoteur <i>groES</i> de <i>F. t. tularensis</i> pour pF243-Cm
P003	5'-CCAAAAAGTACTCAAATCTATTG-3' – amorce « forward » pour l'amplification du promoteur <i>groES</i> de <i>F. t. tularensis</i> pour pF243-Km
P004	5'-GGACGAATGTCATGCCAATC-3' – amorce « reverse » pour l'amplification du promoteur <i>groES</i> de <i>F. t. tularensis</i> pour pF242-Cm pF242-Km pF243-Cm et pF243-Km
G001	5'-GAAATTAAGCATGCGTAAAGGAG-3' – amorce « forward » pour l'amplification du gene <i>gfp</i> pour pF242-Cm pF242-Km pF243-Cm et pF243-Km
G002	5'-CTAATTAAGGCGCGCCTTATTG-3' – amorce « reverse » pour l'amplification du gene <i>gfp</i> pour pF242-Cm et pF242-Km
G003	5'-CTAATTAAGGATCCTTATTGTATAG-3' – amorce « reverse » pour l'amplification du gene <i>gfp</i> pour pF243-Cm
G004	5'-GCTAATTAAGTACTTATTGTATAG-3' – amorce « reverse » pour l'amplification du gene <i>gfp</i> pour pF243-Km
PG001	5'-AATTCTGCAGCCCGGGGA-3' – amorce « forward » pour l'amplification du fragment <i>gro-gfp</i> pour pF242-Cm et pF242-Km
PG002	5'-GCTTAGCCCTAATTAAGGC-3' – amorce « reverse » pour l'amplification du fragment <i>gro-gfp</i> pour pF242-Cm et pF242-Km
PG003	5'-GATCCGCCCTATTGTATG-3' – amorce « forward » pour l'amplification du fragment <i>gro-gfp</i> pour pF243-Cm
PG004	5'-GCTTAGCCCTAATTAGG-3' – amorce « reverse » pour l'amplification du fragment <i>gro-gfp</i> pour pF243-Km
PG005	5'-GGATCCGCCCAAAAAGTAC-3' – amorce « forward » pour l'amplification du fragment <i>gro-gfp</i> pour pF243-Km
PG006	5'-CCGCTTAGCCCGCTAATTAAG-3' – amorce « reverse » pour l'amplification du fragment <i>gro-gfp</i> pour pF243-Km
A001	5'-GCTTGTAAAGAGCGAATAGGCGCGCTCGAACACTAAAAGCTTGATAC-3' – amorce « forward » pour la création d'un site de restriction unique <i>AseI</i> dans pF242-Cm et pF242-Km
A002	5'-GTATCAAGCTTTTGTAGTTCGAGGCGCGCTATTGCTTTAAACAAGC-3' – amorce « reverse » pour la création d'un site de restriction unique <i>AseI</i> dans pF242-Cm et pF242-Km
B001	5'-CTAGTGACAGAATGTAGGATCCAAAACCAAGAGCCATTGC-3' – amorce « forward » pour la création d'un site de restriction unique <i>BamHI</i> dans pF243-Cm
B002	5'-GCAATGGCTCTTGGTTTGGATCCTACATCTGTCACTAG-3' – amorce « reverse » pour la création d'un site de restriction unique <i>BamHI</i> dans pF243-Cm
