

Recherche d'un nouveau marqueur de résistance aux fluoroquinolones chez F. tularensis

Claire Siebert

▶ **To cite this version:**

Claire Siebert. Recherche d'un nouveau marqueur de résistance aux fluoroquinolones chez F. tularensis. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01525260

HAL Id: dumas-01525260

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01525260

Submitted on 24 May 2017

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.

UFR de Pharmacie
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES Grenoble Alpes
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
Grenoble INP

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n’a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l’utilisation de ce document.

D’autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2017 N°

Recherche d'un nouveau marqueur de résistance aux fluoroquinolones chez *Francisella tularensis*

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES

D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ÉTAT

par Claire SIEBERT

[Données à caractère personnel]

MÉMOIRE SOUTENU PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le 12/05/2017

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

Monsieur le Professeur Patrice FAURE

Membres :

Madame le Docteur Patricia RENESTO (Directeur de thèse)

Madame le Docteur Sandrine BOISSET (Co-Directeur de thèse)

Madame le Docteur Raphaëlle GERMI

Madame le Docteur Anne DOLEANS-JORDHEIM

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les mémoires ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

UFR de Pharmacie
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Michel SEVE**

Vice-doyen et Directrice des Etudes : **Mme Christine DEMEILLIERS**

Année 2016-2017

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCU	ALDEBERT	Delphine	LAPM - UMR CNRS 5163
PU-PH	ALLENET	Benoit	THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525
PU	BAKRI	Aziz	TIMC-IMAG CNRS UMR 5525
ATER	BARDET	Jean-Didier	
MCU	BATANDIER	Cécile	LBFA - INSERM U1055
MCU-PH	BEDOUCH	Pierrick	THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525
MCU	BELAIDI-CORSAT	Elise	HP2 - INSERM U1042
MAST	BELLET	Béatrice	-
ATER	BOUCHERLE	Benjamin	DPM
DCE	BOULADE	Marine	SyMMES
PU	BOUMENDJEL	Ahcène	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
DCE	BOURDIER	Guillaume	HP2
MCU	BOURGOIN	Sandrine	IAB - CRI INSERM UJF U823
DCE	BOUVET	Raphaël	HP2
MCU	BRETON	Jean	L.C.I.B. - UMR E3 CEA UJF
MCU	BRIANCON-MARJOLLET	Anne	HP2 - INSERM U1042
DCE	BROCCO	Benjamin	ILL
MCU	BUDAYOVA SPANO	Monika	IBS - UMR 5075 CEA CNRS UJF
PU	BURMEISTER	Wim	UVHCI - UMI 3265 UJF EMBL CNRS
MCU-PH	BUSSER	Benoit	IAB - CRI INSERM UJF U823
Professeur émérite	CALOP	Jean	-
MCU	CAVAILLES	Pierre	LAPM – UMR 5163 CNRS UJF
AHU	CHANOINE	Sébastien	THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525
MCU	CHOISNARD	Luc	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
AHU	CHOVELON	Benoit	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU-PH	CORNET	Murielle	THEREX – TIMC IMAG UMR 5525 CNRS UJF
DCE	COUCHET	Morgane	LBFA
PU-PH	DANEL	Vincent	SMUR SAMU
PU	DECOUT	Jean-Luc	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	DELETRAZ- DELPORTE	Martine	Equipe SIS -EAM 4128 UCB
MCU	DEMEILLIERS	Christine	LBFA - INSERM U1055
PU	DROUET	Christian	AGIM - CNRS 3405

Mise à jour le 03 nov.2016

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
PU	DROUET	Emmanuel	UVHCI - UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
MCU	DURMORT - MEUNIER	Claire	I.B.S – UMR 5075 CEA UJF CNRS
PU-PH	FAURE	Patrice	HP2- INSERM U1042
PRCE	FITE	Andrée	-
AHU	GARNAUD	Cécile	THEREX – TIMC IMAG UMR 5525 NCRS UJF
PRAG	GAUCHARD	Pierre-Alexis	-
MCU-PH	GERMI	Raphaëlle	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
MCU	GEZE	Annabelle	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	GILLY	Catherine	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	GODIN-RIBUOT	Diane	HP2- INSERM U1042
PRCE	GOUBIER MATHYS	Laurence	-
Professeure émérite	GRILLOT	Renée	-
MCU	GROSSET	Catherine	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	GUIEU	Valérie	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
AHU	HENNEBIQUE	Aurélie	sous réserve de création de poste
MCU	HININGER-FAVIER	Isabelle	LBFA - Inserm U1055
MCU	JOYEUX-FAURE	Marie	HP2- INSERM U1042
MCU	KHALEF	Nawel	TIMC-IMAG CNRS UMR 5525
MCU	KRIVOBOK	Serge	LCBM, IRTSV CEA
DCE	LE	Cong Anh Khanh	CERMAV
PU	LENORMAND	Jean Luc	THEREX, TIMC-IMAG
DCE	MARILLIER	Mathieu	HP2
PU	MARTIN	Donald	TIMC-IMAG, UMR 5525 UJF CNRS
AHU	MAZET	Roseline	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	MELO DE LIMA	Christelle	L.E.C.A – UMR CNRS 5553
PU	MOINARD	Christophe	LBFA - Inserm U1055
DCE	MONTEMAGNO	Christopher	LRB
ATER	MORAND	Jessica	HP2
PU-PH	MOSSUZ	Pascal	THEREX - TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCU	MOUHAMADOU	Bello	L.E.C.A – UMR CNRS 5553
DCE	MOULIN	Sophie	HP2
DCE	NADER	Serge	LCBM
DCE	NGUYEN	Kim-Anh	DPM
MCU	NICOLLE	Edwige	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	OUKACINE	Farid	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	PERES	Basile	DPM- UJF/CNRS UMR 5063
DCE	PERONNE	Lauralie	IAB
MCU	PEUCHMAUR	Marine	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	PEYRIN	Éric	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	RACHIDI	Walid	L.C.I.B - UMR E3 CEA/UJF
MCU	RAVELET	Corinne	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	RIBUOT	Christophe	HP2- INSERM U1042

Mise à jour le 03 nov.2016

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
PAST	RIEU	Isabelle	-
Professeure émérite	ROUSSEL	Anne -Marie	-
PU-PH	SEVE	Michel	CR INSERM / UJF U823 Institut Albert Bonniot
MCU	SOUARD	Florence	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
DCE	TAHER	Raleb	IBS
ATER	TAHMASEBI	Faezeh	TIMC-IM2AG
MCU	TARBOURIECH	Nicolas	UVHCI, UMR 3265 UJF-EMBL- CNRS
DCE	TODOROV	Zlatomir	BCI
PAST	TROUILLER	Patrice	-
DCE	VACHEZ	Yvan	CRI-GIN
MCU	VANHAVERBEKE	Cécile	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
DCE	VERNET	Céline	CRI-IAB
DCE	VRAGNIAU	Charles	UVHCI
PU	WOUESSIDJEWE	Denis	DPM –UMR 5063 UJF CNRS

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
CRI : Centre de Recherche INSERM
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
DCE : Doctorants Contractuels Enseignement
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire et de Cognition et Ontogenèse »
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot,
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Roget
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques

MCU : Maitre de Conférences des Universités
MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
PU : Professeur des Universités
PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
UMR: Unité Mixte de Recherche
UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

Mise à jour le 03 nov.2016

Remerciements

A Monsieur le Professeur Patrice Faure,

Merci pour l'intérêt que vous portez à ce travail en me faisant l'honneur de présider le jury de Thèse.

A Madame le Docteur Patricia Renesto,

Qui a largement inspiré ce travail et m'a donné le goût de la recherche. C'est un vrai plaisir de travailler avec toi. Je peux apprécier tous les jours tes connaissances scientifiques et tes conseils avisés. Je t'en remercie infiniment.

A Madame le Docteur Sandrine Boisset,

Qui m'a fait confiance en m'accueillant et en m'encourageant dans ma démarche de faire de la recherche en bactériologie. Un grand merci pour ton encadrement et ton aide depuis le début de mon internat.

A Madame le Docteur Raphaëlle Germi,

Merci pour vos conseils en tant que tuteur, je vous suis reconnaissante d'accepter de juger ce travail.

A Madame le Docteur Anne Doleans-Jordheim,

Vous avez mobilisé votre temps pour juger ce travail. Je vous en remercie sincèrement.

Aux membres du laboratoire,

Merci pour nos échanges au quotidien, votre bonne humeur, et vos conseils.

A Madame le Docteur Corinne Villers,

Merci pour ton aide précieuse et ta présence chaleureuse.

A mes parents,

Merci pour votre soutien infaillible tout au long de mon parcours. Vous êtes des parents formidables.

A mes amis,

Merci pour tous ces bons moments partagés ensemble. Vous avez toujours été là quand j'en avais besoin.

A Julien,

Merci d'être là, le meilleur est à venir.

Table des matières

Table des illustrations 10
Abreviations 11

Avant-propos 12

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES 14
I- LE GENRE *FRANCISELLA* 16
I-1. Contexte historique 16
I-2. Taxonomie 16
I-3. *Francisella tularensis* : un agent potentiel de bioterrorisme 19
I-4. Caractères phénotypiques et génotypiques de la bactérie 20
II- LA TULAREMIE 21
II-1. Epidémiologie 21
II-2. Modes de contamination 22
II-3. Diagnostic clinique et biologique 23
II-4. Traitement 26
II-5. Sensibilité aux antibiotiques 28
III- LES FLUOROQUINOLONES 29
III-1.Structure 29
III-2. Spectre d'action 30
III-3. Mécanisme d'action 30
III-4. Mécanisme de résistance 31
IV- LA PROTEINE FUPA/B 33

OBJECTIFS 36

MATERIELS ET METHODES 40
I- SOUCHES, PLASMIDES ET CONDITIONS DE CULTURE 42
I-1. Souches bactériennes et plasmides 42
I-2. Souches cliniques 43
II- CLONAGE 43
II-1. Construction du plasmide pMP812-Δ*fupA/B* 43
II-2. Construction du plasmide pMP828-*fupA/B* 44
II-3. Clonage de la région N-terminale de *fupA/B* dans un vecteur d'expression procaryote par la Technique de clonage Gateway® 45
III-TRANSFORMATION DES BACTERIES 47
III-1. Electroporation 47

III-2. Transformation par choc thermique 47
IV- CONSTRUCTION DU LA SOUCHE LVS Δ*FUPA/B* 48
V- EVALUATION DES CMI 49
VI- EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA PROTEINE RECOMBINANTE 49
VI-1. Expression de la région N-terminale de FupA/B 49
VI-2. Purification de la région N-terminale de FupA/B 49
VII- PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX ANTI-FUPA/B 50
VI-1. Protocole d'immunisation 50
VI-2. Western blot 51

RESULTATS 52
I- PRODUCTION D'ANTICORPS ANTI -FUPA/B 54
I-1. Clonage de la région N-terminale de FupA/B 54
I-2. Purification de la protéine recombinante 54
II- REACTIVITE DES ANTICORPS ANTI-FUPA/B EVALUEE PAR WESTERN BLOT 55
II-1. Réactivité des anticorps contre la protéine FupA/B recombinante 55
II-2. Reconnaissance de la protéine dans différentes souches de *Francisella* 56
III- Implication de FupA/B dans la résistance aux FQ 56
III-1. Sélection des clones d'évolution 56
III-2. Complémentation des mutants *fupA/B* par le gène *fupA/B* sauvage 57
III-3. Evaluation des CMI après complémentation *fupA/B* 58
III-4. Construction de LVS-Δ*fupA/B* 59
III-5. Evaluation des CMI après complémentation de LVS-Δ*fupA/B* 60
IV- ANALYSE DE L'EXPRESSION DE FUPA DANS DES ISOLATS CLINIQUES 61
IV-1. Analyse de l'expression de la protéine par WB 61
IV-2. Analyse de la séquence du gène *fupA* à partir de prélèvements biologiques 62

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 64

CONCLUSION 70

BIBLIOGRAPHIE 74

ANNEXES 80

Table des illustrations

Listes des Figures

Figure 1. Arbre phylogénétique de 16 espèces de γ-protéobactéries 17
Figure 2. Aspect phénotypique de *F. tularensis subsp holarctica* 21
Figure 3. Ulcère d'inoculation et tularémie ganglionnaire 23
Figure 4. Distribution des formes cliniques parmi les cas de tularémie déclarés en France de 2002 à 2012 selon l'InVS 24
Figure 5. Structure commune aux quinolones et fluoroquinolones 29
Figure 6. Modélisation de la structure de l'ADN gyrase de *F. tularensis* 31
Figure 7. Représentation schématique du gène *fupA/B* de la souche LVS 33
Figure 8. Construction du plasmide pMP812-Δ*fupA/B* 44
Figure 9. Construction du plasmide pMP828-*fupA/B* 45
Figure 10. Principe de la technique de Clonage Gateway™ 46
Figure 11. Choix des amorces pour le clonage de la région N-terminale de FupA/B dans un vecteur d'expression 46
Figure 12. Conception du mutant LVSΔ*fupA/B* 48
Figure 13. Protocole d'immunisation pour la production d'anticorps anti-FupA/B 50
Figure 14. Contrôle par PCR de la seconde recombinaison dans pDEST17 54
Figure 15. Purification la région N terminale de FupA/B 55
Figure 16. Reconnaissance de la protéine FupA ou FupA/B chez différentes souches de *Francisella* 56
Figure 17. Contrôle de la construction du plasmide pMP828-*fupA/B* 57
Figure 18. CMI des mutants d'évolution 59
Figure 19. Construction de la souche LVSΔ*fupA/B* 60
Figure 20. CMI du mutant LVSΔ*fupA/B* 61
Figure 21. Expression de FupA chez différentes souches cliniques de *F. tularensis* de Type B 61

Liste des Tableaux

Tableau 1. Taxonomie des *Francisella* 16
Tableau 2. Classification de *F. tularensis* 17
Tableau 3. CMI (mg/l) de différents antibiotiques vis à vis de *F. tularensis* 28
Tableau 4. Principales quinolones et spectre d'action 30
Tableau 5. Souches bactériennes et plasmides utilisés lors de l'étude 42
Tableau 6. Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des mutants de *F. tularensis* sélectionnés 57

Abreviations

AA	Acide Aminé
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
CDC	Centers for Disease Control
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CNR	Centre National de Référence
DO	Densité Optique
ECL	Enhanced ChemiLuminescence
FDA	Food and Drug Administration
FQ	Fluoroquinolone
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HRP	HorseRadish Peroxydase
InVs	Institut national de Veille sanitaire
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
LB	Luria Bertani
LVS	Live Vaccine Strain
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight
MCS	multicloning site
MDO	Maladie à Déclaration Obligatoire
MHPV	Mueller Hinton + PolyViteX
Min	minute
NSB2-3	Niveau Sécurité Biologique (2 ou 3)
nt	nucléotide
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
pb	paire de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
QBP	Quinolone Binding Pocket
QRDR	Quinolone Resistance Determining Region
rpm	rotation par minute
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TEV	Tobacco Etch Virus
WB	Western Blot

Avant-propos

Francisella tularensis, agent étiologique de la tularémie, est une bactérie coccobacille à Gram négatif intracellulaire facultative, hautement pathogène chez l'homme. Il existe 6 formes cliniques de la maladie dont la forme pulmonaire qui entraine 30% de mortalité en l'absence de traitement adapté. Ce micro-organisme est hautement infectieux dans la mesure où l'inhalation de 10 bactéries suffit à entrainer la maladie. Ces critères de pathogénicité et de virulence justifient son classement comme agent du bioterrorisme de classe A par le CDC.

Les données microbiologiques et cliniques indiquent que les fluoroquinolones (FQ) représentent la meilleure alternative pour traiter la tularémie. Toutefois, l'utilisation excessive des FQ au cours des deux dernières décennies est à l'origine d'une augmentation de la prévalence des bactéries résistantes. Par ailleurs, des échecs thérapeutiques ainsi que des rechutes sont observés dans 5 à 10% des cas malgré un traitement adapté. L'évolution vers un haut niveau de résistance aux FQ pourrait expliquer ce taux élevé de rechute chez *Francisella sp.* C'est pourquoi la compréhension des mécanismes d'acquisition des résistances aux FQ est d'un intérêt majeur.

Afin de mieux comprendre l'acquisition de la résistance aux FQ chez les bactéries du genre *Francisella*, un protocole d'évolution expérimentale été réalisé au laboratoire à partir de 3 souches de référence : *Francisella tularensis subsp holarctica* LVS (live vaccine strain: souche de virulence atténuée), *F. novicida* et *F. philomiragia*. Ceci a permis d'obtenir des clones de haut niveau de résistance aux FQ dont l'étude phénotypique et génotypique a été réalisée à partir des mutants intermédiaires et terminaux. Outre les mutations attendues au niveau des cibles des FQ que sont les ADN gyrases, il a été observé que l'exposition aux antibiotiques induisait des mutations non-sens au niveau du gène *fupA/B* codant la protéine FupA/B dans 80% des souches LVS résistantes. L'apparition de ces mutations qui sont précédées par les mutations sur l'ADN gyrase sont accompagnées d'une augmentation modérée mais significative de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des FQ. FupA/B (Fer-Utilization Protein) est une protéine exclusive aux bactéries du genre *Francisella* impliquée dans l'acquisition du fer sidérophore-dépendante et dont le rôle dans la virulence bactérienne a été suggéré. En revanche, la contribution possible de FupA/B dans la résistance aux FQ n'a jamais été rapportée.

L'objectif de mon travail de Thèse a été de rechercher un lien entre la protéine FupA/B et la résistance aux FQ par une combinaison d'approches biochimiques et génétiques. L'expression de FupA, protéine homologue à FupA/B dans les souches cliniques a ensuite été analysée.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I- LE GENRE *FRANCISELLA*

I-1. Contexte historique

La bactérie *Francisella tularensis* a été décrite en tant que pathogène humain au début des années 1900. Divers cas d'infections animales s'apparentant à la tularémie avaient été rapportés aux Etats-Unis en 1908, en Norvège en 1890 ou encore au Japon en 1818 (1). Cependant, ce n'est qu'en 1911 que le premier cas réel de tularémie fût décrit par McCoy et Chapin chez des écureuils atteints de « pseudo peste » en Californie, dans le comté de Tulare (2). La souche fût isolée en 1912 par Edward Francis, qui la nomma *Bacterium tularense*, en rapport avec le lieu de sa découverte. C'est en son honneur qu'on la nomma ensuite *Francisella tularensis*. Chez l'homme, le premier cas fût rapporté en Ohio, en 1914 (3). C'est en 1983 qu'E. Francis nommera l'infection à *F. tularensis*: la Tularémie (4).

I-2. Taxonomie

Le Tableau 1 ci-dessous illustre la position taxonomique des bactéries du genre *Francisella.*

Tableau 1. Taxonomie des *Francisella*

Domaine	Bactérie
Embranchement	Protéobactérie
Classe	Gammaprotéobactérie
Ordre	*Thiotrichales*
Famille	*Francisellaceae*
Genre	*Francisella*

La position taxonomique des bactéries du genre *Francisella* est complexe et a longtemps été discutée. Dans les années 1920, et sur la base d'études sérologiques, la bactérie a d'abord été considérée comme appartenant au genre *Pasteurella* puis provisoirement au genre *Brucella* (5). En 1966, les résultats d'hybridation ADN-ADN ont montré que la bactérie n'était en fait pas reliée au genre *Pasteurella* (6). Ceci a confirmé la proposition faite par Dorofe've de classer les bactéries dans un nouveau genre *Francisella*, unique membre de la famille des *Francisellaceae* (7). Ultérieurement, l'analyse de l'ARN 16S proposé par Woese a permis de situer ces bactéries dans la classe des Gamma-proteobactéries (8). Les résultats montrent que l'organisme le plus proche de *F. tularensis* est la bactérie intracellulaire *Wolbachia persica,* endosymbiote des arthropodes et que *F. tularensis* possède un ancêtre commun avec les pathogènes humains *Coxiella burnetti* et

Legionella (9). En 2005, l'analyse phylogénétique basée sur l'alignement de dix protéines de 16 gamma-protéobactéries dont *F. tularensis* a montré que celle-ci était la lignée la plus profondément divergente au sein de cette classe (Figure 1) (10).

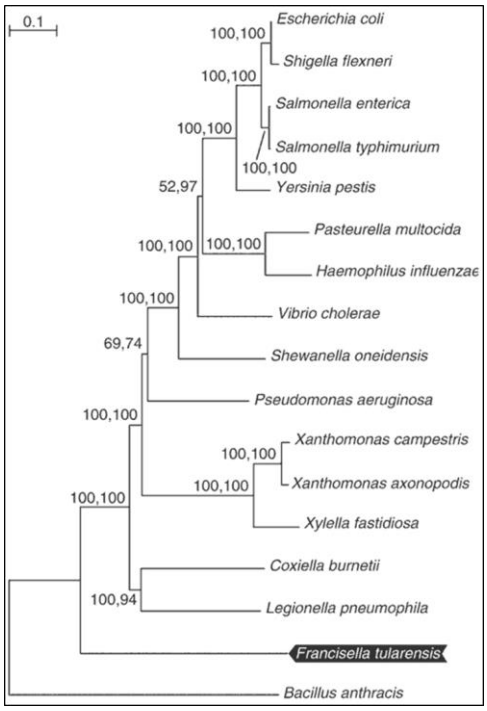


Figure 1. Arbre phylogénétique de 16 espèces de γ-protéobactéries basé sur l'alignement de 10 protéines (Larsson et al. 2005)

On dénombre trois espèces principales de *Francisella* qui sont *F. tularensis*, *F. novicida* et *F. philomiragia* et dont les caractéristiques sont rapportées dans le Tableau 2.

