

Université de Montréal

CARACTÉRISATION DE MUTANTS DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS
RÉSISTANTS À LA STREPTONIGRINE

Par

JULIE BLOUIN

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade
Maître ès sciences (M. Sc.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Avril, 2005

©Julie Blouin, 2005



SF
607
U54
2005
v.023

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

CARACTÉRISATION DE MUTANTS DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS
RÉSISTANTS À LA STREPTONIGRINE

Présenté par

JULIE BLOUIN

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

.....
Serge Messier, président-rapporteur

.....
Mario Jacques, directeur de recherche

.....
François Malouin, codirecteur

.....
Marie Archambault, membre du jury

RÉSUMÉ

Staphylococcus aureus est une bactérie qui fait partie des principaux agents infectieux responsables des cas de mammite bovine. Plusieurs facteurs de virulence ayant un rôle à jouer lors de l'infection ont été mis en évidence. Chez l'hôte, le fer se retrouve rarement à l'état libre et sa disponibilité est d'une importance majeure pour la croissance de pratiquement tous les microorganismes. Il est donc probable que *S. aureus* ait développé plusieurs mécanismes spécifiques à l'obtention de cet élément nutritif essentiel. L'objectif de cette étude est donc de créer des souches de *S. aureus* déficientes au niveau de l'acquisition du fer dans le but d'identifier de nouveaux gènes responsables du phénotype observé. Une technique de mutagenèse par transposon a d'abord été utilisée pour générer une banque de mutants de la souche *S. aureus* RN6390 avec le Tn916. Quatre mutants ont ensuite été isolés suite à une sélection sur un milieu contenant de la streptonigrine. Cet antibiotique, qui nécessite la présence de fer pour son activité inhibitrice, a permis d'isoler des mutants déficients au niveau de l'acquisition du fer. Le gène muté fut ensuite identifié par séquençage, pour trois de ces mutants. Les résultats ont démontrés que le Tn916 s'est inséré dans le gène *flp* (1 497 pb) qui code pour la protéine FLP (FmtA-like protein) chez le mutant LS21; entre les gènes *SAV1476* (175 pb) et *SAV1477* (77 pb), chez le mutant LS22, qui codent respectivement pour une protéine ribosomale 30S et pour une protéine hypothétique; et dans la région promotrice du gène *dapE* (1224 pb) qui code pour la désuccinylase de l'acide N-succinyl-L-L-diaminopimélique (SDAP-déacylase) chez le mutant LS23. La présence d'une boîte Fur a été identifiée en aval du gène *SAV1476* chez le mutant LS22. Par contre, il n'a pas été possible de démontrer, par RT-PCR, une régulation par le fer pour ces gènes. Un modèle de mammite chez la souris a aussi été mis au point et ces trois mutants furent testés avec la souche mère RN6390 Sm^R. Les résultats montrent que la croissance des mutants est légèrement atténuée par rapport à la souche mère, autant en condition *in vivo* qu'*in vitro*. Une hybridation sur des puces à ADN a démontré un profil semblable pour les 4 mutants et révèle que ceux-ci ont des systèmes de transport du fer généralement moins induits que ceux retrouvés chez la souche mère RN6390 Sm^R, dont le système *isd*, impliqué dans le transport de l'hème.

MOTS CLÉS : mammite bovine, *Staphylococcus aureus*, mutagenèse, fer, récepteur, streptonigrine.

SUMMARY

Staphylococcus aureus is one of the most common causes of contagious bovine mastitis. Several virulence factors, which act during infection, have been identified. Within the host, iron is rarely free and its availability is of major importance in bacterial pathogenesis as almost all bacteria require this essential nutrient. However, *S. aureus* is able to survive and grow in an iron-poor environment. It is therefore possible that this microorganism has evolved with different and specific mechanisms to overcome iron restriction permitting the acquisition of the metal from the host environment. The purpose of this study is to create *S. aureus* mutant strains defective in the ability to transport iron and to identify the genes responsible for this phenotype. First, a Tn916 insertion library was created in *S. aureus* RN6390 and four mutants were isolated on a selective media containing streptonigrin, an antibiotic that requires iron for killing cells. The disrupted genes have been identified by sequencing. The results show that, for mutant LS21, the Tn916 insertion occurred in the *flp* gene (1497 bp) which encodes the FLP protein (*fmlA*-like protein); between the genes *SAV1476* (175 bp) and *SAV1477* (77 bp), for the mutant LS22, which encode respectively for a 30S ribosomal protein S1 and for an hypothetical protein; and in the promoter region of the *dapE* gene (1224 bp), for mutant LS23, which encodes the N-succinyl-L-L-diaminopimelic acid desuccinylase (SDAP-deacylase). A Fur box has been identified downstream to the *SAV1476* gene in mutant LS22. The results of the RT-PCR did not demonstrate the iron regulation for these genes. An intramammary mouse model of infection has been described and these three mutants were tested with the wild type *S. aureus* RN6390 Sm^R. Data shows that the growth rate seems lower for the mutants than for the wild type *in vivo* as well as *in vitro*. DNA chips hybridization experiments have shown the same profile for the four mutants and demonstrated that they all have less inductive iron acquisition systems compared to the wild type RN6390 Sm^R, like for the *isd* system, which is implicated in heme uptake.