M001	5'-GGCTAATAGTCTTGACAGCGTAGCCACTTCAAATTGTCGC-3' – amorce « forward » pour la création d'un site de restriction unique <i>MluI</i> dans pF242-Cm et pF242-Km
M002	5'-GCGACAATTTGAAGTGGCTACGCGTCTGCAAGACTATTAGCC-3' – amorce « reverse » pour la création d'un site de restriction unique <i>MluI</i> dans pF242-Cm et pF242-Km
M003	5'-GATACTTTCTTGGTCAACTAACGCGTGGGAAGACTATCTATATTGGC-3' – amorce « forward » pour la création d'un site de restriction unique <i>MluI</i> dans pF243-Cm et pF243-Km
M004	5'-GCCAATATAGATAGTCTTCCCACGCGTGTAGTGACCAAGAAAGTATC-3' – amorce « reverse » pour la création d'un site de restriction unique <i>MluI</i> dans pF243-Cm et pF243-Km
MC001	5'-P-CGCGTGGATCCCGGTACCTGATCAGATCTGCGGCCGCGAGCTCGATCGACTCGAGGCCTA-3' – oligonucléotide porteur du MCS pour pF242-Cm
MC002	5'-P-CGCGTAGGCTCGAGTCGACGATCGAGCTCGGCCGCGAGCTGATCAGGTACCCGGGATCCA-3' – oligonucléotide complémentaire à MC001
C003	5'-P-CGCGTGGATCCAGATCTGATCAGTACCGCGCCGCGAGCTCGTACGCGGCCGGCCGTTAAACA-3' – oligonucléotide porteur du MCS pour pF242-Km
C004	5'-P-CGCGTGTAAACGGGCCGGCCGCTGACGAGCTCGGCCGCGGTACCTGATCAGATCTGGATCCA-3' – oligonucléotide complémentaire à C003
C005	5'-P-CGCGTGGCGCCCGGGTACCGATCGCGCCGCTCGAGCTCAGGCCTGTCGACA-3' – oligonucléotide porteur du MCS pour pF243-Cm
C006	5'-P-CGCGTGTGACAGGCTGAGCTCGAGCGCCGCGATCGGTACCCGGGCGCGCA-3' – oligonucléotide complémentaire à C005
C007	5'-P-CGCGTGGCGCTGCAGGCGCCGGATCTGCGCAGGTACCGGCCGCGTTAAACGAGCTCGTACGCTCA-3' – oligonucléotide porteur du MCS pour pF243-Km
C008	5'-P-CGCGTGACGTGACGAGCTCGTTAAACGCGCCGCGTACCTGCGCAGGATCCGGCGCGCTGCAGCGCCA-3' – oligonucléotide complémentaire à C007

^a Les régions soulignées correspondent aux sites de restrictions, *AseI* (amorces P001, G002, A001, A002), *BamHI* (amorces P002, G003, B001, B002), *ScaI* (amorces P003, G004,), *SphI* (amorces P004, G001), *PvuII* (amorces F001, R001), *StuI* (amorces F002, R002, F003, R003), *MluI* (amorces M001, M002, M003, M004). Le groupe phosphate ajouté à l'extrémité 5' est représenté par P

ANNEXE VIII

Séquence nucléotidique du pF242 (EU850812)

1 ATGGCAAGTTTTTACGAATATATTCAGCATGTTATAGATTCTAATAAATTTTTAGAAAGAA 60
61 AAGAATCTTGATAAAAAAAAAAATTAAATCTTAAAGATTTATCCGGTGGGGTTAATAAAAAA 120
121 TTTGATCCAAGTATGGGACGTGTTATTACAATGAAAAATAACGCAAGAAGTGATTATGAA 180
181 AAAGAAGATAGAGTGAAAAAGTTTTAGAAAGAAAATGATTATACTCCTTCATTCTTAAAA 240