Tableau 2. Classification de *F. tularensis*

Espèce	**Sous-espèce**	**Biovar**	**Localisation Géographique**	**Virulence chez l'homme**
F. tularensis	*tularensis (TypeA)*		Amérique du nord	+++
	holarctica (TypeB)	Biovar I (Ery^S)	Hémisphère Nord	++
		Biovar II (Ery^R)	Hémisphère Nord	
		Biovar *japonica*	Japon	
	mediasiatica		Asie Centrale	++
F. novicida			Amérique du nord, Australie	-
F. philomiragia			Hémisphère nord	-

L'espèce *F. tularensis* est elle-même divisée en 3 sous-espèces : *tularensis* (Type A), *holarctica* (Type B) et *mediasiatica* selon des critères épidémiologique, biochimique, génomique, géographique et de virulence (11). Les sous-espèces *tularensis* et *holarctica* sont responsables des cas de tularémie dans le monde. Elles ont été caractérisées en 1959 par Olsufiev *et al* qui ont montré qu'il existait différents niveaux de virulence des souches en fonction de leur localisation géographique (12). Les souches de Type A sont majoritairement retrouvées en Amérique du Nord. Quelques isolats ont également été identifiés dans l'environnement et dans des arthropodes en Slovaquie et en Autriche (13). Ces souches sont hautement virulentes, seulement 10 bactéries pouvant entrainer l'infection et à l'origine d'une forme sévère de la maladie. Les souches de Type B, moins virulentes, sont présentes dans tout l'hémisphère nord et sont responsables des cas de tularémie en Europe. La sous-espèce *holarctica* est classiquement divisée en 3 biovars : biovar I dont les souches sont sensibles à l'érythromycine, biovar II dont les souches sont résistantes à l'érythromycine et le biovar *japonica* dont les souches sont majoritairement retrouvées au Japon (14). Les souches cliniques que nous avons étudiées appartiennent à cette sous-espèce et au biovar I. *F. tularensis subsp mediasiatica* a été isolée en Asie centrale et sa virulence est comparable à celle de la sous-espèce *holarctica* (15).

Au début du XXème siècle, l'incidence de la maladie en Russie a conduit au développement de vaccins contre la tularémie, vaccins basés sur l'utilisation de souches vivantes atténuées. En 1956, un de ces vaccins vivants atténués a été exporté aux Etats-Unis où la bactérie a été isolée et a été nommée *F. tularensis subsp holarctica* LVS pour « Live Vaccine Strain » (16). La vaccination par la souche LVS diminuait l'incidence de la tularémie pulmonaire mais n'avait pas d'effet sur la tularémie ulcéro-ganglionnaire (17). Cette souche qui ne protège pas tous les individus n'est aujourd'hui plus utilisée comme vaccin aux Etats-Unis (1). Les mutations conduisant à son atténuation n'ont pas été entièrement caractérisées, bien que récemment, la réintroduction des gènes inactivés *pilA* et FTT_0918 a permis de restaurer la virulence de LVS au niveau de celle des souches virulentes de Type B (18). Actuellement, la souche LVS est largement utilisée comme modèle expérimental car les règles de sécurité pour sa manipulation sont beaucoup moins drastiques. Elle est manipulée en laboratoire NSB2.

C'est en 1950, que *F. novicida* a été isolée à partir d'eau de la baie d'Ogden en Utah. Cette souche morphologiquement identique à *F. tularensis*, fermente le sucrose et est non pathogène chez l'homme. Elle présente environ 97% d'identité nucléotidique avec la souche *F. tularensis* (19). Du

fait de ces caractéristiques communes, sa classification en tant qu'espèce et non sous-espèce reste controversée (20). Elle est la souche la plus utilisée en recherche dans les laboratoires.

La troisième espèce de *Francisella* est assez peu décrite dans la littérature. *F. philomiragia* initialement appelée *Yersinia philomiragia* a été isolée pour la première fois en 1959 à partir d'un rat musqué en Utah et l'année suivante à partir de 4 échantillons de prélèvements d'eau (21). Sur la base de caractéristiques biochimiques, d'hybridation ADN-ADN et de l'analyse de la composition en acide gras de la paroi bactérienne, elle fut reclassée dans le genre *Francisella* en 1989 (22).

Depuis les dix dernières années, la diversité du genre *Francisella* a significativement évoluée. Aux espèces majeures connues, soient *F. tularensis*, *F. novicida* et *F. philomiragia*, se sont ajoutées *F. noatunensis* isolée en Norvège sur des morues d'élevage malades (Ottem et al., 2009), *F. hispaniensis* isolée à partir de sang humain (Huber et al., 2010), *F. piscicida* responsable d'infections graves chez le cabillaud (23), *F. haliaticida* souche pathogène d'ormeaux géants du Japon (24) et enfin *F. guangzhouensis* isolée dans les systèmes d'air conditionnés en Chine (25). Très récemment, quatre autres nouvelles espèces ont été décrites dont trois proviennent d'échantillons environnementaux : *F. salina, F. uliginis, F. frigiturris*. La quatrième espèce a été isolée chez un patient immunodéprimé : *F. opportunistica* qui est décrite comme une souche opportuniste capable d'infecter ce type de patients (11).

I-3. *Francisella tularensis* : un agent potentiel de bioterrorisme

Du fait de leurs caractéristiques, les sous-espèces de Type A et B sont considérées comme des agents du bioterrorisme, classées catégorie A par le CDC (Centers for Disease Control) comme c'est le cas de *Bacillus anthracis, Clostridium botulinum, Yersinia pestis, Variola* et les *Filovirus* (*Ebola, Marburg*) et *Arénavirus* (*Lassa, Machupo*).

En effet, les souches présentent un fort potentiel infectieux chez l'homme (<10 bactéries), sont facilement isolables à partir du réservoir animal et persistent au sein de l'environnement. Elles peuvent être aérosolisées et entraîner des cas graves de tularémie pulmonaire dont l'issue peut être fatale. De plus, comme nous l'avons évoqué ci-dessus, il n'existe pas de vaccin efficace contre la maladie et peu d'antibiotiques sont actifs contre ces bactéries pour lesquelles la construction de souches résistantes est largement envisageable. La propagation intentionnelle d'aérosols infectieux pourrait être à l'origine de nombreux cas de pneumonies associés à un fort taux de

mortalité en l'absence de traitement (>30%). Selon un comité d'expert de l'OMS, la dispersion par aérosols de 50 kg de bactéries virulentes sur une ville de 5 millions d'habitants pourrait entrainer 250 000 victimes dont 19 000 décès (26,27).

Dans le contexte de la préparation à la réponse contre une éventuelle action malveillante (plan de prévention des risques nucléaires, radiologiques, biologiques et chimiques (NRBC)), la surveillance nationale de la tularémie a été mise en place en France en 2002. La tularémie est ainsi devenue une maladie à déclaration obligatoire (MDO) et un Centre National de Référence (CNR) a été créé afin d'analyser les sérums et de caractériser les souches de *Francisell*a isolées à partir de patients infectés. Le CNR *Francisella* se trouve au sein du laboratoire de bactériologie du CHU de Grenoble dirigé par le Pr Max Maurin.

I-4. Caractères phénotypiques et génotypiques de la bactérie

F. tularensis est une bactérie coccobacille à Gram négatif immobile, aérobie stricte, non sporulée et de petite taille (0,2 µm de large, 0,2 à 0,7 µm de long) (Figure 2A). Cette bactérie intracellulaire facultative est entourée d'une capsule pour les souches virulentes. Les lipides de la paroi sont, pour une bactérie à Gram-négatif, en proportions inhabituelles (70 %), la nature des acides gras étant particulière à ce genre bactérien. L'activité catalase est faiblement positive et celles de l'oxydase et de l'uréase négatives.

Il s'agit d'une bactérie exigeante dont la culture est fastidieuse et requiert des milieux de culture enrichis, notamment en L-cystéine. En ce qui concerne les milieux solides, on utilise les géloses « chocolat » enrichies en vitamines « PolyViteX » (BioMérieux®) et les géloses « Mueller-Hinton modifiées » (glucose 0,1%, L-cystéine 0,1%, pyrophosphate de fer 0,025%). Pour les milieux liquides, on distingue le milieu Chamberlain, le bouillon Mueller-Hinton modifié et le bouillon « Schaedler K3 » (BioMérieux®). Les bactéries poussent de manière optimale à 37°C sous 5% de CO_2. Les colonies présentent un aspect nacré et glaireux avec une absence d'hémolyse et apparaissent en 48 heures (Figure 2B).

Le premier génome de *Francisella* a été séquencé en 2005 (10). Il s'agit du génome de la souche *F. tularensis subsp tularensis* Schu S4 qui est hautement virulente pour l'homme. Le chromosome circulaire est de petite taille (1,89 millions de paires de bases) et pauvre en guanine et cytosine (32,9%). Actuellement, on compte une centaine de génomes de *F. tularensis* dans les banques de données (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/511).

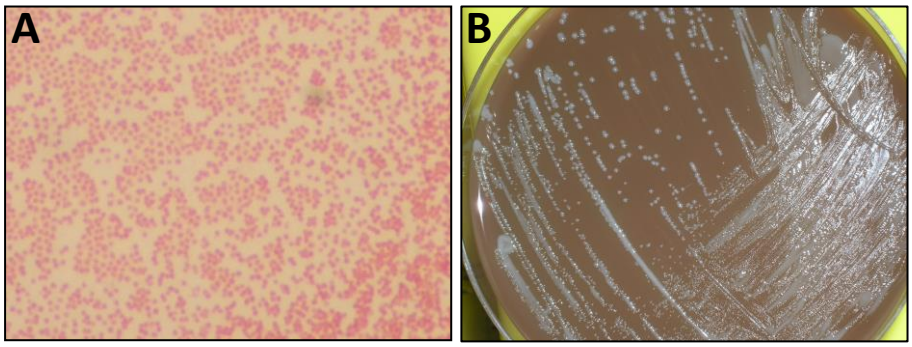


Figure 2. Aspect phénotypique de *F. tularensis subsp holarctica*
A. Coloration de Gram : petit coccobacille à Gram-négatif
B. Colonies nacrées sur gélose chocolat supplémentées en « PolyViteX »

II- LA TULAREMIE

II-1. Epidémiologie

II-1.1.Niche écologique

La tularémie est une zoonose responsable d'infections aiguës chez de nombreuses espèces animales hôtes. La bactérie est préférentiellement retrouvée chez les lagomorphes et rongeurs incluant les campagnols, les écureuils et les castors (28). Des cas d'infections d'animaux domestiques comme le chat ont également été rapportés aux Etats-Unis (29). Les arthropodes dont les tiques, les moustiques et les mouches peuvent être infectés par les animaux ou l'eau contaminés et ainsi transmettre la bactérie à l'homme ou l'animal par morsure (30,31).

Des analyses par PCR en temps réel (polymerase chain reaction) d'échantillons d'eau et de sédiments recueillis en Suède ont démontré la présence de la souche *F. tularensis subsp holarctica* ce qui suggère que la bactérie persiste dans l'environnement (32). Par ailleurs il a été montré que *F. tularensis* était capable de se multiplier à l'intérieur des amibes *Acanthamoeba* (33) ce qui pourrait expliquer ce mécanisme de persistance.

Ainsi, la survie de la bactérie dans la nature implique l'existence d'un cycle dans lequel les mammifères hôtes permettent l'amplification de la souche et les arthropodes sa vectorisation à l'homme ou d'autres espèces animales.

II-1.2. Distribution géographique de la tularémie

La tularémie sévit principalement dans les pays de l'hémisphère nord et de rares cas sporadiques ont été rapportés dans l'hémisphère sud. Des zones d'endémies ont été décrites en Russie, Finlande et Suède (34). En Europe, la majorité des cas surviennent dans la partie Est du continent.

Des épidémies à l'origine de centaines de cas ont eu lieu au Portugal, en Suède mais également en Espagne (35). Aux Etats-Unis, 126 cas ont été déclarés en moyenne par an de 2000 à 2010, selon le CDC. Plus de 50% de ces cas ont été enregistrés en Arkansas, Missouri, Dakota du Sud et Oklahoma.

II-1.3. Données épidémiologiques en France (Données CNR)

En France, du 1er octobre 2002 au 31 décembre 2012, 433 cas de tularémie ont été diagnostiqués et déclarés, soit une incidence annuelle moyenne de 0,07 cas pour 100000 habitants. Parmi les 433 cas déclarés, 395 étaient des cas sporadiques et 39 (9%) appartenaient à 10 épisodes de cas groupés. Un pic épidémique a été enregistré (environ 2 fois et demi le nombre moyen annuel de cas) durant l'hiver 2007/2008. Cette épidémie s'est produite de manière concomitante à l'augmentation du nombre de cas mis en évidence chez le lièvre (36). Environ 60% des cas déclarés ont été expertisés par le CNR *Francisella* pour confirmation du diagnostic et recherche d'éventuelles résistances aux antibiotiques.

Entre 2012 et 2015, le CNR *Francisella* a expertisé 1113 dossiers de patients suspectés de tularémie. Le diagnostic a été confirmé pour 112 d'entre eux, dont 83 hommes et 29 femmes (sexe ratio : 2,8), d'âge moyen 50,9 ans (extrêmes, 3 ans à 88 ans). La majorité des cas sont survenus de manière sporadique et sur le territoire de France métropolitaine. Quelques cas groupés sont survenus après consommation d'aliments contaminés notamment des lièvres. Outre son rôle d'expertise, la mission du CNR est d'assurer la caractérisation et le stockage des souches de *Francisella*. Cette collection de souches a servi de base de travail pour les travaux décrits dans cette thèse.

II-2. Modes de contamination

La tularémie est une zoonose qui peut être transmise de l'animal à l'homme. La contamination intervient de manière directe ou indirecte. La transmission directe peut se faire par voie cutanéo-muqueuse lors de la manipulation d'animaux infectés (spécialement les lièvres), par voie digestive après ingestion d'aliments ou d'eau contaminés ou encore par voie respiratoire *via* l'inhalation d'aérosols lors de la manipulation d'animaux infectés ou à l'occasion de jardinage sur un terrain contaminé. La transmission indirecte vectorielle repose essentiellement sur des morsures de tiques ou piqûres de moustiques. Les personnes les plus touchées sont les chasseurs, fermiers et personnels de laboratoire. La transmission d'homme à homme n'a jamais été documentée (14).

II-3. Diagnostic clinique et biologique

II-3.1. Formes cliniques

Le diagnostic est difficile à établir d'autant que la maladie est rare en France et les signes cliniques peu évocateurs. En France, seule la souche de Type B de virulence modérée est retrouvée. La symptomatologie est très protéiforme, le plus souvent il s'agira d'un état grippal. C'est pourquoi, le contexte épidémiologique est d'une importance capitale pour orienter les cliniciens.

La tularémie se manifeste après une période d'incubation de 3 à 5 jours par un syndrome pseudo-grippal se traduisant par les signes cliniques suivants : fièvre, maux de têtes, myalgies et arthralgies. Il existe six formes cliniques majeures de la pathologie qui dépendent de la porte d'entrée de la bactérie (1,14). Ces formes sont décrites ci-dessous.

- *Formes ulcéro-ganglionnaire et ganglionnaire*

La transmission se fait par voie cutanée au niveau de la peau et des muqueuses. Elle se manifeste par l'apparition d'un ulcère cutané d'inoculation (Figure 3A), associé à des adénopathies se situant sur le territoire de drainage de la lésion. La forme ganglionnaire pure est dépourvue de lésions initiales (Figure 3B).

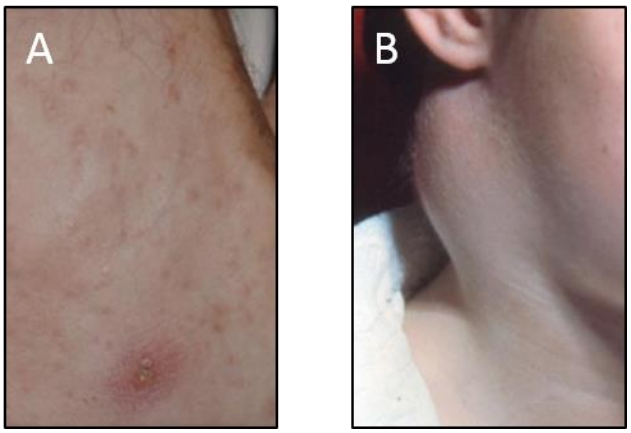


Figure 3. Ulcère d'inoculation et tularémie ganglionnaire

Ces formes sont les plus fréquentes, en France elles représentent 72% des cas déclarés de 2002 à 2012 selon l'Institut national de Veille Sanitaire (InVS) (Figure 4). Entre 2012 à 2015, sur les 112 patients répertoriés par le CNR, 70 cas correspondaient à une forme ganglionnaire ou ulcéro-ganglionnaire.

- *Forme pharyngo-ganglionnaire*

Elle survient après ingestion d'eau ou d'aliments contaminés et se traduit par une pharyngite chronique s'accompagnant parfois d'ulcères muqueux associés à des ganglions lymphatiques cervicaux gonflés et douloureux.

- *Forme oculo-ganglionnaire de Parinaud*

C'est une forme rare (5% des cas) qui se manifeste par une conjonctivite unilatérale très douloureuse accompagnée d'adénopathies localisées.

- *Forme pulmonaire*

Cette forme clinique rare survient après inhalation d'aérosols infectés ou dissémination hématogène de la bactérie à partir d'une autre forme clinique. L'inhalation de 10 bactéries peut suffire à entraîner la maladie. Elle se manifeste par une pneumonie aiguë ou chronique. L'atteinte respiratoire fait partie des signes de gravité de la maladie et peut mettre en jeu le pronostic vital, avec possibilité de syndrome de détresse respiratoire. En cas d'absence de traitement adapté, le taux de mortalité peut atteindre 30% dans le cas d'infection avec le biotype A.

- *Forme typhoïdique*

Il s'agit d'une forme septicémique qui peut être associée à une forme digestive. Elle se traduit par une fièvre avec prostration et perte de poids.

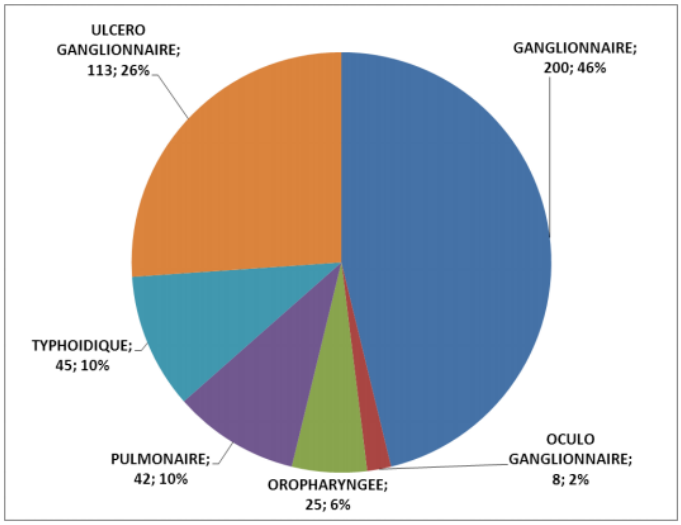


Figure 4. Distribution des formes cliniques parmi les cas de tularémie déclarés en France de 2002 à 2012 selon l'InVS
(Mailles and Vaillant, 2014)

II-3.2. Diagnostic biologique

Le diagnostic biologique repose essentiellement sur la sérologie et la biologie moléculaire.

- **Culture**

F. tularensis est une bactérie exigeante dont la culture est fastidieuse. Sa croissance requiert un milieu riche complémenté en cystéine ou avec un milieu nutritif (PolyViteX) et une incubation à 37°C en présence de 5% de CO_2 (cf. § I-4) pendant 24 à 48 heures.

Cette bactérie peut être isolée (< 10 % des cas) à partir de prélèvements ganglionnaires, cutanés, conjonctivaux, oropharyngés ou sanguins. L'utilisation d'antibiotiques sélectifs dans les milieux et la diminution de délais entre le prélèvement et la mise en culture pourraient favoriser son isolement. Il est important de souligner que *F. tularensis* étant hautement virulente, sa manipulation doit être effectuée dans un laboratoire de niveau de sécurité microbiologique de niveau 3 (14,37).

Au CNR *Francisella*, 13 souches ont été isolées à partir de prélèvements humains au cours de l'année 2016.

- **Spectrométrie de masse: MALDI-TOF**

L'identification rapide et à bas coût des sous-espèces de bactérie du genre *Francisella* peut aujourd'hui être réalisée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (38). Cette technique requiert cependant d'isoler au préalable la souche, ce qui n'est pas très fréquent ainsi que nous venons de l'indiquer. Pour des raisons de sécurité, la souche doit être inactivée avant la réalisation du dépôt sur la plaque de MALDI-TOF, l'automate étant généralement situé à l'extérieur du laboratoire P3.