241 TCATTAGACAAACCATATTATTATTATTTTATATCATTCCAAAATAGTTTAGATGATAGT 300
301 GATGATGTTGAAGAATTATACGGTCGCGAAAAGAGTTGATTTTCGTAGAGTTAGTATTTAC 360
361 GAAAATATGAATCCATCCGGATATTTATATATAGATCAAAGGCAACAATTATTTTCCTGT 420
421 ATTCATCAGTTAATGTTTATTCATTTTATTTTATTCGTAAATAGAATAAAGCATGGAGAT 480
481 ATGCATATGAAAAATATTAATGGATTAAATTTACAAAAATAATAAAGATTTTTATTCT 540
541 GTTAAGGCTTTTTGATTTTGGGCATGCTGAGGTGAATTGTGGTGGGATTATAGGTTACCGT 600
601 TATACTGATATTAATTATTTTAAATTGAAATCTCAAAAAAAAAATCTCTCGTAGGATTT 660
661 TTTGAGGGCAGATCAAGATTTAATGACTATATAAGTGGTGAAAATCAAATAGAAATGGAA 720
721 AAGCACTTTCATTACATCATTGTTAACCAATCACCAAGTACCAAATTTAAGAAAAATT 780
781 CATAAAAATATTGCTATTGATTTTTTAAATCGAGAAGGTGATCGATTGGAGAGAAATTTA 840
841 AGAGAAATTAAGACAAAAATATTACTAATGAATATTCATGTAATTTAGTTCTCAAAGAA 900
901 TTCGCAGCATCATCTGAAAGAGTAGTTGGTATACTTAGATGAAATTTTATTCTGGATTGC 960
961 TTATAGAGGTTTTAAGGCGATTTAAGAGCCATTTTTGATTTTAACGTGAAAAACTATATC 1020
1021 GAAGCTTAAATCGCTTAAATCGCTTCTATGTTTCCAGAATGCGACAATTTGAAGTGG 1080
1081 CTAGCCGTCTGCAAGACTATTAGCCTTGATGATTTTTTAAATGTCCAAAAATGATAATAC 1140
1141 AATCATAACATAATCATTTTTTTGTTTTCTGTTTTATTTTGTTTTCTTTCTCAGTTTCTT 1200
1201 TTTTGTCTTTTGTCTATGACTTGCTTTAGTCTTTCTTTTTGAGATTTTTTCTTTTGAGAA 1260
1261 AGTTAAACATTTTTCTGTTCTTCTGAGTTGAATGTCTAATTTTTCCACCTTTTTTCTTAA 1320
1321 AGCTCAATATGCATTGACTGCGTCAAAGTAAAATTGAGTTGTTTTCCAGTTAGTAAAAA 1380
1381 TCGCTAATCGCTGGATTTTAACCCCTGAAAAATGAAAAAATGAAGCTTGAGAAGATCGC 1440
1441 CAAAAAGGCGAAGCCGTTTTTGGTCTTTACTTGATACAAAGTATATTGGAAACAAGTGCA 1500
1501 GATTTTATGATTGAATAGATACAAAAAAGTCTTATACTTTTAAGCGACCAAACATAAAAA 1560
1561 ATACAGGACTAATTTAATGAAAAATAATAATTCAATTTTGGCACAAAAGCAACACATAA 1620
1621 CCCAATTGAAAAATAATCAAACCTCGCATACAACGATTATTTTCTTTCAACACAAAAATAC 1680

1681 AAAATAACATTTGTGATTGTGGTCGCTATATTCAGCTAAACAAAAAAGAAATTACGATA 1740
1741 CAGCAGAAATTA AAAAGGAAGTTGAACAAGCTTATAACATGCAAATATCGTTATTGTCCGT 1800
1801 TGTGTAATTATTACCGTATTTGTTCTGTGTCTCCTCAAATGGTTAAAAGCACTTGAAGACC 1860
1861 AACAAAACAAAGGAAATAAGATATTGTTTCTAACCTTAACTGTTCCAAATTGCGATTATT 1920
1921 CAGAAACTAGAAAACTATCTCGAATATGAATAGGGCATATAAGAGATTGACTGAACAAA 1980
1981 ATTTATTTAAAAATATTGAAGCTTGGATACGAACTACAGAAGTAACATTTAACACAAAAG 2040
2041 GCGAAGCACACCCACATTTTTCACATTGCCCTAGCAGTTAATGAAAACTACTTCAAAAAAG 2100
2101 GTAATTACAAGACTACTAGAGAGTGGTCTAAAATATGGTCAAAAAGCTTACAAGAGCGATA 2160
2161 AGCAATTAATCGTAGATATCCGAAAATCATAACAAGAGTAAAAAGCACTCAAAGAGAGATT 2220
2221 TAGACATTCATTCAACTGTTAAAGAGTTGGCTAAATACTGCATAAAAATCAACCGACTTGC 2280
2281 AGAGAATTA AAAACCCCTGAAAATATGGAGATTATATTCAATCAATTAAAAGGGTTTGAGGT 2340
2341 TTATTGCCACTAGTCAAAACATCAAACATCAGAAGATAAAAAAGATGAGTTAAATTTCTA 2400
2401 ATGAATGGGAACTAATTGAGTCAATTATTTTTGAAGTACTACCCAGACATGAAACAATATT 2460
2461 TACATCATAGAACGGTATCAAAAAATGAAACAGTTTGATTTGTTTGGGGGATTTTCTAAA 2520
2521 CCTACAAAATCAAAAAC TAAAAC TGGTAATCAAGGGCGACCAAAAAAGATAACGCCTGGA 2580
2581 GTTGTTTTTTGAAACTAAAAACTTTT GAGTTCCAAAAAGAAAACTCAAATGATGAAATT 2640
2641 ATGCAAAAAC TTAATCTAACAAAATCAATTTTTTATCGAATCAAGAAAGGTTATTATGAT 2700
2701 GACCTTTTTTAAAAGATTTTTTAGAAACGAACATTCAAAAC TTTTCACTTACTCAAGAAGAG 2760
2761 AATTAGATAAGATATATTTTTTTTTATTTTTTTTGCTCATAACCTTTTTTGAAAAAGTAAAAT 2820
2821 TTATCTTTTGTATTGCTTTTGTATCAAGCTTTTTTAGTGTTCGACGCTATTCGCTCTTTAA 2880
2881 ACAAGCATCTTGAAGCATCTTTTAGATTTTTCTAAAGGCTCATTATCCATTGAAAAAATT 2940
2941 TCAATGGTAATTCGTAGAAAATAGACACGCTATAAACTCAAATTTTGAGTTTATAGCGTG 3000
3001 CCCTTTTATCCCTGTCAATTTGCATAATTTTTGAGCATAGTGACAGGGTGATAAAACTAG 3060
3061 TGATGATTAATTGTA CTCAAAGGGGATTACTAGAAATGTTAAAAAGTGATAAGCCGTTTTTA 3120
3121 AGGCGATTTAAGAGCCATTTTTGATTTTAAACGTGAAAAACTATATCGAAGCTTAAAAATCG 3180
3181 CTTAAAATCGCTTTTAAATCATCTAGAATGAGCTGTTTTGATGCTGTTATTGATTTAAAA 3240
3241 GATTATATTTCTTGATATTTTTGATTTT GATATTTTATGCTTCCTCTATTTCCACAGATG 3300
3301 CTTCTCTTTCTTTAGTTTTT GAGACTTTGGTATTATTTTTTTTATCAAGAAAATATTTCAA 3360
3361 AATCTTTTACTAGAATTTCTTTTATTTCTTCTACATTTATGTCTTGACCTTCTACTTCTC 3420
3421 CGGATTGAACAAAACCTACAAGTTCATCAAAAATCTCTAAAGTTGATTTTGATATTTTTT 3480
3481 CGTCTAATTTTGAAGTATTACACCTAATTGGATTTTAAAAGCTAAGTTGTCCATTTTAA 3540

3541 TCTATATTGTTTTTTTTTGATTTTGATATTTTCTCATAAAAAGTTTTGTGATTAAAAAAT 3600
3601 ATTTACACTTTCCAGAATGCGACAATTTGAAGTGGCTAGCCGTCTGCAAGACTATTAGCC 3660
3661 TTGATGATTTTTAAAATATTAATAATAATGCAGTCATAACAGATTATTGAAGGCAA 3720
3721 TAAAAATAACTGCCCTTTATTAGCCTTTGAAAGAATTTGAACCTTTGATAATGCTAAATT 3780
3781 GCGAATAGCGTTAAGGGGTGTGCTTTCTTTGAGTGTTATTTTTAGAACTAAAGTGAATTA 3840
3841 GAAAGGAAAGCACAATAAATCATAGCATAATTATTTTTTTGTTTTTATACGTTTAGGTTT 3900
3901 ATTGTTACAATGTTTTTTTTGGCAATTTTTTAATAT 3936

ANNEXE IX

Séquence nucléotidique du pF243 (EU850813)

1 GATACAAAAATGTGTTTTTAAATTGAAAAGTGATACAAAAATGTGTTTTTAAATTGAAAA 60
61 GTGATACAAAAATGTGTTTTTAAATTTACAAAATCCTCTGAAAAGTATTGATATCACTAC 120