- **Sérologie**

Les tests sérologiques sont effectués en première intention. Il s'agit de mettre en évidence les anticorps (IgM et IgG) dirigés contre la bactérie présents dans le sérum des patients par une technique d'immunofluorescence indirecte et une technique de séroagglutination (micro et macroagglutination) sur plaque, qui sont les techniques les plus fréquemment utilisées notamment au CNR. La souche LVS de virulence atténuée est généralement utilisée pour préparer l'antigène qui sert de témoin positif. Les anticorps sont détectables environ 1 à 2 semaines après la survenue des premiers signes cliniques, atteignent un taux maximal en 3 à 4 semaines puis diminuent progressivement. Le seuil significatif est de 1:160 en macroagglutination et 1:128 en microagglutination. Le diagnostic est confirmé dès lors que l'on observe une séroconversion ou une multiplication par 4 au moins des titres sérologiques sur deux sérums prélevés à 15 jours

d'intervalle (39). Les résultats de sérologie sont spécifiques malgré des réactions croisées avec les bactéries du genre *Brucella* par exemple.

- **Biologie moléculaire: PCR**

Les techniques de biologie moléculaire sont essentielles pour établir le diagnostic d'infection à *F. tularensis*. La PCR basée sur l'amplification de séquences spécifiques du génome bactérien présente deux avantages : elle peut être réalisée à partir de prélèvements cliniques (sang, lésions cutanées, biopsies ganglionnaires…) ne nécessitant pas l'isolement de la bactérie et de faibles quantités de l'agent infectieux peuvent être détectées. Les gènes ciblés pour l'identification du genre *Francisella* sont :

- *ISFtu2* : séquence d'insertion (40)
- Un gène codant une protéine de 23 kDa (41)
- *tul4* : code une protéine de surface (42)
- *fopA* : code une protéine de la membrane externe (43)
- *lpnA* : code une lipoprotéine (44)

La séquence d'insertion *ISFtu2* est utilisée pour discriminer les espèces. Le séquençage de la région inter-génique de l'ARN 16S-23S permet de différencier les sous-espèces (45).

Des études cliniques ont montré l'intérêt de la PCR dans le diagnostic de la tularémie ulcéroganglionnaire (46). De plus, pour améliorer la détection de *Francisella* dans les échantillons complexes, Versage *et al*. ont développé une PCR multiplexe ciblant *ISFtu2*, le gène codant la protéine de 23 kDa et *tul4* (47). Leurs résultats montrent que la technique est plus sensible que la culture.

Le CNR utilise la PCR ciblant la séquence d'insertion *ISFtu*2 pour réaliser le diagnostic de la tularémie à partir des prélèvements cliniques. En cas de réponse positive, une seconde PCR en temps réel permet de vérifier l'appartenance de la bactérie au Type B. Cette PCR cible une jonction entre *ISFtu*2 et une région flanquante en 3' (GenBank AY06) (48).

II-4. Traitement

Malgré de nombreux progrès dans le diagnostic et la prise en charge de la maladie, l'issue de la tularémie de Type A peut encore être fatale. La tularémie de Type B, bien que moins virulente, est fréquemment associée à des complications et à de longues périodes de convalescence. Un traitement précoce et adapté à la gravité de la maladie est indispensable pour une bonne prise en

charge des patients. Les signes cliniques peu évocateurs, tels qu'une fièvre prolongée, sont cependant souvent associés à un traitement empirique par les β-lactamines qui s'avèrent inefficaces. *F. tularensis* est en effet naturellement résistante *in vitro* à divers antibiotiques dont les β-lactamines. *F. tularensis* de Type B biovar II est quant à elle résistante aux macrolides. Par ailleurs, du fait de sa localisation intracellulaire facultative, l'utilisation d'antibiotiques présentant des propriétés pharmacocinétique et pharmacodynamique adaptées est nécessaire. On distingue deux types de traitement : curatif et prophylactique. Le traitement curatif est destiné aux patients infectés et atteints de tularémie alors que le traitement prophylactique est destiné aux patients ayant été potentiellement en contact avec *F. tularensis*.

- **Traitement curatif**

Les aminosides (streptomycine, gentamicine), les fluoroquinolones (FQ) (ciprofloxacine, lévofloxacine) et les tétracyclines (doxycycline) sont les antibiotiques utilisés en première ligne de traitement (26).

- *Formes de gravité légère à modérée*

L'utilisation de FQ ou de tétracyclines est préconisée dans les cas de formes de gravité légère à modérée. La ciprofloxacine est administrée à une dose de 800 à 1000 mg/jour par voie intraveineuse ou orale pendant 10 à 14 jours. La doxycycline qui peut être utilisée comme alternative, est administrée à raison de 200 mg/jour. Du fait de son activité bactériostatique la durée de traitement est allongée à 15 jours pour éviter les risques de rechute (Tärnvik and Chu, 2007). En effet, et bien qu'aucune résistance acquise n'ait été décrite, on observe respectivement 5-10% et 10-15% d'échecs thérapeutiques et rechutes malgré un traitement adapté aux FQ ou aux tétracyclines.

- *Formes de gravité sévère*

Les aminosides sont des antibiotiques avec une forte activité bactéricide. Ils représentent le traitement approprié dans le cas des formes sévères de la maladie. La streptomycine a longtemps été l'aminoside de référence (97% de guérison) mais du fait de sa toxicité cochléo-vestibulaire et des risques de réaction d'hypersensibilité, elle a été remplacée par la gentamicine qui est administrée à raison de 5 mg/kg/jour pour voie intra-veineuse pendant 10 jours. Des dosages sériques de l'antibiotique sont effectués en parallèle pour limiter les risques de néphrotoxicité et ototoxicité (49).

- *Enfants*

Dans les cas de formes sévères, la gentamicine à 5 mg/kg associée à un suivi par dosage sérique est recommandée chez l'enfant. Pour les formes de gravité modérée, la ciprofloxacine à la dose de 15 mg/kg est une alternative bien que non recommandée pour un âge inférieur à 15 ans. Dans tous les cas, la durée de traitement doit être d'au moins 10 jours.

- *Femmes enceintes*

Bien que la ciprofloxacine et la gentamicine soient des antibiotiques contre-indiqués par la FDA durant la grossesse, leur utilisation a été recommandée par un groupe de travail de biodéfense civile. Ces antibiotiques sont des options aux mêmes doses que pour les patientes non-enceintes mais avec une durée de traitement à adapter (50) .

- *Patients immunodéprimés*

Dans le cas des patients immunodéprimés, les aminosides sont prescrits en première ligne de traitement et la ciprofloxacine reste une alternative. Ils sont recommandés aux mêmes doses que pour les patients immunocompétents pour une durée de traitement de 14 jours.

- **Traitement prophylactique**

Le traitement prophylactique doit être initié 24 h après l'exposition, pendant une durée de 14 jours avec de la ciprofloxacine à la dose de 1 g/jour ou avec de la doxycycline 200 mg/ jour (OMS Guidelines-2014).

II-5. Sensibilité aux antibiotiques

Les valeurs de concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues pour 8 souches de Type A et 16 souches de Type B isolées aux Etats-Unis sont rapportées ci-dessous.

Tableau 3. CMI (mg/l) de différents antibiotiques vis à vis de *F. tularensis*
D'après Johansson et al. 2002

Antibiotique	Type A	Type B	Seuil de Sensibilité (selon CLSI)
Streptomycine	0.064-2	0.032-1	<8
Gentamicine	0.032-0.25	0.016-0.125	<4
Doxycycline	0.125-2	0.125-2	<4
Ciprofloxacine	0.016-0.064	0.016-0.064	<0.5

Aucune résistance naturelle de *F. tularensis* aux antibiotiques utilisés en thérapeutique (FQ, aminosides, tétracyclines) n'a été démontrée selon les seuils de sensibilité fixés par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

Les tests d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques ne sont pas effectués automatiquement en routine étant donné qu'il n'y a pas de résistance naturelle des souches aux traitements recommandés. La mesure de CMI en milieu liquide (Mueller-Hinton supplémenté en vitamines) peut être utilisée selon les recommandations du CLSI (51). L'antibiogramme par bandelettes E-test, basé sur un gradient de diffusion d'antibiotiques sur géloses peut également être employé pour déterminer la sensibilité de *F. tularensis* aux antibiotiques (52,53).

Du fait de l'utilisation potentielle de la souche à des fins de bioterrorisme, l'étude de la résistance aux antibiotiques reste un sujet d'une grande importance. Dans le cadre d'expérimentations *in vitro*, des souches de *Francisella* résistantes à la ciprofloxacine ont été générées afin d'étudier les mécanismes potentiels d'acquisition de la résistance aux FQ et de développer des outils pour déterminer la résistance éventuelle (54–56). Nous reviendrons sur ce point dans la suite du manuscrit.

III- LES FLUOROQUINOLONES

III-1.Structure

Les FQ sont des antibiotiques de synthèse dérivés de l'acide nalidixique découvert en 1962, très fréquemment prescrits dans le monde (57). La structure de base des quinolones est l'acide quinoléine-3-carboxylique. C'est l'ajout de l'atome de fluor (en R6) dans les années 1970 qui a permis d'augmenter fortement la pénétration des molécules quinolones dans les cellules (x200) : ce fut la naissance des FQ. Ces molécules ont en commun un noyau pyridone β-carboxylique dont l'atome d'azote en 1 qui est substitué par différents groupes (Figure 5).

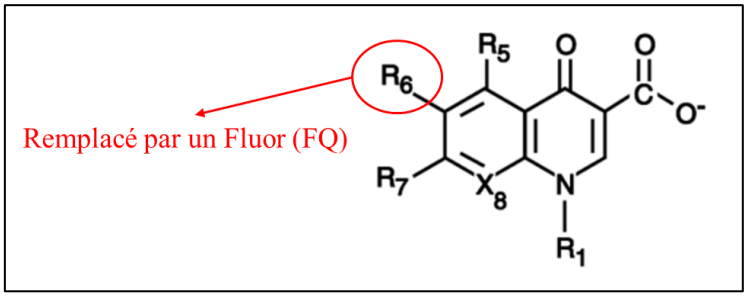


Figure 5. Structure commune aux quinolones et fluoroquinolones

III-2. Spectre d'action

On compte actuellement quatre générations de quinolones dont les principales molécules associées à leur spectre d'action sont décrites dans le Tableau 4 ci-après.

Tableau 4. Principales quinolones et spectre d'action

Génération	**Molécule**	**Spectre**
Quinolone 1ère génération	Acide nalidixique	- bactéries à Gram négatif - entérobactéries
Quinolone 2ème génération	FQ urinaire : Norfloxacine NOROXINE®	- bactéries intracellulaires, - *Pseudomonas aeruginosa* - *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline
	FQ systémiques : Ofloxacine OFLOCET® Ciprofloxacine CIFLOX® Péfloxacine PEFLACINE®	
Quinolone 3ème génération	Lévofloxacine TAVANIC®	- bactéries à Gram positif - streptocoques (dont pneumocoque)
Quinolone 4ème génération	Moxifloxacine IZILOX®	- Elargissement vers anaérobies - pneumocoque

La première génération de quinolones avait une activité réduite aux infections à entérobactéries du tractus urinaire du fait de la diffusion restreinte de ces molécules dans l'organisme. Le spectre des autres générations, correspondant aux FQ, a été largement étendu aux bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Les dernières molécules (3éme et 4éme génération) permettent en particulier de cibler le pneumocoque et les anaérobies.

III-3. Mécanisme d'action

Les FQ inhibent la réplication de l'ADN bactérien en ciblant les ADN topoisomérases de type II (ADN gyrases et ADN topoisomérases de type IV), enzymes impliquées dans la topologie de l'ADN. Les ADN gyrases présentent une structure hétérotétramérique (A_2B_2) dont les sous-unités sont codées par *gyrA* et *gyrB*. Les topoisomérases de type IV sont aussi des hétérotétramères composés de sous-unités distinctes appelées ParC et ParE qui sont respectivement homologues à GyrA et GyrB. Comme dans la plupart des bactéries à Gram négatif, la cible principale des FQ chez *F. tularensis* est l'ADN gyrase. Cette enzyme, essentielle pour la réplication bactérienne et absente chez les eucaryotes, constitue une cible antimicrobienne idéale (58).

L'analyse de la structure cristallographique de ces complexes a permis de mettre en évidence que les régions N-terminale de GyrA et C-terminale de GyrB formaient avec l'ADN, une poche

appelée QBP « Quinolone Binding Pocket » dans laquelle s'inséraient les FQ (59,60). C'est dans cette poche que se fixent les FQ, bloquant ainsi le clivage de l'ADN et par conséquent la réplication bactérienne. Les ADN gyrases étant des protéines conservées, nous avons fait une modélisation structurale du complexe de *F. novicida* (61). Cette modélisation est présentée ci-dessous.

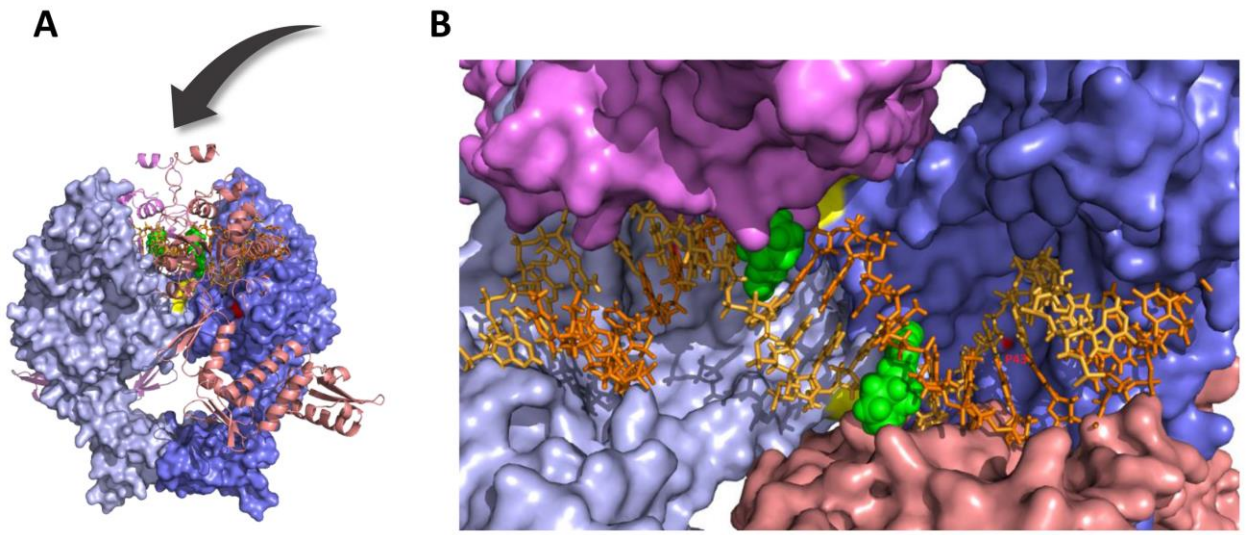


Figure 6. Modélisation de la structure de l'ADN gyrase de *F. tularensis*
(Collaboration Claudine Mayer, Institut Pasteur Paris)
A. L'hétérotétramère est composé de 2 sous unités GyrA (en bleu) et deux sous unités GyrB (en rouge). L'ADN est représenté en orange et les FQ en vert. La flèche noire indique la position du QBP dans le cœur catalytique.
B. Vue du dessus du cœur catalytique de l'enzyme, les FQ (en vert) et l'ADN (en orange). Les résidus tyrosine constituant le site actif sont indiqués en jaune et forment une liaison covalente avec l'ADN stabilisant les cassures doubles brins de l'ADN.

III-4. Mécanisme de résistance

Du fait de l'utilisation excessive des FQ depuis 1990, on observe une augmentation constante et préoccupante du nombre de souches résistantes aux FQ ce qui pose un réel problème de santé publique.

III-4.1. Résistances chromosomique : modification de la cible enzymatique

Suite à une exposition aux FQ, il a été observé que les bactéries généraient des mutations sur *gyrA* et *gyrB* (ou *parC* et *parE*), mutations qui se traduisent par des modifications (Insertions/ Délétions/Substitutions) au niveau des acides aminés. Chez les bactéries à Gram négatif, ces mutations sont essentiellement retrouvées au niveau de régions spécifiques des ADN gyrases appelées « Quinolone Resistance Determining Region » QRDR-A (pour GyrA) et QRDR-B (pour GyrB) (58). Ainsi, le domaine QRDR-A décrit chez *E. coli* se situe entre les acides aminés 67 et 106 avec des « hot spots » de mutations au niveau des acides aminés en position 83 et 87 (62). Les

QRDR-A et –B sont localisées au sein de la QBP et il est évident que des mutations dans cette région peuvent altérer la structure de la protéine et diminuer l'affinité de l'antibiotique à sa cible. Afin d'étudier l'aquisition de la résistance des bactéries *Francisella* aux FQ, des lignées d'évolution expérimentale ont été produites au laboratoire en cultivant ces bactéries en présence de concentration croissantes de FQ pendant 14 passages (56). Pour les trois espèces *F. tularensis*, *F. novicida* et *F. philomiragia*, l'apparition d'isolats avec de très haut niveau de résistance a été observée (CMI 32-64 mg/l). Tous ces isolats présentent des altérations de l'ADN gyrase. Outre les mutations au niveau du QRDR-A et QRDR-B l'exposition des souches de *Francisella* aux FQ induit d'autres délétions ou substitutions non préalablement répertoriées au niveau sous-unités A ou B de l'ADN gyrase. Dans un travail récemment publié et auquel j'ai contribué, nous avons analysé les conséquences fonctionnelles de ces mutations par des tests de super-enroulement ou clivage de l'ADN avec des protéines recombinantes ainsi que par transformation génétique (complémentation) des souches mutées. Ces résultats ont montré que, dans le cas de *F. novicida,* ce sont les mutations sur la sous-unité B de l'ADN gyrase qui apparaissent en premier. Par ailleurs, nous avons montré que les mutations de GyrA et/ou GyrB ne sont pas systématiquement associéees à une augmentation de la résistance ce qui suggère que d'autres cibles sont affectées (61).

III-4.2. Autres résistances

Parmi les autres mécanismes qui peuvent rendre compte d'une augmentation de la résistance nous citerons la diminution de l'accumulation de l'antibiotique au niveau intracellulaire *via* les systèmes de pompes à efflux. Un mécanisme de résistance plasmidique médié par le gène *qnr* a également été décrit. Dans ce système, la protéine Qnr se fixe aux topoisomérases bactériennes et réduit l'affinité de l'enzyme pour l'ADN (62).

IV- LA PROTEINE FUPA/B

Comme évoqué ci-dessus, des lignées d'évolution expérimentale résistantes aux FQ ont été produites au laboratoire (56). Dans la mesure où nous avons montré que les mutations de l'ADN gyrase n'était pas toujours associées à une résistance (61), le séquençage des génomes de ces souches a été réalisé. L'analyse des séquences obtenues a montré que chaque isolat résistant présentait quatre à cinq mutations autres que celles de l'ADN gyrase. Un point intéressant que nous avons observé est que dans le cas de *F. tularensis*, plus de 80% des mutants présentaient une mutation du gène *fupA/B.* L'étude chronologique de l'apparition de ces mutations a montré qu'elles intervenaient après les mutations sur *gyrA* et *gyrB* et qu'elles induisaient dans la plupart des cas l'apparition d'un codon STOP (résultats non publiés). Pour des raisons éthiques, les mutants résistants de *F. tularensis* ont été générés à partir de la souche LVS qui est une souche de virulence atténuée. Cette souche a la particularité de posséder une protéine hybride issue d'un gène de fusion entre les régions 5' de *fupA* (FTT_0918) et 3' de *fupB* (FTT_0919) d'où le nom de FupA/B (Figure 7).