121 ATCACAGTTTGAAAACAGAGTTGCTACAATATTTAAAGAGAATATTTAAAGAGAAAAATATCT 180
181 TTAGGAAATTTTGCAAATTTCAAAGATTTAACGACTTTTTTTGACTTTTTTAAAAGATAAGA 240
241 TCTACAATATAAGTACTTATTTAAGTACATGGATTTACATAATGCAAACAGTTAATTATT 300
301 CAACTTTTAGAAGTGAGTTATCTGATTCAATGGATAGAGTAACAAAAAATCATAGTCCTA 360
361 TGATTGTTACTAGAGGCTCAAAGAAAGAAGCAGTTGTTATGATGTCATTAGAAGATTTTA 420
421 AAGCTTATGAAGAAACAGCTTATCTGATGAGAAGCATGAATAACTATAAGAGATTACAAA 480
481 ACTCTATTGATGAAGTAGAATCTGGTTTTAGCTATCCAAAAAGAGTTGATTGAAGAATGAT 540
541 ACTTTCTTGGTCAACTAATGCTTGGGAAGACTATCTATATTGGCAAAGCATAGATAAGAA 600
601 AAAGCTAAAACGGATTAATTTGCTAATCAAAGACATTATGAGAAATCACTTTGAGGGATT 660
661 AGGAGAGCCTGAACCTTTAAAACATAACTTCTCTGGTTATTGGTCTAGACGAATAGACAA 720
721 AGAACATCGAATAATCTACAAAATTGAAAATCAAATCTAATCATTATTCAATGTAGATA 780
781 TCATTATTAGTTTGATGAAAAAACAATGGTATCATTACTCCTGTACTAGTGTGGAACAC 840
841 AAAGAGCTATCCAAGTAGAGCTTCCAAACAAAACCTTGTTTAGCTCTCCACCTACTTTTCA 900
901 AATTCATCAAATAACAAATATATAATTTTTTCGTTAATTTAAATTTCTTAGAAATATGAAAT 960
961 TCCAACCTCAGTGAATTTTAGATTTTTAAGAAACAAATGATGATGTTGACTATCATTCTG 1020
1021 TCAATAGTTTGTAAGTACTAGTACAGAAATGTAGGATAAAAACCAAGAGCCATTGCACACGGGA 1080
1081 AAATAGATTATAATTTGGTATTGAAATGCTATAGTATGCTTATAAAAATTAACACTAACG 1140
1141 ATACTGATGAAAGGTATAACCTAGAACTATTTATGTAGTCTATCGTAGTTGCTACTCCA 1200
1201 GCCTTGTAGGAGTTCGTTTCAAATTACTGGTTTTACCAGCCCGTTACAAAATACTAGCTT 1260
1261 AGCTAGCTCGTTTCAAATTACCGATGATATCGGACCGTTCCAACCTTACCGACCAGTTCGG 1320
1321 CAGGTATGTATTTGCGTGCATTCTTATACAAAAAACATAAGCCAAAAAGCTTGAAAAACT 1380
1381 TATAACGGAACCTAACAGAGTTAGATTATAAAACCCTGCTTTGCTAAGCAGAACGCAAGA 1440
1441 ATTGAATGACTTATAGTCATATCGCTTCGACCCCTCGTAGATTAGTAGTCTTGAGCTATTA 1500
1501 ACTGGTTGAAACACTTAACAAATAAAGATTTAAAGCGATAAAAAATGAAAGATAATACAGC 1560
1561 TAAAAATAGAGATTTTCAGAAAGACTATTTTATCTGCGTTACAACGCAATAAAGATGGCTC 1620
1621 TTTTGCTACGCAAGCAAATAGAAAGTCTATTCTGTTGCAAGCAACTAAAAGACCTTAAAAA 1680

1681 GGTAGGGTTT TAGCAAGGTTACAGCCGAAAACCTTCGGTAATAAGCATTGCTATGCACTTAG 1740
1741 AGACCACTGGAAAGACCAGGGATTAGCCACAGCAACGATAAAAAATCGTTTAGCTTGTTT 1800
1801 AAGGTGGCTAGGCGAGAAAATAGGCAAAGAATTGCCTGATAATCGAAAATTAGAGATTGA 1860
1861 GAATAGAAAGTATAGCGATAATTCGGTAAATAAGGCTCAAGAAATCGATTTTAAGGCGAT 1920
1921 TTCTGCTTTAACTGATAGGCAAGCCCTAGCAATACAGTTACAACGCGAATTCGGGCTTCG 1980
1981 TAGAGAAGAAAGTCTGAAGTTTCAGCCTAGTTATGCAATCAAAGAGCTTAAGATCGAGCT 2040