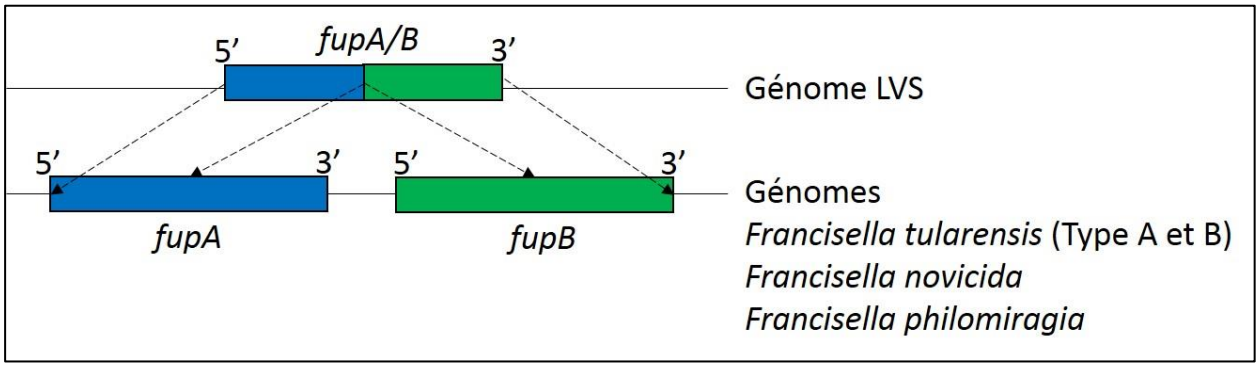


Figure 7. Représentation schématique du gène *fupA/B* de la souche LVS

Lors du séquençage du génome de la souche *Francisella tularensis subsp tularensis* Schu S4, les gènes FTT_0918 (FupA) et FTT_0919 (FupB) ont été annotés comme codant des protéines membranaires de fonction inconnue et exclusives au genre *Francisella* (10). C'est l'analyse d'un mutant spontanné de Schu S4 de virulence atténuée, isolé en Suède (FSC043), qui a permis de mettre en évidence pour la première fois la fusion FupA-FupB (63). La construction du mutant de délétion Schu S4-Δ*fupA* a ensuite démontré que ce gène était associé à la virulence de *Francisella*, contrairement à *fupB* (63). Ultérieurement, Lindgren *et al*. ont montré que FupA jouait un rôle dans l'aquisition du fer sidérophore-dépendante et indépendante ce qui renforce son rôle dans la virulence. De ce fait, la protéine a été nommée FupA pour « Fer Utilization Protein » (64). Aucune donnée n'est actuellement disponible dans les banques de données concernant la structure de cette

protéine de 58 kDa. Son analyse bioinformatique montre la présence d'une séquence signal et d'un motif lipoprotéique qui suggèrent un ancrage membranaire. Le fractionnement par ultra-centrifugation sur gradient de concentration de sucrose couplé à des WB suggère une localisation sur la membrane externe de la bactérie (65). Aucune fonction n'a été assignée à FupB dont le repliement en feuillets-β évoque la structure d'une porine.

A notre connaissance aucun lien n'a été rapporté entre FupA, FupB, FupA/B et résistance aux antibiotiques. Le fort taux de mutation de FupA/B sur les isolats de *F. tularensis* LVS résistants aux FQ nous a amené à considérer FupA/B comme cible des FQ. Cette hypothèse est renforcée par un travail publié récemment par une équipe américaine et qui décrit une forte proportion de mutations du gène *fupA/B* dans des mutants d'évolution LVS expérimentaux résistants à la ciprofloxacine (54). Nous avons observé que la mutation non-sens de FupA/B intervient dans la région N-terminale homologue de FupA. Il est intéréssant de souligner que cette altération n'est pas exclusive à la souche LVS. En effet, comme nous l'avons mentionné précédemment (cf. § III-4.1), chez *F. novicida* les mutations de l'ADN gyrase ne sont pas systématiquement associées à une acquition de résistance. C'est vrai en particulier pour l'isolat Fno3 qui possède une délétion inactive sur *gyrA* (ΔE524, ΔS525) et qui est hautement résistant à la ciprofloxacine (CMI 32 mg/l). Le séquençage de son génome a montré qu'il y avait d'autres mutations dont l'apparition d'un codon STOP sur FupA (61).

A ce jour, aucune souche clinique de *F. tularensis* avec des mutations sur l'ADN gyrase n'a été isolée. Ceci est cohérent avec le fait qu'aucun de ces isolats ne présente de résistance aux antibiotiques puisque souvent isolé avant traitement. L'analyse d'amplicons PCR obtenus à partir de l'ADN extrait de prélevements (ganglions) de patients infectés en rechute ou en échec thérapeutique, n'a pas non plus permis de mettre en évidence de mutations sur le QRDR-A ou-B (Caspar et al. sous presse).

L'ensemble de ces observations nous a conduit à formuler l'hypothèse qu'*in vivo*, l'exposition de bactéries du genre *Francisella* aux FQ, pouvait altérer l'expression d'autres cibles dont FupA. Les objectifs et la démarche expérimentale que nous avons mis en œuvre pour répondre à cette question sont détaillés dans la suite de ce manuscrit.

OBJECTIFS

Les objectifs de ma Thèse ont été d'analyser l'expression de FupA comme marqueur potentiel de la résistance aux FQ chez les isolats cliniques de *F. tularensis* en utilisant des approches combinées de biologie moléculaire, de biochimie et de génétique bactérienne. FupA est présente dans les souches cliniques ainsi que chez *F. novicida*. Il s'agit d'une protéine homologue à la partie N-terminale de FupA/B retrouvée chez la souche LVS de *F. tularensis* utilisée comme modèle expérimentale.

La démarche expérimentale comporte trois parties :

Dans une première étape, je me suis consacrée à la production d'un anticorps spécifique dirigé contre la partie N-terminale de FupA/B. Il était en effet indispensable, pour mener à bien ce projet, d'avoir un outil permettant de vérifier l'expression de la protéine dans les souches d'évolution expérimentale de LVS avec des mutations sur le gène codant cette protéine et que nous souhaitions modifier génétiquement.

J'ai ensuite vérifié l'hypothèse d'un rôle de FupA/B dans la résistance aux FQ par la manipulation génétique de la souche LVS de *F. tularensis*. Deux approches ont été déclinées en parallèle, la complémentation ou la délétion du gène. Pour toutes les souches obtenues, j'ai pu vérifier le niveau d'expression de FupA/B par WB avec l'anticorps produit et tenté d'établir une corrélation entre expression de cette protéine et la résistance aux FQ évaluée par mesure de CMI.

Au regard des résultats obtenus en amont et d'autres données discutées dans ce manuscrit, j'ai ensuite analysé l'expression de FupA dans des isolats cliniques de la collection *F. tularensis* du CNR. La recherche de mutations par PCR/séquençage sur des ADN extraits de prélèvements a également été abordée.

Je dois préciser que les résultats que je vais présenter et qui font l'objet de ma Thèse d'Exercice s'inscrivent dans le contexte plus large d'un travail de recherche que je réalise dans le cadre d'une Thèse de Sciences. Celle-ci porte sur l'étude structurale et fonctionnelle de FupA/B et la compréhension des mécanismes moléculaires qui rendent compte du rôle de cette protéine dans la résistance aux FQ.

MATERIELS ET METHODES

I- SOUCHES, PLASMIDES ET CONDITIONS DE CULTURE

I-1. Souches bactériennes et plasmides

Les bactéries et plasmides utilisés dans cette étude figurent dans le Tableau 5.

Tableau 5. Souches bactériennes et plasmides utilisés lors de l'étude

Souches ou plasmides	Description	Référence et source
Souches		
F. tularensis subsp holarctica LVS	NCTC 10857	CRSSA
F. tularensis subsp holarctica LVS *P2V1/P12V3*	CPX^r	Sutera et al. 2014
LVSΔ*fupA/B*	Δ*fupA/B*	Cette étude
LVSΔ*fupA/B* + *fupA/B*	Δ*fupA/B* + *fupA/B*	Cette étude
F. novicida	CIP 56.12	Institut Pasteur, Paris.
Escherichia coli	TOP10 BL21 (DE3)	Invitrogen Invitrogen
Plasmides		
pMP828	kan^r	Lovullo et al. 2009
pMP828-*fupA/B*	kan^r, +*fupA/B*	Cette étude
pMP812	Plasmide suicide, sacb^s kan^r	Lovullo et al. 2009
pMP812-Δ*fupA/B*	Construction Δ*fupA/B*	Cette étude
pDON221	vecteur donneur, kan^r	Invitrogen
pDEST17	vecteur d'expression, amp^r, tag $(HIS)_6$	Invitrogen

Les bactéries du genre *Francisella* ont été cultivées dans du bouillon Schaedler K3 (BioMérieux®) sous agitation 200 rpm à 37°C ou sur gélose chocolat PolyViteX (BioMérieux®) à 37°C sous 5% de CO_2. Lorsque nécessaire, la kanamycine (10 µg/ml) a été ajoutée. Alors que la manipulation des souches *F. tularensis subsp holarctica* LVS, *F. novicida* et *F. philomiragia* se fait en laboratoire NSB2, la manipulation de la souche hautement virulente *F. tularensis subsp holarctica* impose de travailler en laboratoire NSB3.

Les bactéries *E. coli* ont été cultivées en milieu Luria Bertani (LB) à 37°C en présence d'ampicilline (100 µg/ml) ou de kanamycine (50 µg/ml), comme précisé ci-dessous.

I-2. Souches cliniques

Dans cette étude, nous avons testé 63 souches cliniques de *F. tularensis subsp holarctica* isolées de patients et répertoriées dans la collection du CNR *Francisella* du CHU de Grenoble. Ce souchier a fait l'objet d'une déclaration auprès du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (DC-2008-677).

II- CLONAGE

II-1. Construction du plasmide pMP812-Δ*fupA/B*

Le plasmide pMP812 est un plasmide suicide de *Francisella* porteur d'un gène de résistance à la kanamycine et d'un gène de sensibilité au sucrose. Il est utilisé pour le développement de souches « knock out ». Dans le but de générer une souche LVSΔ*fupA/B*, nous avons construit le plasmide pMP812-Δ*fupA/B* à partir du plasmide pMP812 (Figure 8) (66).

Une région flanquante en 5' du gène *fupA/B* de 829 pb et une région intra-génique de 421 pb ont été amplifiées à partir de l'ADN génomique de LVS en utilisant les couples d'amorces FTL0438_F/FTL0438_R (PCR I) et FTL0439_F/FTL0439_R (PCRII) (Tableau S1 – Annexes). Les amorces FTL0438_F et FTL0439_R contiennent respectivement les séquences spécifiques des sites de restriction *Not*I et *Bam*HI afin de borner la fusion. Les deux fragments amplifiés ont été purifiés sur gel puis liés par PCR de chevauchement. L'amplicon a été digéré par *Not*I et *Bam*HI puis cloné dans le plasmide pMP812 également digéré par ces mêmes enzymes. Le produit de ligation obtenu a été utilisé pour transformer des bactéries *E. coli* Top10 rendues chimiquement compétentes selon le Protocole 1 basé sur des lavages en $CaCl_2$ et $MgCl_2$ (cf. Annexes). Les bactéries transformées ont ensuite été sélectionnées sur gélose contenant de la kanamycine et la présence de l'insert vérifiée par digestion sur mini-préparations d'ADN plasmidique (QIAprep Spin Miniprep kit Qiagen®). Après séquençage (Eurofins), le plasmide pMP812-Δ*fupA/B* a été produit en plus grande quantité (Hi speed® Plasmid Midi kit Qiagen®) pour la transformation des souches de *Francisella* et la construction de la souche LVSΔFupA/B. La concentration finale obtenue est de 70 ng/µl. Les séquences des amorces sont indiquées dans le Tableau S1 (cf. Annexes).

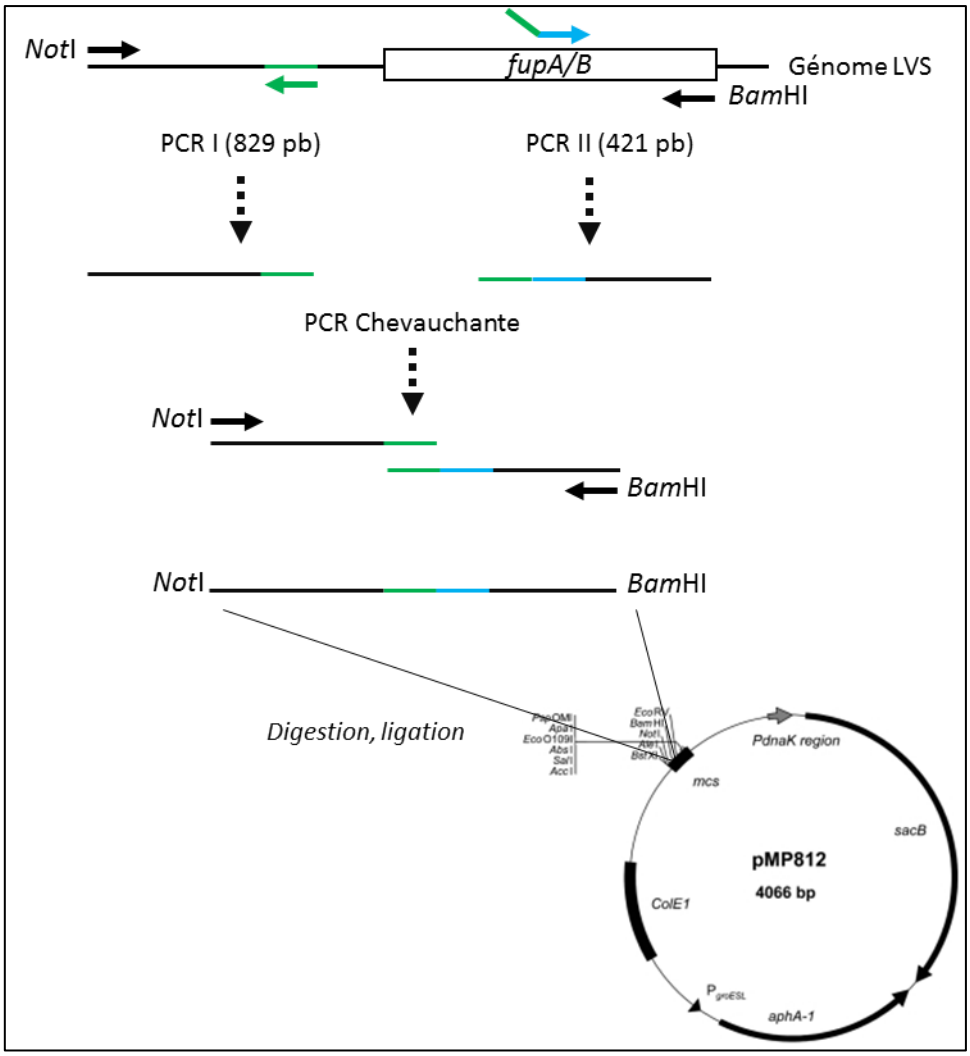


Figure 8. Construction du plasmide pMP812-Δ*fupA/B*
Le produit de fusion a été introduit dans le MCS (multicloning site) du vecteur pMP812 au niveau des sites *Bam*H1 et *Not*I. ***aphA-1*** : gène de résistance à la kanamycine, ***ColEI*** : origine de réplication d'*E.coli*, ***sacB*** : gène de sensibilité au sucrose

II-2. Construction du plasmide pMP828-*fupA/B*

Le gène *fupA/B* de LVS et le promoteur *pfslA* ont été amplifiés par PCR à partir de l'ADN génomique de la souche LVS en utilisant les couples d'amorces pfslA_F/pfslA_R et fupA/B_F/fupA/B_R (Tableau S1 - Annexes). Ces amorces contiennent les séquences spécifiques de sites de restriction afin de borner la fusion p*flsA-fupA/B* avec les sites *Bam*H1 et *Eco*RI. Un site *Bsp*E1 a également été introduit en 3' de *pfslA* et en 5' de *fupA/B* afin de générer la fusion (Figure 9). Les deux fragments amplifiés ont été purifiés sur gel, digérés par *Bsp*EI puis liés avec la T4 DNA ligase. Le produit de ligation a été amplifié par PCR avec les amorces correspondant aux extrémités 5' et 3' du gène de fusion soient pfslA_F et fupA/B_R. L'insert digéré par *Bam*H1 et

*Eco*RI a ensuite été cloné dans le plasmide réplicatif pMP828 préalablement digéré par les mêmes enzymes. En suivant les mêmes étapes que celles décrites ci-dessus (cf. § II-1.) le plasmide a pu être produit en plus grande quantité pour la transformation des souches de *Francisella*. La concentration finale obtenue est de 50 ng/µl.

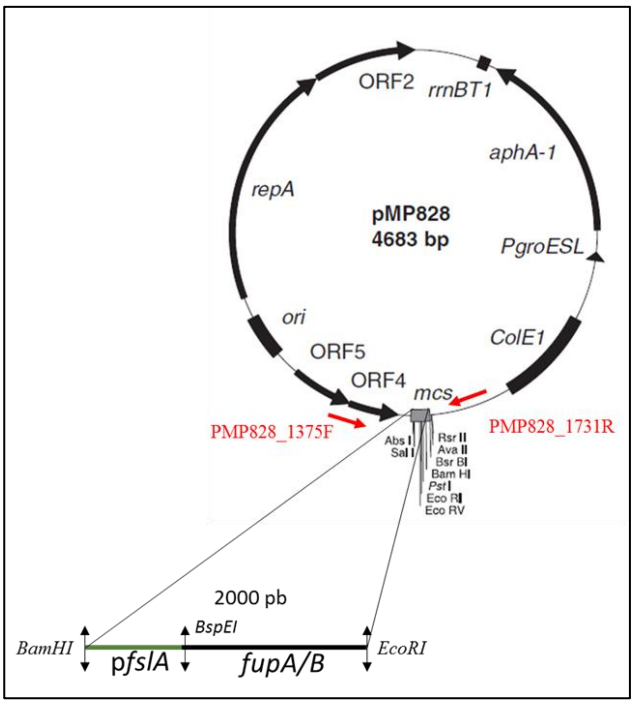


Figure 9. Construction du plasmide pMP828-*fupA/B*

Le produit de fusion p*fslA-fupA/B* a été introduit dans le MCS du vecteur pMP828 au niveau des sites *Bam*HI et *Eco*RI. Les amorces pMP828_1375F et pMP828_1731R utilisées pour le criblage des clones obtenus sont indiquées en rouge. ***aphA-1*** : gène de résistance à la kanamycine, ***ColE1*** : origine de réplication d'*E.coli*, ***Ori*** : origine de réplication de *F.tularensis.*

II-3. Clonage de la région N-terminale de *fupA/B* dans un vecteur d'expression procaryote par la Technique de clonage Gateway™

Le clonage de la région N-terminale du gène codant la protéine FupA/B (N-ter FupA/B) dans un vecteur d'expression a été réalisé selon la technique de clonage par recombinaison Invitrogen™ Gateway™. Cette technique développée dans les années 90 permet de contourner les limites de clonage traditionnel liées à l'insertion de sites de restriction spécifiques et d'accéder à quasiment n'importe quel système d'expression en quelques étapes (Figure 10).

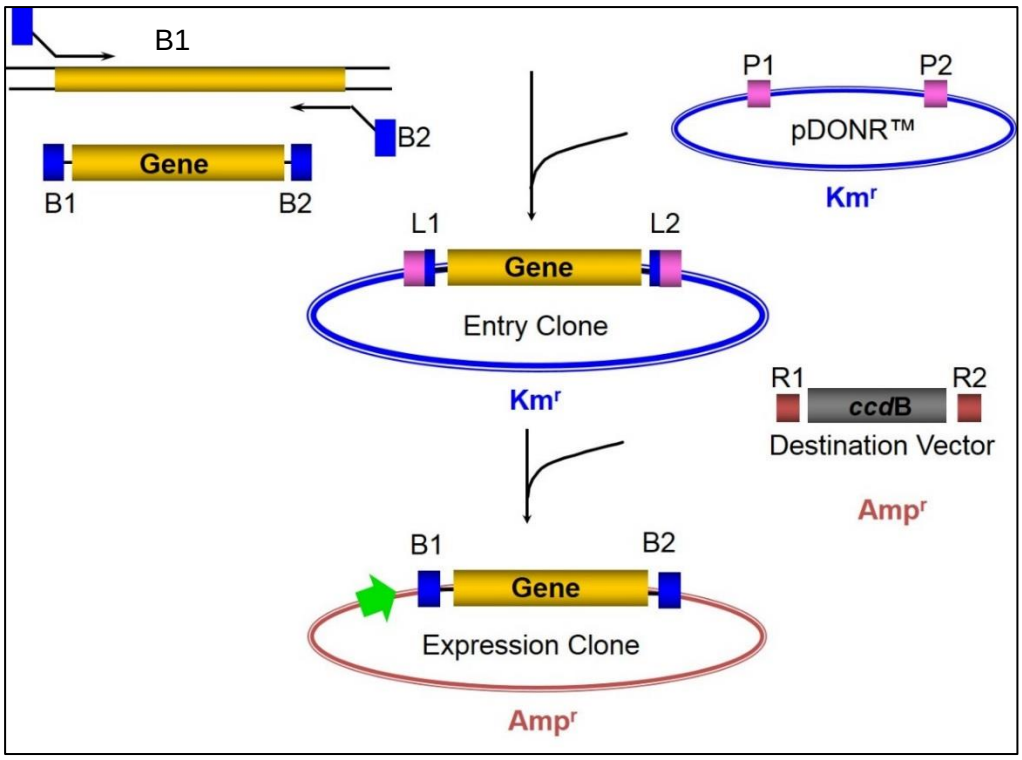


Figure 10. Principe de la technique de Clonage Gateway™

La séquence d'intérêt du gène *fupA/B* a été amplifiée par PCR à partir du couple d'amorces Nter-FupA/B_F et Nter-FupA/B_R (Tableau S1 - Annexes) qui présentent à leurs extrémités les sites de recombinaison attB1 et attB2. Nous avons également introduit en amont du gène, la séquence correspondant au site de clivage de l'enzyme TEV (Tobacco Etch Virus) ce qui permet après purification d'éliminer l'étiquette ajoutée en N-ter

minal (Figure 11).

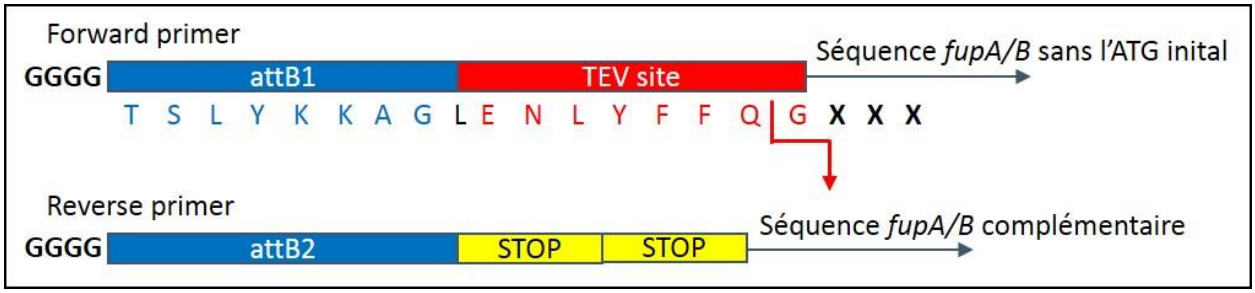


Figure 11. Choix des amorces pour le clonage de la région N-terminale de FupA/B dans un vecteur d'expression

Ce schéma illustre la construction des amorces pour le clonage par recombinaison du gène *fupA/B*. Les sites attB1 et attB2 correspondent aux sites de recombinaison permettant l'insertion dans le vecteur pDON221. Le site TEV est un site de clivage permettant d'éliminer l'étiquette en N-terminal. La coupure se fait entre la glutamine (Q) et la glycine (G) comme indiqué par la flèche rouge.

Brièvement, le produit de PCR est cloné dans le vecteur donneur pDON221, qui possède une cassette de résistance à la kanamycine à l'aide d'une première enzyme de recombinaison la « BP clonase ». A partir des clones positifs obtenus dans le vecteur donneur, on procède à une seconde recombinaison avec un vecteur d'expression pDEST17 porteur d'un gène de résistance à l'ampicilline et d'une séquence codant l'étiquette poly-histidine à l'aide d'une seconde enzyme la « LR clonase ». A chacune des étapes, le criblage des colonies *E. coli* Top10 résistantes obtenues après transformation a été fait par PCR sur des mini-préparations d'ADN plasmidique (QIAprep Spin Miniprep Kit Qiagen®) en utilisant les amorces attB1 et attB2 (Tableau S1 - Annexes). Les clones ont ensuite été séquencés pour s'assurer de l'homologie de séquence (Eurofins).

III-TRANSFORMATION DES BACTERIES

III-1. Electroporation

Dans le but de complémenter les mutants *fupA/B* nous avons tout d'abord rendus les bactéries issues des lignées d'évolution électrocompétentes selon le Protocole 2, basé sur des lavages en sucrose (cf. Annexes). Ces bactéries ont ensuite été électroporées, selon le Protocole 3 (cf. Annexes) avec le plasmide réplicatif vide pMP828 ou le plasmide réplicatif pMP828-*fupA/B* contenant le gène *fupA/B* sous contrôle du promoteur p*fslA* (cf. § II-2.). Les clones transformés ont été sélectionnés sur géloses chocolat PolyViteX (Biomérieux®) en présence de kanamycine 10 µg/ml. Le criblage des colonies a été réalisé par PCR avec les amorces pMP828_1375F et pMP828_1731R situées sur le plasmide pMP828 de part et d'autre de l'insert *fupA/B* (Figure 9 et Tableau S1 - Annexes). Ce protocole a aussi été appliqué pour la construction de la souche LVSΔ*fupA/B* (cf. § IV).

III-2. Transformation par choc thermique

La transformation par choc thermique a été appliquée pour le clonage de la région N-terminale dans des *E. coli* BL21 (DE3) (expression de la protéine) ou *E. coli* Top10 (clonage Gateway) rendues chimiquement compétentes (Protocole 1 - Annexes). Les bactéries chimiocompétentes ont été incubées avec le plasmide d'intérêt (0,5 à 1 µg) pendant 20 minutes à 4°C puis placées 40 secondes à 40°C et 2 minutes à 4°C. Après addition de 120 µl de milieu LB, la suspension bactérienne a été incubée à 37°C sous agitation à 200 rpm pendant 1 heure puis étalée sur gélose LB en présence de l'antibiotique approprié.

IV- CONSTRUCTION DE LA SOUCHE LVS Δ*FUPA/B*

La construction de la souche KO illustrée ci-dessous comporte deux étapes. La première étape a consisté à introduire par électroporation le plasmide pMP812-Δ*fupA/B* dans la souche LVS en suivant le protocole d'électroporation décrit en amont (cf. § III.1) (Figure 12A). Elle donne lieu à un premier évènement de recombinaison entre deux régions homologues du plasmide et de l'ADN bactérien à l'origine de l'insertion du plasmide dans l'ADN bactérien (Figure 12B). La sélection des clones ayant intégré le plasmide dans leur génome se fait sur gélose chocolat + PVX en présence de kanamycine 10 µg/ml.

Après vérification de l'insertion par PCR, une seconde étape a consité à la sélection des clones positifs sur gélose en présence de sucrose (5% finale) donnant lieu à la seconde recombinaison (Figure 12C). Le criblage des colonies a été effectué par PCR avec le couple d'amorces FTL0438_570F/FTL0441_R situées de part et d'autre du gène *fupA/B* à déléter.

Le séquençage (Eurofins) des mutants a été effectué pour vérifier que la délétion du gène était effective.

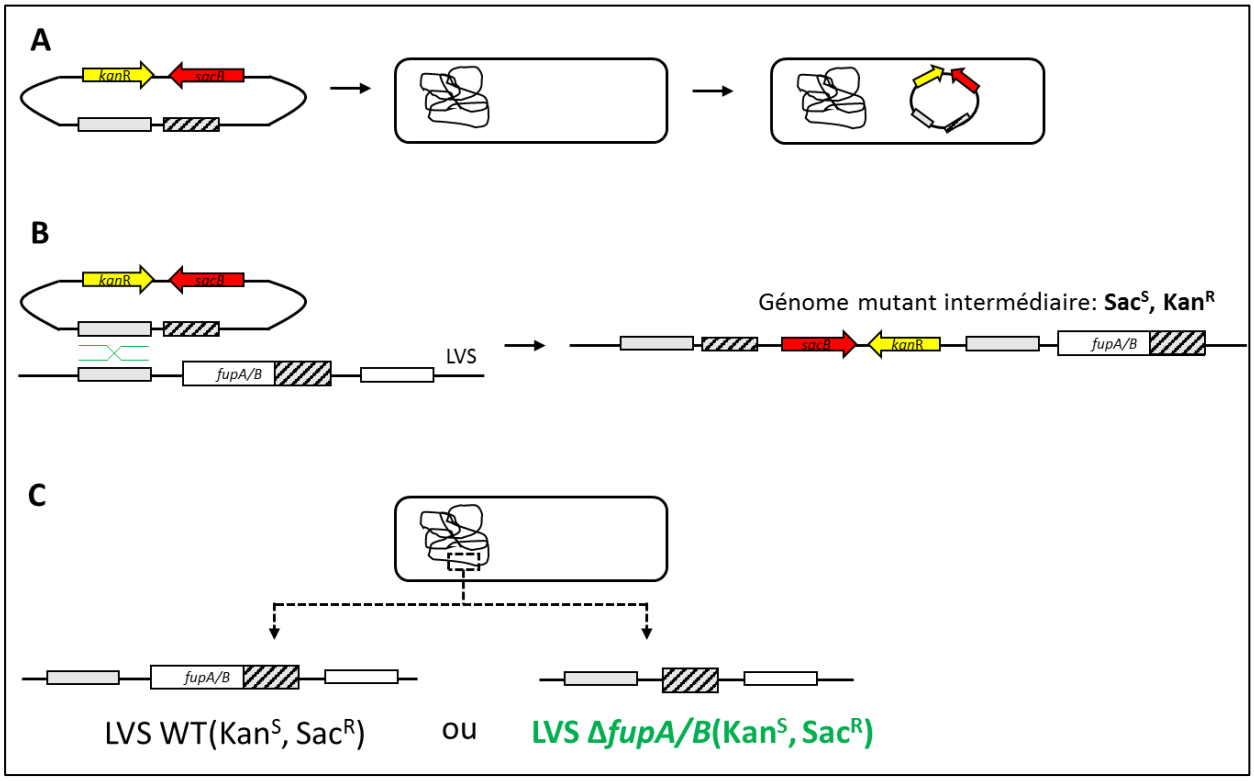


Figure 12. Conception du mutant LVSΔ*fupA/B*

A. Transformation de la souche LVS avec le plasmide pMP812-Δ*fupA/B*

B. Premier évènement de recombinaison en présence de kanamycine, conduisant à un génome mutant intermédiaire sensible au sucrose et résistant à la kanamycine

C. Deux types de recombinants possible en présence de sucrose : LVSΔ*fupA/B* ou retour à la souche WT

V- EVALUATION DES CMI

L'évaluation des CMI des mutants d'évolution et de LVSΔ*fupA/B* complémentés ou non, a été faite selon la technique de micro-dilution en milieu Mueller Hinton + 2% PolyViteX (MHPV) et en présence de kanamycine 10 µg/ml afin de conserver la pression de sélection et d'éviter que la bactérie ne perde le plasmide. L'électroporation avec le plasmide pMP828 vide a été utilisée comme contrôle négatif et a permis de s'assurer que la transformation des bactéries avec le vecteur vide ne modifiait pas les valeurs de CMI qui ont été mesurées selon les recommandations du CLSI. Les manipulations ont été effectuées trois fois en triplicata pour chaque souche. Des concentrations croissantes de ciprofloxacine [0,125-64 mg/l] pour les mutants d'évolution et [0,001-0,5 mg/l] pour la souche LVSΔ*fupA/B* ont été ajoutées à du MHPV + kanamycine (75 µl/puit) en micro-plaques de 96 puits. La suspension bactérienne contenant 10^6 cellules/ml de MHPV+kanamycine a ensuite été distribuée dans les puits (75µl/puit). Après 48h d'incubation à 37°C en présence de CO_2 (5%), la plus faible concentration en antibiotique inhibant la croissance bactérienne est relevée comme étant la CMI. La lecture des CMI a été faite à l'œil nu en fonction du trouble observé et validée par lecture de la densité optique (DO) à 600 nM au Tecan (Infinite® M200 pro).

VI- EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA PROTEINE RECOMBINANTE

VI-1. Expression de la région N-terminale de FupA/B

Les bactéries *E. coli* BL21 contenant le vecteur d'expression de la région N-terminale de FupA/B ont été cultivées en milieu LB en présence d'ampicilline à 37°C sous agitation 200 rpm jusqu'à une DO comprise entre 0,4 et 0,6. L'expression de la protéine a été induite par addition d'IPTG 0,5 mM à 18°C sous agitation pendant 15 h sur la nuit.

VI-2. Purification de la région N-terminale de FupA/B

Après induction, les bactéries ont été centrifugées (5000 rpm, 4°C, 30 min) et le culot repris dans 30 ml de tampon de lyse (Tris 50 mM pH 8,8 - NaCl 200 mM - imidazole 10 mM, CHAPS 1%, PMSF 1mM) pour 500 ml de culture, a été lysé par sonication puis centrifugé (14000 rpm, 10°C, 30 min) afin d'éliminer les débris. Le surnageant filtré (0,4µm) contenant les protéines solubles a été déposé sur une colonne d'affinité au nickel (HisTrap ™HP 5ml, GE Healthcare) préalablement équilibrée avec 50 ml de tampon d'équilibration (Tris 50 mM pH 8,8 - NaCl 200 mM - imidazole 10 mM). La colonne a ensuite été lavée avec 100 ml de tampon de lavage (Tris 50 mM pH 8,8 -

NaCl 200 mM - imidazole 20 mM). Enfin, les protéines retenues sur la colonne ont été éluées avec le même tampon contenant 300 mM d'imidazole. Au cours de l'élution, des fractions de 2 ml ont été recueillies et la présence de la protéine contrôlée avec le test colorimétrique Biorad protein assay (Biorad®) basé sur la réaction de Bradford. Les fractions d'élution ont ensuite été regroupées, concentrées et injectées sur colonne de chromatographie d'exclusion de taille (EnrichSEC650, Biorad®) préalablement équilibrée avec du tampon Tris 50 mM pH 8,8 - NaCl 200 mM (FPLC, NGC instrument Biorad®). Le profil des protéines éluées après chaque purification a été vérifié par électrophorèse sur gel SDS-PAGE contenant 12% de polyacrylamide et coloré au bleu de Coomassie. En vue de l'immunisation, la région N-terminale de la protéine FupA/B purifiée a été concentrée à 1 mg/ml en présence de 10% de glycérol puis congelée dans l'azote liquide avant stockage à -80°C.

VII- PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX ANTI-FUPA/B

VI-1. Protocole d'immunisation

Deux lots d'anticorps polyclonaux ont été produits par la société BIOTEM®. Les deux lots ont été produits à partir de deux lapins suivant le même protocole d'immunisation (Figure 13).

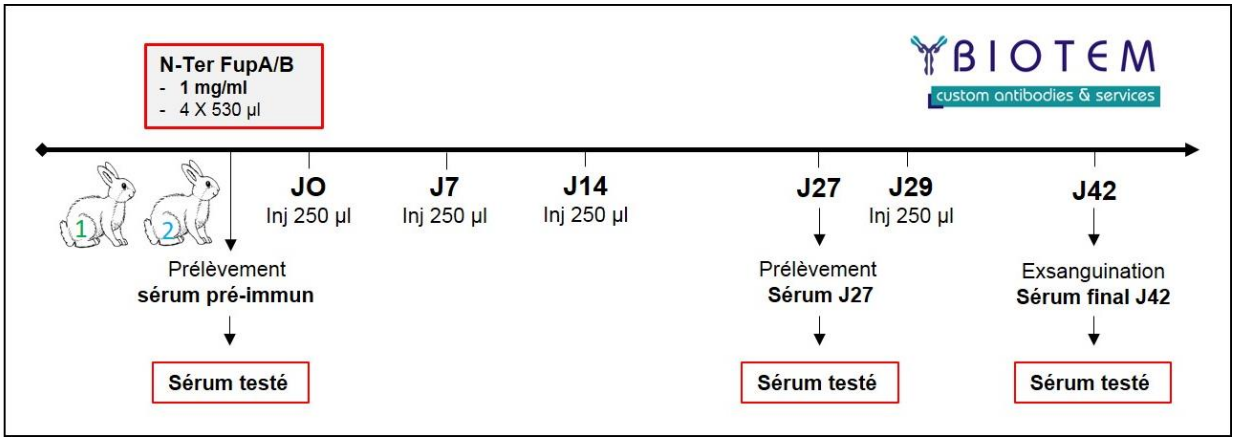


Figure 13. Protocole d'immunisation pour la production d'anticorps anti-FupA/B

La production d'anticorps a nécessité 1 mg de protéine purifiée par animal. Le protocole d'immunisation comprend en effet quatre injections de 250 µg de protéine à T=0, T=7, T=14 et T=29 jours. Le sérum pré-immun a été prélevé avant la première injection et un premier sérum immun à J27 pour un premier test de réactivité. Compte tenu de la très bonne réponse immune des deux lapins à J27, les animaux ont été euthanasiés à J42 et les sérums prélevés stockés à -20°C.

Chaque sérum a été testé par WB contre la région N-terminale de la protéine FupA/B et contre les extraits bactériens totaux

VI-2. Western blot

La mise au point des conditions de WB et la réactivité des anticorps anti-FupA/B ont été réalisées contre la protéine purifiée recombinante et contre des souches de référence de *Francisella* ainsi que sur la souche clinique Ft6 de *F. tularensis subsp holarctica* de la collection du CNR dont les génomes ont été séquencés et dont les gènes codant FupA ou FupA/B ne présentent pas de codon STOP. Comme contrôle positif nous avons utilisé un anticorps monoclonal anti-IglC qui reconnaît une protéine membranaire de *Francisella* (67).

Compte tenu de la pathogénicité de ces souches, les bactéries récupérées à partir d'une gélose complète ont d'abord été inactivées par chauffage dans 1 ml de PBS pendant 20 minutes à 95°C afin de pouvoir manipuler les échantillons hors du laboratoire NSB3. Après centrifugation, le culot a été resuspendu dans 200 µl de PBS et à 50 µl de cet extrait bactérien ont été ajoutés 40 µl de tampon de Laemmli et du détergent NP40 10% (concentration finale 1%). Après dénaturation pendant 5 minutes à 95°C, les protéines ont été séparées sur gel d'acrylamide à 12% (SDS-PAGE) puis transférées sur une membrane de nitrocellulose en utilisant le système de transfert Trans-Blot Turbo de Biorad® (25 V, 1,3 A, 15 min). Après transfert, la membrane de nitrocellulose a été incubée 1 heure à température ambiante sous agitation faible en présence d'une solution PBS-Tween 20 (0.2%)-Lait (0.5%) permettant le blocage des sites non spécifiques d'hybridation. Après saturation, la membrane a été incubée 1 heure avec l'anticorps primaire anti FupA/B dans le tampon PBS-Tween-Lait. Dans certains cas, l'anticorps anti-IglC a été utilisé comme contrôle positif dilué au 1/2000ème (*bei* resources). Suite à 3 lavages successifs de 5 minutes avec du PBS - Tween, la membrane a été incubée 1 heure à température ambiante sous agitation avec un anticorps secondaire (anti-IgG de lapin ou de souris couplé à la peroxydase (HRP), Jakson ImmunoResearch) dilué au 1/20 000ème. Comme décrit ci-dessus la membrane est à nouveau lavée puis révélée par chimiluminescence (kit ECL, Biorad®) en utilisant le lecteur Biorad (Chemidoc™ XRS+ System).

RESULTATS

I- PRODUCTION D'ANTICORPS ANTI -FUPA/B

I-1. Clonage de la région N-terminale de FupA/B

Dans le but de produire un anticorps susceptible de reconnaitre à la fois FupA/B chez la souche LVS (mutants d'évolution) et FupA chez *F. tularensis subsp holarctica* (souches cliniques), nous avons cloné la région N-terminale de FupA/B qui est homologue à la protéine FupA (AA 1-176) des différentes sous-espèces de *Francisella*. Cette région correspond à environ 180 acides aminés, ce qui correspond à une protéine d'environ 25 kDa (Figure S1 - Annexes).

Les bactéries *E. coli* Top10 transformées avec le plasmide pDON221 dans lequel nous avons inséré la séquence d'intérêt par recombinaison, ont été criblées par PCR sur mini-préparations d'extraction plasmidique et avec les amorces attB1 et attB2. L'amplification d'un fragment de 613 nucléotides témoigne de la présence de la séquence codant la région N-terminale de FupA/B dont l'homologie de séquence a été vérifiée par séquençage. Une seconde recombinaison (Figure 14) positive pour les 4 clones testés, a permis d'insérer le gène codant FupA/B dans le vecteur pDEST17 avec un tag-Histidine.

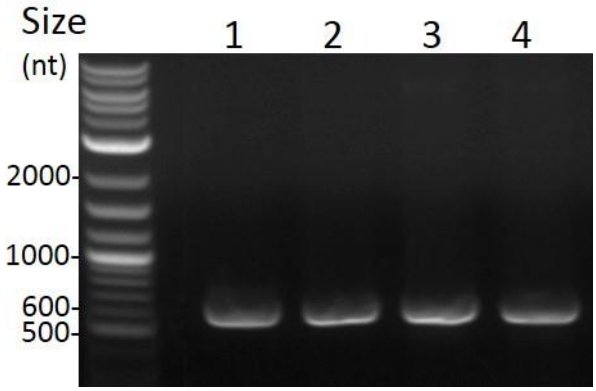


Figure 14. Contrôle par PCR de la seconde recombinaison dans pDEST17
La PCR effectuée avec les amorces attB1 et attB2 montre l'amplification d'un fragment d'environ 600 nt ce qui correspond à la taille attendue de l'insert.

I-2. Purification de la protéine recombinante

La protéine recombinante produite dans les bactéries *E.coli* BL21 (DE3) transformées avec le plasmide obtenu en II-3, a d'abord été purifiée par chromatographie d'affinité en utilisant une colonne dont la phase stationnaire en ions métalliques (Ni^{2+}) présentent une forte affinité pour l'histidine.

Comme le montre la Figure 15A, après induction à 18°C on obtient une bande de la taille attendue (25 kDa) dans le lysat, mais aussi dans le surnageant, ce qui signifie que la protéine exprimée est soluble. On retrouve cette même bande dans la fraction d'élution E2 qui témoigne de la présence de la protéine purifiée. Afin d'augmenter la pureté de la protéine recombinante nous avons effectué une seconde étape de purification par chromatographie d'exclusion. Les protéines sont séparées selon leur taille et sont éluées dans l'ordre des masses moléculaires apparentes décroissantes.
Le profil de gel filtration représenté dans la Figure 15B montre que nous avons un pic d'élution très net entre 15 et 16 ml. La qualité de la protéine recombinante obtenue suivant ce protocole (>90%) (Figure 15C) a été jugée suffisante pour l'immunisation des lapins. Afin d'obtenir la quantité nécessaire de protéine pour l'immunisation de deux lapins (4 x 500 µl à 1 mg/ml), ces étapes de purifications ont été répétées cinq fois.