2041 TAAAAGCTCTTGACAAAAGGGTGAAGACCAAGAGAAATCCCAATCTTGAATGAAAAACA 2100
2101 GAGAGAGTTGTTAGAAAAAGTAAAAGAGGTAGCAGGTAAAGGCTCTCTAATCGAGAGCGA 2160
2161 GAAGACTTATAAGCAAGCATTAGATAGCCTGAAAATAAACACATATAGAGCAGGGGTTAG 2220
2221 GAATATGCACGGTTTTAGGCATGCGTATGCTCAAGACAGATATAGACAATTAACGGGGCG 2280
2281 TGAGTGTCTTAAAAATGGAGGGCTAACATCTAAACAGCTAACACCAGAGCAAAAAGCAGCA 2340
2341 AGATTATGAAGCTAGAATGACTATTAGTGAAGAGTTAGGGCATGGTAGAGAGGATGTAAC 2400
2401 GGTTAATTATTTAGGTAGATAATGTTATCATTGCCCTGTATTAGTGTGGAACACAAAGAG 2460
2461 CTATCCAGATGAGTGACCAACAACAATCTGTTTAGCTCCCCACCTTTTCATAATTTCCA 2520
2521 TTAGAAAAAAGCTATATTTTCAATTCTTTTTTTTTTAGAATCTTAATGCCGATAAAAAAAC 2580
2581 CTAAAAACCCTATAGGGATAAAGTAAACTAAAGAAGCCCCTATAAAAACTTATAAAGTTAA 2640
2641 TCTCTACATTAATGCAGAATAAAAGTAAAATATCCAAATAAAAATAAACAGTGTTAATA 2700
2701 ATGGATAAATTAAGAAATTATAAATGGTATCAAAAATTTTAAATTTAAAAGATTGATTAT 2760
2761 TATTTTTTGTAGACATATTTAGCAAATTCCTTTTTCTATAAAAATACCAGTAACACTCTAGA 2820
2821 CCAAGTGCATATAAACATTTATAAAGCTTTGGGTTATTACTTTTTCAATCTTTGGCTTGCC 2880
2881 ATAAAAGATAATTTAGCCGAACCTAACCTAAGAAAAAGTCATATTCATACCTATGGATGA 2940
2941 TAGAGATGCTATAAATCCTCTAGCTATAACATTTGTAAC TATTCTAGACAGGATAGCCCT 3000
3001 AGTTATTTGATTTACAATATACCCTGTAGATAAAGATCTAATACTATTGTTTACTAATAA 3060
3061 CTTATCAAACCTCTTGTTGATTTTCTTTTTCTAATAAATTTCTATTACAGTTTTAGTAGTTTT 3120
3121 GTATAAAGGGTTACTCTCTGTATAAGAGTTAAAAAGAAATTTAGCAGCTTTCTGAGCTTG 3180
3181 CGGTTTATACCTAGTTTCATAAAACACCTCTTTTTGCTCATCATACATTTTACTAAGAAC 3240
3241 AAAACTAGTTCCTCTAACGGGAGTGAAACTATTTCCAATAATACTGATCTTCCTTGCTC 3300
3301 TTGTAAGGTTTTAATTTCTTCTTTAGACCAGGCACCACTATTGTAAACATTGTTTAAGAG 3360
3361 AAGATCTCCAGGCATAACTAATGCCACCATCAACGGTTTTTTATAACTCCTGAAGTATTG 3420
3421 GTTATATTATTCTCAAAAACCATTTTATAAACTCTAGATGTAGTGTGACTACTCCATCG 3480

3481 GTTTTATCAGCCTCATCCAAAGATACAGAGGTTAAAACCCCCTCTTCTCCAGTATATGTT 3540
3541 TTTATAACCTTATTTCTATTAGATCCAGCTCCTGCAGCTCGACTAGTTCCAACCACTTTA 3600
3601 AGAACAAAATTAGTTATCTTATCTCTACCATTTAGCACATTA AAAACGGATGATATAACT 3660
3661 GGAGCATAAGCCGGTACAGTCACACTAAAATAAAAATAGCATTATTAAGTCCGCCTGTT 3720
3721 TGAGAACTCCAGAAAAAGAATAATGGCTAACCAATATAGCATT TTTCTCCAGCTGAAGCC 3780
3781 GTTGTGTTAGATACACTTTTAGCAACCTCTTTTGTTCACATTTTGGGAAAAATCTTTG 3840
3841 TTATTCTCTGTTTGCATTTTACAGTATATAGGCATCTCAAAACCTCTTTT TAGATTGTTT 3900
3901 AAGTAACTGGCATT CAGTAACTTATATCATGTTTAAATTT CATT TTTCTCTTTTCATTA 3960
3961 ATTTTCATAATTTTATCTCGTTGTTTCGATCATATCTCATCAAATCCAAATGTGTGGTTTT 4020
4021 CCGTTTTCTTCTTGT TTTAGCTTTTTAATCTCTCCTAAAAACAAGGCTTTTTTAGACATCA 4080
4081 ACTTTGCATTATCCCAACTCTTCCAAACAGTATCGCAAACATTTTCTATATCTCGCAATA 4140
4141 AATAATGCTCAAAGATATGTTTACATAGTTTGTATCTAAATCAACTTCATCACTTAAAA 4200
4201 CAATCTCTTTAAGTCTGTCAGAAGCTTCAAAGGTATGAAATCATCTTTTGT TTTAGTGT 4260
4261 TCAGAATCTTGTCAATTTGTTTCGTTTGTGGTTTTAGGTGGTTTTGTTATGAAAAATTGTA 4320
4321 TTTTCCATACTTTACGCCCTGCTTTTATAACATCATAAGTCACAAAAAACTCTGTTAAAG 4380
4381 TGTTTTATTTCTTCTAGTGATTTATGTA AAAA ACTCTCCTTAAAAATGAGAGTATCTTATCT 4440
4441 TGTATGTATCAGGCATAGAAAAGCGATTTATTATTTTCATCTACCTCAAAGTTGCTGGCA 4500
4501 CTATAACCTTATGACTCTCTTGTAAACCATATTCACTTTTAAAGCAATAGATATAAACGAC 4560
4561 CAGAATATTTGCTTTTAAAGCTAAATAAATGCTCTAATTCTGCCTTGGTGTACCTTTGGC 4620
4621 TCAACTCAATTAAGTGGGGCTTTAAAGCCCAATGAAACTCACATATTAAGCACTATTTT 4680
4681 TGGGATCTGCTTTAATGTATGAAAACCAGTTTGCTATTTCTGTTTGTCCATATCTAGCC 4740
4741 ATATAGGTTTTGACATAATTGAATACATTAATTCTTTTAAATCTAACTCGATTGTGCTTAA 4800
4801 CACCTGTAGCTTTTTCTAAATCTGTTATGGAACTCTGTATTTCTTAAAAATCCTCATCAG 4860
4861 AACTGTTTTATTTGAGAAGCCACGAGAAATATCAAATCTGCTCTTCTTTGGTTAAATGAT 4920
4921 ATTTACCAGCAACAAGACTATTTGACATAGCAATTTCTTTTTTATCTTTTATCTCTTTCA 4980
4981 TTTAGCACATTTAAATATCTATTGTGTTGATTGACATATTAAGGTCTTTTAGATAATA 5040
5041 TCAACACAAATATATAGTTATTGTGTTTAAAT 5072

Francisella tularensis est l'agent étiologique de la tularémie, zoonose transmissible à l'Homme par des animaux infectés. Cette bactérie hautement pathogène est classée parmi les agents du risque biologique provoqué en raison de sa transmission par voie respiratoire, de sa faible dose infectieuse, d'un fort taux de létalité et de l'absence de vaccin homologué. Actuellement, peu de données sont connues sur la physiopathologie de la tularémie et sur les mécanismes de virulence de *F. tularensis*. La plupart des études à ce sujet ont été menées chez *F. novicida*, peu pathogène pour l'Homme. Par ailleurs, l'étude de *F. tularensis* a été ralentie par le manque d'outils moléculaires spécifiques. Dans ce travail, nous avons caractérisé chez *F. philomiragia* deux nouveaux plasmides naturels et développé à partir de ceux-ci des vecteurs navettes, utilisables pour la complémentation de mutants et pour le suivi