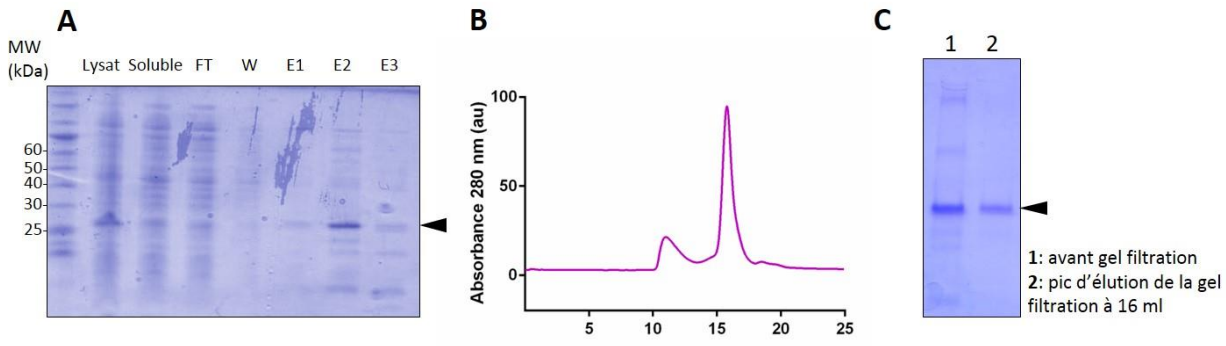


Figure 15. Purification la région N terminale de FupA/B
A. Gel SDS-PAGE. **MW** : Marqueur de poids moléculaire, **Lysat** : Lysat cellulaire chargé sur colonne, **Soluble** : Fraction soluble, **FT** : Protéines non retenues sur la colonne, **W** : Lavage, **E** : Fractions d'élution
B. Profil de gel filtration sur EnrichS650 (Biorad®)
C. Vérification de la pureté de la protéine purifiée par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie

II- REACTIVITE DES ANTICORPS ANTI-FUPA/B EVALUEE PAR WESTERN BLOT

II-1. Réactivité des anticorps contre la protéine FupA/B recombinante

Nous avons d'abord vérifié, par WB, la réactivité des anticorps produits vis-à-vis de la protéine recombinante purifiée. Les résultats obtenus ont montré qu'il n'y avait pas de signal dans le cas du sérum pré-immun que ce soit pour le lapin L1 ou L2. En revanche dans le cas du sérum immun à J27 nous avons un signal positif, ce qui témoigne de la spécificité des anticorps produits vis-à-vis de la région N-terminale de FupA/B. Les mêmes tests ont été effectués à partir des sérums prélevés au terme du protocole d'immunisation. Pour L1 et L2, nous avons obtenus une réactivité très forte avec un signal important détecté avec une dilution d'anticorps anti-FupA/B au 1/20 000ème. Cette dilution a été utilisée dans les tests suivants et en combinaison avec une dilution d'anticorps secondaire au 1/20 000ème (résultats non présentés).

II-2. Reconnaissance de la protéine dans différentes souches de *Francisella*

La réactivité des anticorps anti-FupA/B a ensuite été testée vis-à-vis de la protéine native présente dans des extraits bactériens de différentes souches de *Francisella*. La pathogénicité de ces souches manipulées en laboratoire NSB3 impose une étape d'inactivation par chauffage et nous nous sommes assurés que cette inactivation n'induisait pas une dégradation des protéines FupA/B (LVS) ou FupA (*F.novicida* et *F.tularensis*) dont la taille est de 58 kDa. Compte tenu de la localisation membranaire, et dans le but d'améliorer le profil de migration des extraits bactériens et la qualité des WB, nous avons également testés plusieurs détergents. Des résultats satisfaisants ont été obtenus en présence de 1% final de NP-40. Dans ces conditions et comme le montre la figure 16B, on observe un signal à la taille attendue pour les 3 souches, ce qui signifie que notre anticorps détecte bien la protéine ce qui n'est pas le cas du sérum pré-immun (Figure 16A).

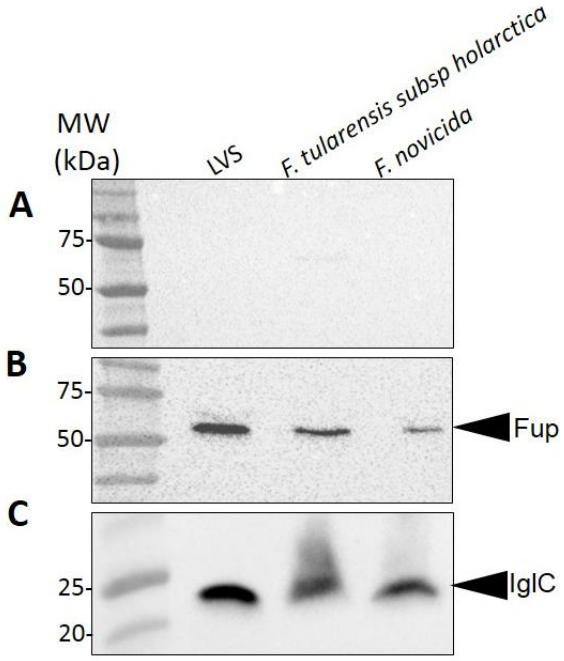


Figure 16. Reconnaissance de la protéine FupA ou FupA/B chez différentes souches de *Francisella*
Après migration SDS-PAGE et transfert sur membrane de nitrocellulose, les échantillons ont été incubés avec le sérum pré-immun (A) ou l'anticorps anti-FupA/B dilué au 1/20000ème puis avec un anticorps anti-lapin HRP dilué au 1/20000ème (B). L'anticorps anti-IglC dilué au 1/2000ème couplé à un anti-souris-HRP 1/20000ème a été utilisé comme contrôle positif. La révélation du WB a été réalisée par ECL.

III- Implication de FupA/B dans la résistance aux FQ

III-1. Sélection des clones d'évolution

Dans un premier temps nous avons travaillé à partir des clones d'évolution expérimentale hautement résistants aux FQ et obtenus par repiquages successifs en présence de concentrations croissantes de FQ (56). Dans la mesure où notre objectif était d'analyser les conséquences de la mutation de *fupA/B* sur la résistance aux FQ, nous avons sélectionné des mutants résistants pour lesquels, outre *gyrA* et *fupA/B,* un nombre réduit d'autres gènes étaient mutés. Les caractéristiques de ces clones sont détaillées dans le Tableau 6. Le mutant P2V1, isolé au passage 2, présente une mutation en position 248 du gène codant la sous-unité A de l'ADN gyrase et entrainant la

substitution d'une cytosine par une adénine. Le mutant P12V3, isolé au passage 12, présente cette même mutation qui se traduit par la substitution T83K au niveau protéique soit dans le QRDR. En position 108 du gène FTL_0439 codant FupA/B de ce mutant, on note également l'insertion d'une cytosine qui induit la formation d'un codon STOP en position 41 de la protéine. Le séquençage complet du génome de ce clone a aussi révélé une troisième mutation sur le gène FTL_0594 codant l'UDP-glc-4-épimerase entrainant une délétion de 4 acides aminés. La dernière colonne du tableau indique que la CMI de ce mutant est augmentée par rapport à P2V1 qui ne présente que la mutation sur GyrA (4 ml/l *vs* 1 mg/l).

Tableau 6. Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des mutants de *F. tularensis* sélectionnés

mutant	gène	mutations nucléotidiques	protéine	mutations protéiques	CMI à la ciprofloxacine mg/l
LVS	-	-	-	-	0.03
P2V1	FTL_0533	C248A	GyrA	T83K	1
P12V3	FTL_0533	C248A	GyrA	T83K	4
	FTL_0439	108insC	FupA/B	L37S, G38W, A39S, T40Y, S41X	
	FTL_0594	499del AAACTTGCAAAG	UDP-glc-4-épimérase	167delKLAK	

III-2. Complémentation des mutants *fupA/B* par le gène *fupA/B* sauvage

Après avoir été rendus compétents, les clones sélectionnés ont été électroporés avec le plasmide vide pMP828 ou avec le plasmide pMP828-*fupA/B* que nous avons au préalable construit et contrôlé par digestion enzymatique (Figure 17).

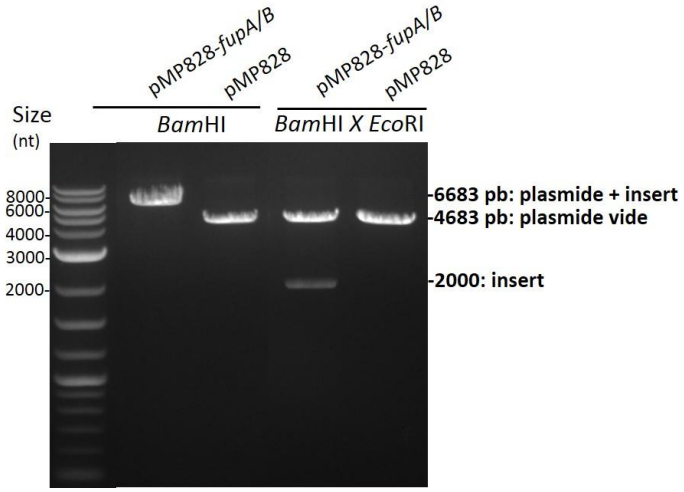


Figure 17. Contrôle de la construction du plasmide pMP828-*fupA/B*
La simple digestion par *Bam*HI linéarise le plasmide et montre que la taille de pMP828-*fupA/B* est supérieure à celle du pMP828 vide (puits 1 et 2). La double digestion *Bam*HI et *Eco*RI confirme la présence de l'insert de 2000 pb dans pMP828-*fupA/B* ce qui valide notre construction (puits 3 et 4).

Dans la mesure où le clone P2V1 ne présente pas de mutation au niveau de *fupA/B*, nous n'avons pas réalisé de complémentation avec pMP828-*fupA/B* mais seulement avec le vecteur vide. Pour chaque clone, deux colonies ont été sélectionnées pour le criblage par PCR. La transformation des clones de *Francisella* a été effective puisque nous avons amplifié 356 nucléotides dans le cas du plasmide vide pMP828 et 2356 nucléotides dans le cas du plasmide pMP828-*fupA/B*, ce qui correspond aux tailles attendues.

Nous avons également vérifié, par WB, que la complémentation du gène *fupA/B* du mutant P12V3 restaurait l'expression de la protéine FupA/B contrairement à la complémentation avec le plasmide vide. La Figure 18A montre que l'anticorps anti-FupA/B reconnait une bande à environ 58 kDa, qui est la taille attendue de la protéine FupA/B, pour la souche LVS sauvage et la souche complémentée par pMP828-*fupA/B*. En revanche aucun signal n'est détecté pour le mutant d'évolution complémenté ou non par le plasmide vide. L'anticorps anti-IglC a été utilisé comme témoin positif de cette expérience.

III-3. Evaluation des CMI après complémentation *fupA/B*

Comme le montre la Figure 18B, la CMI des mutants d'évolution au passage 12 (colonne rouge) est significativement supérieure à celle observée avec la souche au passage 2 (colonne noire) (5,3 ± 1,3 mg/l vs 1 ± 0 mg/l). Cette augmentation de la résistance est accompagnée d'un défaut d'expression de la protéine FupA/B mesurée par WB. Alors que la complémentation de cette souche résistante par le vecteur vide n'affecte pas sa sensibilité aux FQ (colonne verte), la complémentation *fupA/B*, validée par les résultats de WB, induit une diminution significative de la CMI dont le niveau redevient comparable à la souche sans mutation de *fupA/B*.
Ces résultats montrent que la complémentation du mutant restaure l'expression de FupA/B et la sensibilité aux FQ ce qui valide l'hypothèse d'un lien entre FupA/B et la résistance des mutants LVS aux FQ.

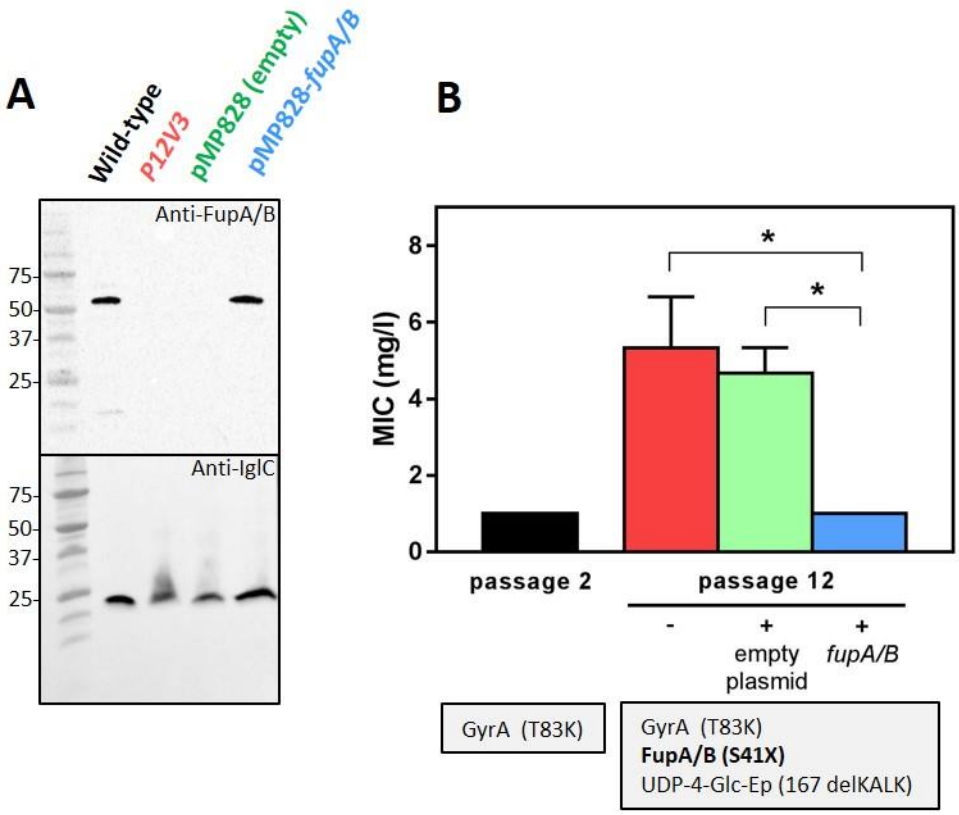


Figure 18. CMI des mutants d'évolution

A. Expression de FupA/B évaluée par WB sur la souche LVS ou sur le mutant P12V3 résistant (rouge) complémenté avec le plasmide vide (vert) ou avec le plasmide pMP828-*fupA/B* (bleu). L'anti-IglC est utilisé comme contrôle positif. B. Evaluation des CMI à la ciprofloxacine des mutants P2V1 (noir), P12V3 (rouge) et P12V3 complémentés par le plasmide vide pMP828 (vert) ou par le pMP828-*fupA/B* (bleu).

III-4. Construction de LVSΔ*fupA/B*

Dans une seconde étape, et afin de s'affranchir d'un effet possible de la mutation de l'UDP-4-glucose épimérase observée dans le mutant d'évolution P12V3, nous avons entrepris la construction d'une souche LVS « knock out » pour *fupA/B* (LVSΔ*fupA/B*). Le protocole repose sur un processus de double recombinaison très délicat à mettre en œuvre et dont la réalisation a nécessité plus de neuf mois de travail. En particulier nous avons essuyé des échecs répétés dus à la présence de très nombreuses transposases non annotées dans le génome. C'est pour contourner cet obstacle que nous avons choisi de procéder à une recombinaison non pas avec les gènes adjacents à *fupA/B* (FTL_0439) mais avec le gène en amont (FTL_0438) et la partie 3' de FTL_0439. Ainsi que l'illustre la figure 19A, à l'issue de la sélection sur sucrose nous avons obtenus deux types de colonies, grosses (1, 2) ou petites (3, 4, 6). La PCR effectuée avec des amorces bordant *fupA/B* a montré que la délétion de ce gène était effective pour les petites colonies (Figure 19B), délétion confirmée par un défaut d'expression de la protéine évaluée par WB (Figure 19C). Si la taille des colonies de LVSΔ*fupA/B* sur sucrose est plus petite que celle de la souche

sauvage, leur croissance en milieu liquide est comparable au cours du temps ce qui permet de mesurer les CMI des 2 souches (Figure 19D).

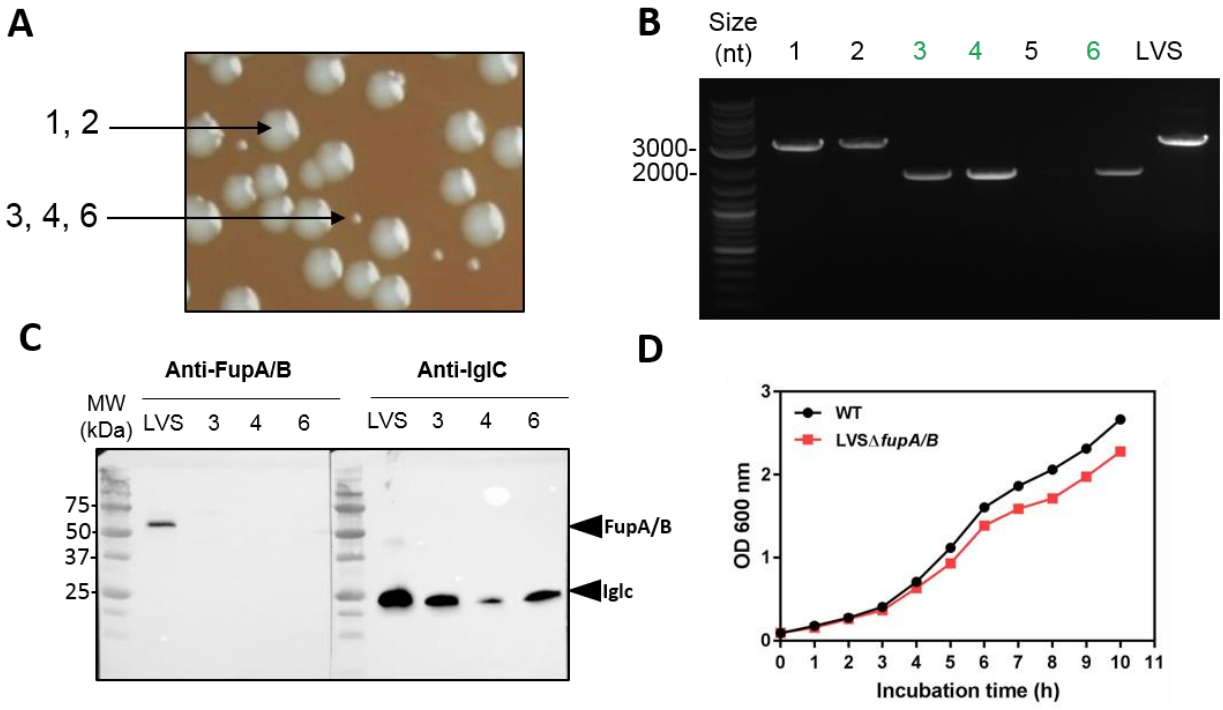


Figure 19. Construction de la souche LVSΔ*fupA/B*
A. Aspect des colonies sur gélose chocolat + PVX + sucrose 5%
B. PCR de contrôle de la délétion du gène *fupA/B*. Les petites colonies sont indiquées en vert.
C. Expression de FupA/B évaluée par WB sur la souche LVS et les petites colonies (colonies 3, 4, 6)
D. Croissance bactérienne en milieu liquide Mueller Hinton modifié

III-5. Evaluation des CMI après complémentation de LVS-Δ*fupA/B*

Comme dans le cas du mutant d'évolution, l'expression de FupA/B et les CMI ont été mesurées pour la souche sauvage, le mutant LVSΔ*fupA/B* (rouge) ainsi que pour le mutant complémenté avec le plasmide pMP828 vide (vert) ou pMP828-*fupA/B* (bleu).

La Figure 20 montre que des profils strictement comparables ont été obtenus, ce qui valide le rôle de FupA/B dans la résistance aux FQ. On notera dans ce dernier cas des valeurs de CMI beaucoup plus faibles que pour les mutants d'évolution ce qui s'explique par le fait que nous n'avons pas de mutation sur l'ADN gyrase.

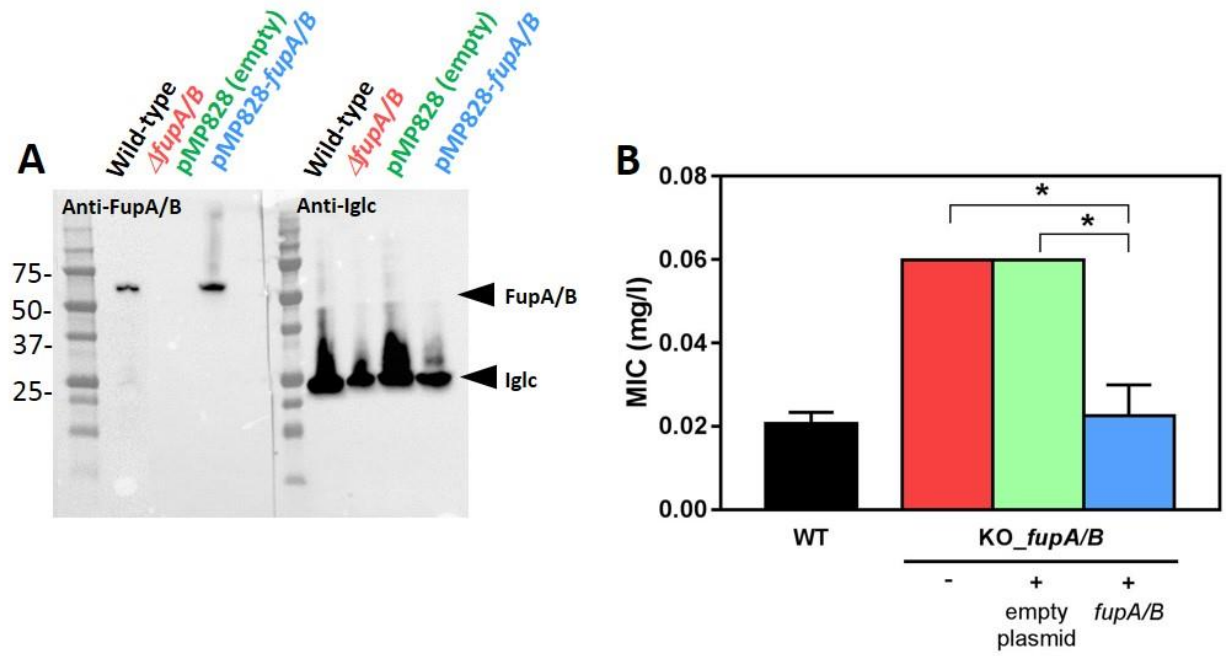


Figure 20. CMI du mutant LVSΔ*fupA/B*

A. Western-blot des souches LVS ou LVSΔ*fupA/B* transformées par pMP828 ou pMP828-*fupA/B*
B. Evaluation des CMI à la ciprofloxacine de la souche LVS (noir), du mutant LVSΔ*fupA/B* (rouge), de LVSΔ*fupA/B* complémenté avec le plasmide vide (vert) ou pMP828-*fupA/B* (bleu)

IV- ANALYSE DE L'EXPRESSION DE FUPA DANS DES ISOLATS CLINIQUES

IV-1. Analyse de l'expression de la protéine par WB

Une soixantaine de souches cliniques de *F. tularensis holarctica* de la collection *Francisella* du CNR a été analysé par WB pour voir si la protéine FupA était exprimée ou non dans ces bactéries. La Figure 21 qui correspond aux souches 1 à 9 est représentative des résultats obtenus sur les 63 souches testées qui expriment sans exception la protéine FupA à la taille attendue. Bien que l'intensité du signal soit plus faible pour certains isolats, aucune souche ne présente un défaut d'expression ce qui signifie que le gène n'est pas altéré.

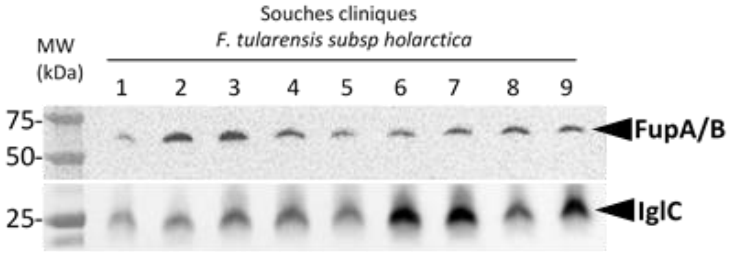


Figure 21. Expression de FupA chez différentes souches cliniques de *F. tularensis* de Type B

Western-blot réalisé à partir de souches cliniques de la collection *Francisella* du CNR. L'anti FupA/B reconnait la protéine FupA qui est exprimée chez toutes les souches. L'ant-IglC a été utilisé en tant que témoin positif de l'expérimentation.

IV-2. Analyse de la séquence du gène *fupA* à partir de prélèvements biologiques

Le CNR dispose d'une collection de prélèvements biologiques et en particulier de prélèvements ganglionnaires de patients positifs pour *Francisella* mais à partir desquels les souches n'ont pas pu être isolées. De plus ces patients présentent la caractéristique d'être en échecs thérapeutiques ou rechutes. L'une des hypothèses pouvant expliquer ce constat clinique serait l'apparition pour ces patients de clones résistants aux FQ. Ainsi afin de vérifier l'intégrité du gène *fupA* dans ces échantillons nous avons procédé par PCR/séquençage. Dans la mesure où il est difficile voire impossible d'amplifier de longs fragments de PCR à partir de ce type de prélèvements nous nous sommes plus spécifiquement intéressés à la région 5' du gène où l'on observe les mutations *in vitro*. Un PCR « nichée » a été utilisée pour palier à la faible quantité de matériel. Le couple d'amorces utilisé, FTA0461_F/FTA0461_R, figure dans le Tableau S1 en Annexes. Au moment de la rédaction de ce manuscrit 14 amplicons ont été séquencées. Les résultats montrent qu'aucun des isolats ne présente des mutations du gène *fupA*.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les travaux de recherche décrits dans ce manuscrit et que j'ai réalisé dans le cadre de ma Thèse d'Exercice ont permis de démontrer qu'un défaut d'expression de FupA/B était corrélé avec une augmentation de la résistance aux FQ de la souche LVS de *F. tularensis*. Cette conclusion découle de la combinaison d'approches biochimiques et génétiques dont la construction d'une souche LVSΔ*fupA/B* qui a permis de valider notre hypothèse de départ.

FupA/B est une protéine membranaire associée à la virulence et à l'acquisition du fer par les bactéries du genre *Francisella* (18,64) mais aucun lien avec la résistance aux FQ n'a été rapporté jusque-là. Cette protéine correspond à la fusion entre les protéines FupA et FupB présentes dans les souches cliniques de *F. tularensis* (Schu S4, FT6) ou chez *F. novicida*. La mutation sur FupA/B qui accompagne l'augmentation de la résistance intervient dans la région N-terminale de la protéine. Cette observation couplée aux données obtenues à partir de mutants de *F. novicida* résistants aux FQ (61), suggère que pour les souches cliniques de *F. tularensis* la résistance est portée par FupA qui correspond à la partie N-terminale de la protéine de fusion FupA/B. Afin de démontrer plus formellement cette hypothèse une collaboration a récemment été initiée avec l'équipe du Pr Anders Sjöstedt (Département de Microbiologie, Université d'Umea, Suède). Cette équipe s'intéresse en effet depuis plusieurs années au rôle de ces protéines et dispose de mutants de délétion Δ*fupA*, Δ*fupB* et Δ*fupA*Δ*fupB* de la souche hautement virulente *F. tularensis* Schu S4. La mesure de la CMI pour la ciprofloxacine sur ces mutants est actuellement en cours. En parallèle, nous allons regarder ce qu'il en est pour *F. novicida* en utilisant les clones d'une banque de transposons (*bei* resources).

En partant du postulat que l'expression de FupA pouvait être un marqueur de la résistance aux FQ, nous avons produit un anticorps dirigé contre la partie N-terminale de FupA/B, partie conservée dans la protéine FupA des autres espèces de *Francisella.* Pour toutes les espèces testées (*F. novicida, F. tularensis, F. philomiragia*), notre anticorps reconnait une protéine de 58 kDa qui correspond à la taille attendue. En revanche, aucun signal n'a été observé avec les sérums pré-immuns, ni vis-à-vis des mutants de délétion *fupA/B.* Ceci témoigne de la spécificité de l'anticorps pour la protéine d'intérêt chez *Francisella.*

La disponibilité de cet anticorps nous a permis d'analyser l'expression de la protéine à partir des souches cliniques de la collection du CNR. Les résultats obtenus sur une soixantaine d'isolats ont montré que la protéine était exprimée dans tous les cas. Ces résultats ne sont pas surprenants au regard des conditions d'isolement de ces souches cliniques qui intervient toujours avant initiation

du traitement adapté. Ceci est également corrélé avec le fait qu'à ce jour aucune souche résistante n'a été isolée.

Comme mentionné dans l'Introduction, la culture des bactéries du genre *Francisella* est fastidieuse. Il est tout à fait concevable que l'acquisition de la résistance entraine des mutations qui aient un coût en termes de fitness comme cela a été rapporté dans la littérature pour d'autres bactéries telles que *Mycobacterium tuberculosis* et *Streptococcus pneumoniae* (68–70). Ceci pourrait expliquer que des bactéries mutées soient difficilement cultivables. Il est par ailleurs important de souligner qu'à travers les travaux de recherche que je réalise dans le cadre de ma Thèse de Science, j'ai mis en évidence que la souche LVSΔ*fupA/B* produisait plus de biofilm que la souche LVS. Il est décrit que le biofilm joue un rôle de bouclier pour les bactéries (71). Sa formation est en effet associée à une augmentation de leur résistance face à la réponse immunitaire de l'hôte. De plus, au sein du biofilm, les bactéries sont dans un environnement pauvre en nutriments qui favorise un état stationnaire et rendent inefficaces de nombreux antibiotiques. Ceci suggère qu'une délétion de FupA chez les isolats cliniques, pourrait, en favorisant la formation de biolfilms, avoir des conséquences directes sur la résistance aux antibiotiques et altérer la croissance bactérienne. Ce dernier point pourrait rendre compte du faible taux d'isolats obtenus.

Afin d'analyser des souches cliniques potentiellement résistantes aux FQ et dont aucun isolat n'est disponible, nous avons décidé de rechercher des mutations de *fupA* par PCR/séquençage à partir d'extraits d'ADN de prélèvements de patients infectés. Cette approche a été récemment déclinée au CNR *Francisella* vis-à-vis des gènes cibles des FQ que sont les ADN gyrases (Caspar et al. sous presse). De manière surprenante, bien que cette étude se soit focalisée sur des prélèvements de patients en situation d'échecs thérapeutiques ou rechutes, aucune mutation des ADN gyrases n'a été retrouvée. Les résultats que nous avons obtenus ont montré qu'il en était de même pour *fupA*, dont l'analyse par PCR/séquençage n'a révélé aucune mutation.

Ce travail de thèse a apporté la démonstration d'un lien entre FupA/B et la résistance aux FQ. Nous pensons que cet effet est porté par la partie N-terminale de FupA/B ou FupA pour les souches cliniques. A ce jour nous n'avons toutefois pas directement mis en évidence de défaut d'expression de cette protéine dans les souches du CNR ou de mutations sur *fupA* dans les prélèvements testés. L'objectif à court terme est d'élargir l'analyse à l'ensemble des isolats et échantillons disponibles au CNR. Bien que nous ayons orienté notre hypothèse sur un rôle de FupA, il n'est pas exclu que l'acteur de la résistance aux FQ chez *Francisella tularensis subsp holarctica* soit FupB. En

fonction des résultats de CMI sur les mutants de *F. tularensis* Schu S4 et de *F. novicida* notre hypothèse de travail sera peut-être à reconsidérer.

Enfin, et au-delà de la recherche d'un nouveau marqueur de résistance aux FQ chez *F. tularensis*, les résultats de mon travail de thèse ouvrent aussi la voie à l'optimisation des méthodes d'isolement des souches cliniques en tenant compte de la formation potentielle de biofilms mais aussi d'une carence en fer de ces bactéries.

CONCLUSION

THESE SOUTENUE PAR : Claire SIEBERT

TITRE :

Recherche d'un nouveau marqueur de résistance aux fluoroquinolones chez *Francisella tularensis*

CONCLUSION :

Francisella tularensis, agent étiologique de la tularémie, est une bactérie coccobacille à Gram négatif intracellulaire facultative, hautement pathogène chez l'homme. Il s'agit d'une bactérie à fort pouvoir infectieux dans la mesure où l'inhalation de 10 bactéries suffit à entrainer la maladie. Ces critères de pathogénicité et de virulence justifient son classement comme agent du bioterrorisme de classe A par le CDC. Les données microbiologiques et cliniques indiquent que les FQ représentent la meilleure alternative pour traiter la tularémie. Toutefois, l'utilisation excessive des FQ au cours des deux dernières décennies est à l'origine d'une augmentation de la prévalence de bactéries résistantes, ce qui pose un réel problème de santé publique. C'est pourquoi la compréhension des mécanismes d'acquisitions de la résistance aux FQ chez *Francisella* est primordiale, d'autant plus que celle-ci peut être utilisée en tant qu'arme biologique.

Le séquençage de génomes de mutants de *F. tularensis* LVS résistants aux FQ obtenus *in vitro* a mis en évidence, des mutations sur *gyrA* et *gyrB* qui sont la cible de ces antibiotiques. Nous avons aussi observé que ces mutants se caractérisaient par l'apparition de mutations fréquentes du gène *fupA/B*. L'objectif de mon travail de Thèse a donc été de rechercher un lien entre la protéine FupA/B et la résistance aux FQ par une combinaison d'approches biochimiques et génétiques.

Dans un premier temps j'ai exprimé et purifié une forme soluble recombinante de FupA/B qui a servi à produire un anticorps polyclonal, outil précieux pour la suite de mes recherches. J'ai ensuite démontré que la protéine FupA/B jouait un rôle dans la résistance de *Francisella* aux FQ par deux approches : la complémentation ou la délétion du gène. En effet, l'évaluation des CMI des mutants d'évolution résistants aux FQ complémentés par le gène *fupA/B* montre que l'expression de la protéine FupA/B vérifiée par WB, restaure la sensibilité aux FQ. Ces résultats ont été confirmés *via* la génération d'une souche LVS « knock out » pour la protéine FupA/B. En effet, de la même manière, la complémentation de la souche LVSΔ*fupA/B* par le gène *fupA/B* entraine une diminution de la CMI par rapport à la souche sauvage.

La protéine FupA/B de la souche LVS, est une protéine hybride qui correspond aux protéines FupA et FupB chez les isolats cliniques et chez *F. novicida*. L'observation de mutations du gène *fupA* chez *F. novicida* résistants aux FQ nous a amené à considérer ce gène comme cible potentielle. En conséquent, j'ai d'une part analysé l'expression de FupA dans des isolats cliniques de la collection *Francisella* du CNR et d'autre part recherché des mutations par PCR/séquençage sur des ADN extraits de prélèvements. Les résultats ont montré qu'aucune des souches analysées ne présentait un défaut d'expression ce qui signifie que le gène n'est pas altéré. De plus aucune mutation du gène *fupA* n'a été mise en évidence par PCR/séquençage.

En conclusion, au cours de ce travail j'ai démontré qu'un défaut d'expression de FupA/B était corrélé avec une augmentation de la résistance aux FQ de la souche LVS de *F. tularensis*. Nous n'avons pas directement mis en évidence des mutations de *fupA* dans les prélèvements cliniques testés. L'objectif à court terme est donc d'élargir l'analyse à l'ensemble des isolats et échantillons disponibles au CNR. Le rôle de FupB sera aussi à considérer.

Enfin, et au-delà de la recherche d'un nouveau marqueur de résistance aux FQ chez *F. tularensis*, les résultats de mon travail de Thèse ouvrent la voie à l'optimisation des méthodes d'isolement des souches cliniques en tenant compte de la formation potentielle de biofilms mais aussi d'une carence en fer de ces bactéries.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le : 04/05/17

LE DOYEN

Pour la Présidente
et par délégation
Le Doyen de Pharmacie
Pr. Michel SEVE

Pr. Michel SEVE

LE PRESIDENT DE LA THESE

Pr Patrice FAURE

BIBLIOGRAPHIE

1. Sjöstedt A. Tularemia: History, Epidemiology, Pathogen Physiology, and Clinical Manifestations. Ann N Y Acad Sci. 1 juin 2007;1105(1):1‑29.

2. McCoy G, Chapin CW. Further observations on a plague like disease of rodents with a preliminary note on the causative agent, bacterium tularense. J Infect Dis. janv 1912;10(1):61‑72.

3. Wherry WB, Lamb BH. Infection of man with Bacterium tularense. 1914. J Infect Dis. 1 avr 2004;189(7):1321‑9.

4. Francis E. Tularemia. JAMA. 16 déc 1983;250(23):3216‑24.

5. Ellis J, Oyston PCF, Green M, Titball RW. Tularemia. Clin Microbiol Rev. oct 2002;15(4):631‑46.

6. Ritter DB, Gerloff RK. Deoxyribonucleic acid hybridization among some species of the genus Pasteurella. J Bacteriol. déc 1966;92(6):1838‑9.

7. Dorofe'ev, K.A. Classification of the causative agent of tularemia. Works Inst. Epidemiol. Mikrobiol. Chita. 1947;1:170-180.

8. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proc Natl Acad Sci U S A. juin 1990;87(12):4576‑9.

9. Forsman M, Sandström G, Sjöstedt A. 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. janv 1994;44(1):38‑46.

10. Larsson P, Oyston PCF, Chain P, Chu MC, Duffield M, Fuxelius H-H, et al. The complete genome sequence of Francisella tularensis, the causative agent of tularemia. Nat Genet. févr 2005;37(2):153‑9.

11. Challacombe JF, Petersen JM, Gallegos-Graves LV, Hodge D, Pillai S, Kuske CR. Whole-Genome Relationships among Francisella Bacteria of Diverse Origins Define New Species and Provide Specific Regions for Detection. Appl Environ Microbiol. 2 janv 2017;83(3):e02589-16.

12. Olsufiev NG, Emelyanova OS, Dunayeva TN. Comparative study of strains of B. tularense in the old and new world and their taxonomy. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol. 1959;3:138‑49.

13. Chaudhuri RR, Ren C-P, Desmond L, A. Vincent G, Silman NJ, Brehm JK, et al. Genome Sequencing Shows that European Isolates of Francisella tularensis Subspecies tularensis Are Almost Identical to US Laboratory Strain Schu S4. PLoS ONE [Internet]. 4 avr 2007 [cité 1 mars 2017];2(4). Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1832225/

14. Maurin M, Gyuranecz M. Tularaemia: clinical aspects in Europe. Lancet Infect Dis. janv 2016;16(1):113‑24.

15. Keim P, Johansson A, Wagner DM. Molecular Epidemiology, Evolution, and Ecology of Francisella. Ann N Y Acad Sci. 1 juin 2007;1105(1):30‑66.

16. Eigelsbach HT, Downs CM. Prophylactic Effectiveness of Live and Killed Tularemia Vaccines. J Immunol. 1 oct 1961;87(4):415‑25.

17. Burke DS. Immunization against tularemia: analysis of the effectiveness of live Francisella tularensis vaccine in prevention of laboratory-acquired tularemia. J Infect Dis. janv 1977;135(1):55‑60.

18. Salomonsson E, Kuoppa K, Forslund A-L, Zingmark C, Golovliov I, Sjöstedt A, et al. Reintroduction of Two Deleted Virulence Loci Restores Full Virulence to the Live Vaccine Strain of Francisella tularensis. Infect Immun. août 2009;77(8):3424‑31.

19. Larsson P, Elfsmark D, Svensson K, Wikström P, Forsman M, Brettin T, et al. Molecular Evolutionary Consequences of Niche Restriction in Francisella tularensis, a Facultative Intracellular Pathogen. PLoS

Pathog [Internet]. juin 2009 [cité 1 mars 2017];5(6). Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2688086/

20. Huber B, Escudero R, Busse H-J, Seibold E, Scholz HC, Anda P, et al. Description of Francisella hispaniensis sp. nov., isolated from human blood, reclassification of Francisella novicida (Larson et al. 1955) Olsufiev et al. 1959 as Francisella tularensis subsp. novicida comb. nov. and emended description of the genus Francisella. Int J Syst Evol Microbiol. août 2010;60(Pt 8):1887‑96.

21. Jensen WI, Owen CR, Jellison WL. Yersinia philomiragia sp. n., a New Member of the Pasteurella Group of Bacteria, Naturally Pathogenic for the Muskrat (Ondatra zibethica). J Bacteriol. déc 1969;100(3):1237‑41.

22. Hollis DG, Weaver RE, Steigerwalt AG, Wenger JD, Moss CW, Brenner DJ. Francisella philomiragia comb. nov. (formerly Yersinia philomiragia) and Francisella tularensis biogroup novicida (formerly Francisella novicida) associated with human disease. J Clin Microbiol. juill 1989;27(7):1601‑8.

23. Caipang CMA, Kulkarni A, Brinchmann MF, Korsnes K, Kiron V. Detection of Francisella piscicida in Atlantic cod (Gadus morhua L) by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction. Vet J Lond Engl 1997. juin 2010;184(3):357‑61.

24. Brevik OJ, Ottem KF, Kamaishi T, Watanabe K, Nylund A. Francisella halioticida sp. nov., a pathogen of farmed giant abalone (Haliotis gigantea) in Japan. J Appl Microbiol. nov 2011;111(5):1044‑56.

25. Qu P-H, Chen S-Y, Scholz HC, Busse H-J, Gu Q, Kämpfer P, et al. Francisella guangzhouensis sp. nov., isolated from air-conditioning systems. Int J Syst Evol Microbiol. oct 2013;63(Pt 10):3628‑35.

26. Maurin M. Francisella tularensis as a potential agent of bioterrorism? Expert Rev Anti Infect Ther. févr 2015;13(2):141‑4.

27. Oyston PCF, Sjöstedt A, Titball RW. Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in Francisella tularensis. Nat Rev Microbiol. déc 2004;2(12):967‑78.