de l'infection *in vitro* et *in vivo*. D'autre part, nous avons développé une méthode de mutagenèse dirigée de *F. tularensis*, qui nous a permis d'obtenir un mutant déficient en phosphatase acide A. L'AcpA, enzyme inhibitrice du stress oxydant des cellules phagocytaires, a été reconnue comme un des facteurs de virulence de *F. novicida* et, par extrapolation, de *F. tularensis*. Pour tester cette hypothèse, nous avons développé un modèle d'infection par voie respiratoire chez la souris. Nous avons ainsi confirmé la faible DL50 de *F. tularensis* et montré que l'AcpA n'est pas impliquée dans sa virulence. L'extrapolation des conclusions de *F. novicida* à *F. tularensis* n'est donc pas justifiée, il s'avère indispensable de disposer de modèles d'études basés sur *F. tularensis*.

Francisella tularensis is the causative agent of tularemia, zoonotic disease transmitted to humans by contact with infected animals. This highly pathogenic bacterium is listed among potential biowarfare agents because of its transmission by the respiratory route, its low infectious dose, a high rate of lethality and the lack of licensed vaccine. Today, few data are available about the pathophysiology of tularemia and about the virulence mechanisms of *F. tularensis*. Most of the studies have been conducted with *F. novicida*, a weak pathogen in humans. Moreover, *F. tularensis* study has been hampered by the lack of specific genetic tools. In this work, we characterised in *F. philomiragia* two new cryptic plasmids and we developed from them several shuttle vectors useful for mutant complementation and for *in vitro* and *in vivo* infection studies. Then, we developed a directed mutagenesis method of *F. tularensis*, allowing us to obtain an acid phosphatase A-defective mutant. The respiratory burst-inhibiting AcpA was recognized as a virulence factor in *F. novicida*, data further extended to *F. tularensis*. To check this hypothesis, we developed a mouse model of infection by the respiratory route. We thus confirmed the low *F. tularensis* LD50 and we showed that AcpA is not involved in *F. tularensis* virulence. Extension of conclusions obtained in *F. novicida* to *F. tularensis* is not valuable, *F. tularensis*-based models appears mandatory.