28. Kingry LC, Petersen JM. Comparative review of Francisella tularensis and Francisella novicida. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 13 mars 2014 [cité 1 mars 2017];4. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3952080/

29. Weinberg AN, Branda JA. Case 31-2010. N Engl J Med. 14 oct 2010;363(16):1560‑8.

30. Petersen JM, Mead PS, Schriefer ME. Francisella tularensis: an arthropod-borne pathogen. Vet Res [Internet]. 2009 [cité 1 mars 2017];40(2). Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2695023/

31. Thelaus J, Andersson A, Broman T, Bäckman S, Granberg M, Karlsson L, et al. Francisella tularensis Subspecies holarctica Occurs in Swedish Mosquitoes, Persists Through the Developmental Stages of Laboratory-Infected Mosquitoes and Is Transmissible During Blood Feeding. Microb Ecol. 2014;67(1):96‑107.

32. Broman T, Thelaus J, Andersson A-C, Bäckman S, Wikström P, Larsson E, et al. Molecular Detection of Persistent Francisella tularensis Subspecies holarctica in Natural Waters. Int J Microbiol [Internet]. 2011 [cité 1 mars 2017];2011. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2946586/

33. El-Etr SH, Margolis JJ, Monack D, Robison RA, Cohen M, Moore E, et al. Francisella tularensis Type A Strains Cause the Rapid Encystment of Acanthamoeba castellanii and Survive in Amoebal Cysts for Three Weeks Postinfection. Appl Environ Microbiol. déc 2009;75(23):7488‑500.

34. Meshcheryakova IS, Mikhailova TV, Demidova TN, Kormilitsyna MI. [THE EPIZOOTIC AND EPIDEMIC ACTIVITY OF NATURAL TULAREMIA FOCI OF DIFFERENT LANDSCAPE EPIDEMIOLOGICAL TYPES IN 2009-2014]. Med Parazitol (Mosk). mars 2016;(1):42‑6.

35. Pérez-Castrillón JL, Bachiller-Luque P, Martín-Luquero M, Mena-Martín FJ, Herreros V. Tularemia epidemic in northwestern Spain: clinical description and therapeutic response. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 15 août 2001;33(4):573‑6.

36. Mailles A, Vaillant V. 10 years of surveillance of human tularaemia in France. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 13 nov 2014;19(45):20956.

37. Hepburn MJ, Simpson AJH. Tularemia: current diagnosis and treatment options. Expert Rev Anti Infect Ther. avr 2008;6(2):231‑40.

38. Karatuna O, Celebi B, Can S, Akyar I, Kilic S. The use of Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in the identification of Francisella tularensis. Bosn J Basic Med Sci. 15 janv 2016;16(2):132‑8.

39. Harik NS. Tularemia: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. Pediatr Ann. 1 juill 2013;42(7):288‑92.

40. Thomas R, Johansson A, Neeson B, Isherwood K, Sjöstedt A, Ellis J, et al. Discrimination of Human Pathogenic Subspecies of Francisella tularensis by Using Restriction Fragment Length Polymorphism. J Clin Microbiol. janv 2003;41(1):50‑7.

41. Skottman T, Piiparinen H, Hyytiäinen H, Myllys V, Skurnik M, Nikkari S. Simultaneous real-time PCR detection of Bacillus anthracis, Francisella tularensis and Yersinia pestis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. mars 2007;26(3):207‑11.

42. Sjöstedt A, Sandström G, Tärnvik A, Jaurin B. Nucleotide sequence and T cell epitopes of a membrane protein of Francisella tularensis. J Immunol Baltim Md 1950. 1 juill 1990;145(1):311‑7.

43. Fulop M, Leslie D, Titball R. A rapid, highly sensitive method for the detection of Francisella tularensis in clinical samples using the polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg. avr 1996;54(4):364‑6.

44. Thelaus J, Andersson A, Mathisen P, Forslund A-L, Noppa L, Forsman M. Influence of nutrient status and grazing pressure on the fate of Francisella tularensis in lake water. FEMS Microbiol Ecol. janv 2009;67(1):69‑80.

45. Birdsell DN, Vogler AJ, Buchhagen J, Clare A, Kaufman E, Naumann A, et al. TaqMan Real-Time PCR Assays for Single-Nucleotide Polymorphisms Which Identify Francisella tularensis and Its Subspecies and Subpopulations. PLoS ONE [Internet]. 19 sept 2014 [cité 28 mars 2017];9(9). Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4169575/

46. Maurin M, Pelloux I, Brion JP, Del Banõ J-N, Picard A. Human tularemia in France, 2006-2010. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. nov 2011;53(10):e133-141.

47. Versage JL, Severin DDM, Chu MC, Petersen JM. Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of Francisella tularensis in complex specimens. J Clin Microbiol. déc 2003;41(12):5492‑9.

48. Kugeler KJ, Pappert R, Zhou Y, Petersen JM. Real-time PCR for Francisella tularensis types A and B. Emerg Infect Dis. nov 2006;12(11):1799‑801.

49. Tärnvik A, Chu MC. New Approaches to Diagnosis and Therapy of Tularemia. Ann N Y Acad Sci. 1 juin 2007;1105(1):378‑404.

50. Dennis DT, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, et al. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. JAMA. 6 juin 2001;285(21):2763‑73.

51. Wayne. Clinical and Laboratory Standards Institute, Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. USACLSI; 2010.

52. Ikäheimo I, Syrjälä H, Karhukorpi J, Schildt R, Koskela M. In vitro antibiotic susceptibility of Francisella tularensis isolated from humans and animals. J Antimicrob Chemother. août 2000;46(2):287‑90.

53. Valade E, Vaissaire J, Mérens A, Hernandez E, Gros C, Le Doujet C, et al. Susceptibility of 71 French isolates of Francisella tularensis subsp. holarctica to eight antibiotics and accuracy of the Etest® method. J Antimicrob Chemother. 1 juill 2008;62(1):208‑10.

54. Jaing CJ, McLoughlin KS, Thissen JB, Zemla A, Gardner SN, Vergez LM, et al. Identification of Genome-Wide Mutations in Ciprofloxacin-Resistant F. tularensis LVS Using Whole Genome Tiling Arrays and Next Generation Sequencing. PloS One. 2016;11(9):e0163458.

55. Loveless BM, Yermakova A, Christensen DR, Kondig JP, Heine III HS, Wasieloski LP, et al. Identification of ciprofloxacin resistance by SimpleProbe™, High Resolution Melt and Pyrosequencing™ nucleic acid analysis in biothreat agents: Bacillus anthracis, Yersinia pestis and Francisella tularensis. Mol Cell Probes. juin 2010;24(3):154‑60.

56. Sutera V, Levert M, Burmeister WP, Schneider D, Maurin M. Evolution toward high-level fluoroquinolone resistance in Francisella species. J Antimicrob Chemother. janv 2014;69(1):101‑10.

57. Lesher GY, Froelich EJ, Gruett MD, Bailey JH, Brundage RP. 1,8-NAPHTHYRIDINE DERIVATIVES. A NEW CLASS OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS. J Med Pharm Chem. sept 1962;91:1063‑5.

58. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. Biochemistry (Mosc). 18 mars 2014;53(10):1565‑74.

59. Blower TR, Williamson BH, Kerns RJ, Berger JM. Crystal structure and stability of gyrase–fluoroquinolone cleaved complexes from Mycobacterium tuberculosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 16 févr 2016;113(7):1706‑13.

60. Piton J, Petrella S, Delarue M, André-Leroux G, Jarlier V, Aubry A, et al. Structural insights into the quinolone resistance mechanism of Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase. PloS One. 18 août 2010;5(8):e12245.

61. Caspar Y, Siebert C, Sutera V, Villers C, Aubry A, Mayer C, et al. Functional Characterization of the DNA gyrases in Fluoroquinolone-resistant Mutants of Francisella novicida. Antimicrob Agents Chemother. 6 févr 2017;

62. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. Trends Microbiol. août 2014;22(8):438‑45.

63. Twine S, Byström M, Chen W, Forsman M, Golovliov I, Johansson A, et al. 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. Infect Immun. déc 2005;73(12):8345‑52.

64. Lindgren H, Honn M, Golovlev I, Kadzhaev K, Conlan W, Sjöstedt A. The 58-kilodalton major virulence factor of Francisella tularensis is required for efficient utilization of iron. Infect Immun. oct 2009;77(10):4429‑36.

65. Huntley JF, Conley PG, Hagman KE, Norgard MV. Characterization of Francisella tularensis outer membrane proteins. J Bacteriol. janv 2007;189(2):561‑74.

66. LoVullo ED, Molins-Schneekloth CR, Schweizer HP, Pavelka MS. Single-copy chromosomal integration systems for Francisella tularensis. Microbiology. avr 2009;155(Pt 4):1152‑63.

67. de Bruin OM, Duplantis BN, Ludu JS, Hare RF, Nix EB, Schmerk CL, et al. The biochemical properties of the Francisella pathogenicity island (FPI)-encoded proteins IglA, IglB, IglC, PdpB and DotU suggest roles in type VI secretion. Microbiol Read Engl. déc 2011;157(Pt 12):3483‑91.

68. Andersson DI. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? Curr Opin Microbiol. oct 2006;9(5):461‑5.

69. Rifat D, Campodónico VL, Tao J, Miller JA, Alp A, Yao Y, et al. In vitro and in vivo fitness costs associated with Mycobacterium tuberculosis RpoB mutation H526D. Future Microbiol. 27 mars 2017;

70. Rozen DE, McGee L, Levin BR, Klugman KP. Fitness Costs of Fluoroquinolone Resistance in Streptococcus pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother. févr 2007;51(2):412‑6.

71. Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nat Rev Microbiol. 11 2016;14(9):563‑75.

ANNEXES

Protocole 1. Préparation de bactéries *E.coli* Top10 et BL21 (DE3) chimiocompétentes

- Faire une pré-culture en milieu liquide (LB) sur la nuit (+ streptomycine pour les TOP10)
- Diluer la pré-culture le matin pour atteindre une DO_{600nm} de 0,2 (+ streptomycine pour les TOP10)
- Incuber à 30°C sous agitation (200 rpm) jusqu'à DO_{600nm} : 0,5-0,6
- Travailler ensuite dans la glace
- Centrifuger les bactéries à 4°C 10 minutes à 4000 rpm
- Resuspendre le culot avec 1/5 du volume initial avec une solution de $MgCl_2$ 100 mM
- Laisser dans la glace 10 minutes
- Centrifuger les bactéries à 4°C 10 minutes à 4000 rpm
- Resuspendre le culot avec 1/50 du volume initial avec une solution de $CaCl_2$ 100mM et glycérol 15%
- Laisser dans la glace 10 minutes
- Aliquoter les bactéries (30 µl)
- Congeler dans l'azote liquide et conserver à -80°C

Protocole 2. Préparation de bactéries *Francisella* LVS électrocompétentes

- Faire une pré-culture en milieu liquide (Schaedler K3) sur la nuit à 37°C
- Pour 50 ml de bactéries, préparer 5 erlens de 10 ml, ajustées à une DO de 0,1.
- Incuber à 37°C jusqu'à une DO_{600nm} de 0,5 à 0,7 (en moyenne 5h)
- Travailler ensuite à 4°C
- Centrifuger les bactéries 15 min à 4000 rpm
- Réaliser 3 lavages en sucrose 0,5 M
- Concentrer les bactéries 25 fois dans du sucrose 0,5 M et faire des aliquotes de 200 µl avant congélation à -80°C sans étape dans l'azote liquide.

Protocole 3. Electroporation

- Mettre 2 µg de plasmide (ou plus) dans 200 µl de bactéries électrocompétentes
- Laisser en contact 30 min sur glace
- Electroporer : Electroporateur GenePulser à 2,5 kV, 200 Ω et 25 µF
- Ajouter 1 ml de Schaedler K3
- Incuber 6 h à 37°C, 150 rpm

- Etaler la kanamycine sur gélose chocolat PolyViteX pour obtenir une concentration de 10 µg/ml (volume de la boite 20 ml, on peut étaler 200 µl à 1 mg/ml)
- Etaler 100 µl, 200 µl et 500 µl de suspension bactérienne sur gélose chocolat PolyViteX + kanamycine 10 µg/ml
- Incuber à 37°C sous CO_2

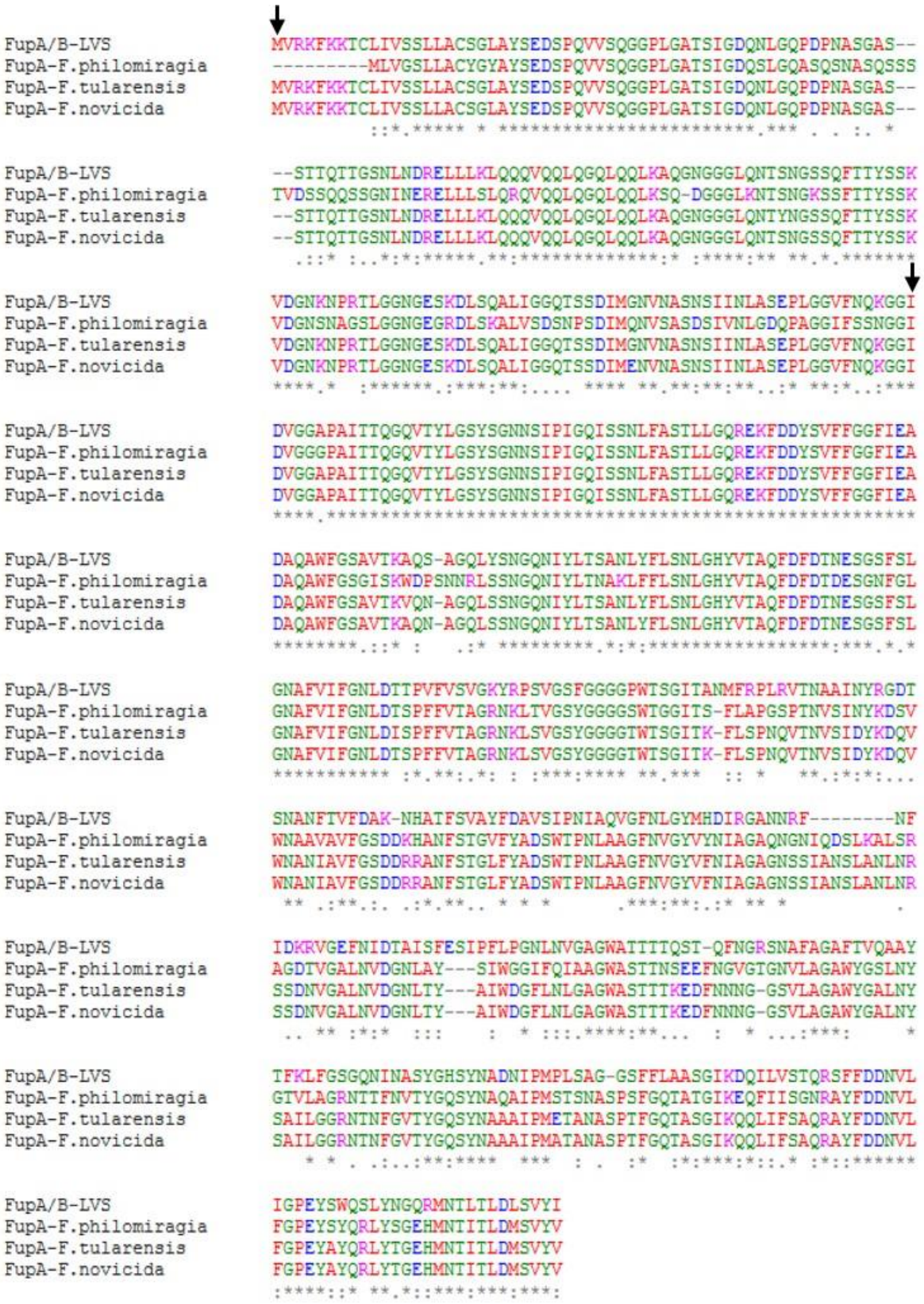
Tableau S1. Liste des amorces utilisées lors de cette étude

Amorces	Séquence 5'-3'	Sites de restriciton
FTL0438_F	AATTAAGCGGCCGCTAGTGCTGGTTGCGGTATCGC	*Not* I
FTL0438_R	TTAAATTGGCATATATGGTGCATACGTCGG	
FTL0439_F	TATGCCAATTTAATGGAGAATTTAATATCGATACCGC	
FTL0439_R	AATTAAGGATCCGATATAAACTGAAAGATCTAATG	*Bam*HI
pflsA_F	CATTTTATCCGGACTACATGATAATGATAACGAATATC	*Bsp* EI
pfslA_R	GTGAAAAGGATCCCGCAATAATCACTATCCAGAAG	*Bam*HI
FupA/B_F	CAACAAGTCCGGATTTGGTTTGCCAATTTTTTATTAG	*Bsp* EI
FupA/B_R	CCTAAGAATTCCTCTAAATATGTCTAGATATAAACTG	*Eco* RI
pMP828_1375F	TATCTTTATAGTCCTGTCGGG	
pMP828_1731R	TCTCTGGTTATTGGTCTAGACG	
Nter-FupA/B_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGAAAACCTGTACTTCCAGGGTGTGCGTAAATTTAAAAAAACCTG	
Nter-FupA/B_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATTAGATACCGCCTTTTTGGTTAAAGACGCC	
attB1	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC	
attB2	ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC	
FTL0438_570F	GCTGCAAGTGGTATAGATC	
FTL0441_R	TAATACTTCTTAACTAGTTACTTCC	
FTA0461_F	TTGGATCTGGCTGTCCAAGG	
FTA0461_R	ACTAAGCGCGACTTTGTGAT	

Les sites de restriction sont soulignés.

Figure S1. Alignement des protéines homologues à FupA/B et présentes chez les différentes espèces de *Francisella*

Les flèches noires indiquent la région N-terminale exprimée.



Faculté de Pharmacie,
Université Grenoble Alpes



Serment de Galien

« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

CLAIRE SIEBERT

Recherche d'un nouveau marqueur de résistance aux fluoroquinolones chez *F. tularensis*

RESUME

Francisella tularensis est une bactérie à Gram négatif, hautement pathogène, responsable de la tularémie, pathologie pour laquelle les fluoroquinolones (FQ) sont prescrites en première intention. L'utilisation excessive de ces antibiotiques est à l'origine d'une augmentation inquiétante de la prévalence des bactéries résistantes. De ce fait, la compréhension des mécanismes d'acquisitions de résistances aux FQ et l'identification de nouvelles cibles est d'un intérêt majeur.
Des résultats préliminaires ont montré qu'*in vitro*, l'exposition aux FQ de la souche LVS de *F. tularensis* favorisait la génération de souches hautement résistantes dont 80% portent des mutations de *fupA/B.* L'objectif de mon travail de Thèse d'Exercice a donc été de caractériser le rôle de la protéine codée par ce gène dans la résistance aux FQ.
L'évaluation de la CMI à la ciprofloxacine des mutants d'évolution résistants aux FQ complémentés ou non par *fupA/B* à confirmer qu'un défaut d'expression de FupA/B était associé à la résistance aux FQ. Ces résultats ont été confirmés avec une souche LVSΔ*fupA/B* construite dans ce projet. Dans les souches cliniques, cette protéine est codée par deux gènes distincts, *fupA* et *fupB*. La production d'un anticorps spécifique a permis d'analyser l'expression de FupA dans des isolats cliniques. Nous avons également recherché des mutations du gène à partir d'ADN extrait de prélevements de patients infectés en échec thérapeutique. A ce jour, nos résulats n'ont pas révélé d'altération de l'expression de FupA mais un certain nombre de perspectives sont envisagées, dont l'analyse de biofilms.

MOTS CLES: *Francisella tularensis*, tularémie, résistance, fluoroquinolones, FupA/B

ABSTRACT

Francisella tularensis, is a highly infectious Gram negative pathogen, causing the severe disease tularemia. Fluoroquinolones (FQ) represent the best alternative for the oral therapy of this disease. Over the past decade, the overuse of these antibiotics led to an increased prevalence of resistant bacteria and this is a major public-health problem. As a consequence, a better understanding of the mechanisms of FQ resistance and the identification of new targets is of high importance.
Previous results obtained in the lab showed that the *in vitro* exposure of the LVS strain of *F. tularensis* to FQ generate highly resistant strains, among which 80% are sharing mutations on *fupA/B*. The aim of my thesis was thus to determine whether the FupA/B protein is involved in FQ resistance.
The evaluation of MIC to ciprofloxacin of the evolved FQ-resistant mutants complemented or not with *fupA/B* confirmed that a FupA/B expression defect was indeed correlated with FQ resistance. These results were confirmed using a LVSΔ*fupA/B* strain constructed in this work. In clinical strains, FupA/B is encoded by two distinct genes, *fupA* and *fupB*. The production of a specific antibody targeting FupA allowed to check expression of this protein from clinical isolates. We also looked for mutations within the corresponding gene from DNA extracted from samples of infected patients with treatment failure. To date, our results have not revealed any altered expression of FupA but several perspectives are envisaged including biofilm analyses.

KEY WORDS: *Francisella tularensis*, tularemia, resistance, fluoroquinolones, FupA/B

[Données à caractère personnel]

FILIERE : Pharmacie, D.E.S Innovation Pharmaceutique et Recherche