KEY WORDS: bovine mastitis, *Staphylococcus aureus*, mutagenesis, iron, receptor, streptonigrin.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
SUMMARY	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
DÉDICACE	xiii
REMERCIEMENTS	xiv
I. INTRODUCTION	1
II. RECENSION DE LITTÉRATURE	2
1. Généralités	2
1.1 Famille.....	2
1.2 Caractéristiques phénotypiques	2
1.3 Résistance aux antibiotiques.....	2
1.4 Habitat et pouvoir pathogène.....	3
2. La mammite bovine	4
2.1 Habitat et dissémination	5
2.2 Épidémiologie.....	5
2.3 Pathogénèse	6
2.4 Prévention et traitements	7
3. Facteurs de virulence	9
3.1 Adhésines	9
3.2 Capsule polysaccharidique	9
3.3 Protéine A.....	10
3.4 β -lactamases	10
3.5 Toxines	10
3.6 Acquisition du fer	11
3.6.1 Systèmes d'acquisition directe	15
3.6.1.1 Les hémoprotéines	15
3.6.1.2 La transferrine	20
3.6.1.3 La lactoferrine	22
3.6.1.4 La ferritine	23

3.6.2 Systèmes d'acquisition indirecte	23
3.6.3 Transporteurs ABC chez <i>S. aureus</i>	25
3.6.3.1 SitABC	26
3.6.3.2 SirABC	26
3.6.3.3 FhuCBG/FhuCBD	28
3.6.3.4 SstABCD	30
3.6.3.5 FhuD1 et FhuD2	31
3.6.3.6 HtsABC	32
4. Description du projet	33
III. MÉTHODOLOGIE	35
1. Conditions de croissance des souches bactériennes	35
2. Construction d'une banque de mutants	35
3. Sélection sur streptonigrine	36
4. Analyse des mutants par Southern blot	37
5. Tests de promotion avec différentes sources de fer	38
6. Identification du site d'insertion	39
7. RT-PCR	40
8. Modèle d'infection chez la souris	42
9. Puces à ADN	42
IV. RÉSULTATS	44
1. Construction d'une banque de mutants	44
2. Sélection sur streptonigrine	44
3. Analyse des mutants par Southern blot	45
4. Tests de promotion avec différentes sources de fer	46
5. Identification du site d'insertion	47
6. RT-PCR	58
7. Modèle d'infection chez la souris	60
8. Puces à ADN	61
V. DISCUSSION	63
VI. CONCLUSION	70
VII. BIBLIOGRAPHIE	71
VIII. ANNEXE I	xvi

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Acquisition du fer à l'aide de sidérophores (A) chez les bactéries à Gram négatif et (B) chez les bactéries à Gram positif	13
Figure 2: Représentation schématique de la répression par la protéine Fur	14
Figure 3: Séquence consensus palindromique de la boîte Fur	14
Figure 4: Structure de l'hème.....	15
Figure 5: Modèle illustrant l'hémoglobine	16
Figure 6: Organisation de l'opéron <i>isd</i> chez <i>S. aureus</i>	17
Figure 7: Les gènes <i>idsH</i> et <i>isdI</i> se trouvent dans deux autres régions distinctes du chromosome de <i>S. aureus</i>	18
Figure 8: Modèle illustrant le transport du complexe hème-Fe médié par l'opéron <i>isd</i> chez <i>S. aureus</i>	19
Figure 9: Utilisation du noyau hème par <i>S. aureus</i>	20
Figure 10: (A) Opéron <i>sirDEFG</i> avec les gènes <i>stbA</i> et <i>sirH</i> et (B) alignement des séquences de la boîte Fur identifiée en amont de l'opéron	21
Figure 11: Arrangement génomique des systèmes de transport du fer chez <i>S. aureus</i> Mu50	26
Figure 12: Organisation génétique de l'opéron <i>sirABC</i> chez <i>S. aureus</i> et opéron <i>cbr</i> chez <i>Erwina chrysanthemi</i>	27
Figure 13: Représentation schématique de l'opéron <i>sbn</i> chez <i>S. aureus</i>	28
Figure 14: Organisation schématique de l'opéron <i>fhu</i> (A) de <i>S. aureus</i> et (B) de <i>B. subtilis</i>	29
Figure 15: Organisation de l'opéron <i>sstABCD</i> chez <i>S. aureus</i>	30
Figure 16: Homologie de séquence entre les boîtes Fur identifiées chez <i>S. aureus</i> , la séquence consensus chez <i>E. coli</i> et les séquences des boîtes Fur associées aux gènes <i>sirA</i> et <i>fhuC</i>	31
Figure 17: Modèle illustrant la reconnaissance du complexe protéine-ligand (FhuD2-sidérophore) par le transporteur ABC situé dans la membrane cytoplasmique	32
Figure 18 : Structure chimique de la streptonigrine.....	34

- Figure 19 : Modèle illustrant les sites de restriction de *HindIII* dans l'ADN d'un mutant *S. aureus* par Tn916 et emplacement des amorces utilisées pour le PCR sur l'auto-ligation des fragments d'ADN digéré..... 39
- Figure 20 : Résultats du PCR pour l'amplification du Tn916 sur l'ADN génomique des mutants de *S. aureus* RN6390 Sm^R 45
- Figure 21 : Résultat du profil d'hybridation par Southern blot avec la sonde Tn916 marquée à la DIG. 46
- Figure 22 : Alignement de la séquence *dapE* obtenue après le séquençage de la région adjacente au Tn916 (boîte jaune) chez le mutant LS23 et de la séquence *dapE* chez *S. aureus* Mu50 (Numéro d'accès: AP003364; *SAV2006*). 48
- Figure 23: Modèle illustrant l'insertion du Tn916 dans l'ADN du mutant LS23..... 49
- Figure 24: Alignement de la séquence complémentaire (5' → 3') obtenue après le séquençage de la région adjacente au Tn916 (boîte jaune) chez le mutant LS21 et de la séquence du gène *SAV2441* (*flp*) chez *S. aureus* Mu50 qui code pour la « *fmtA-like protein* » ou FLP (Numéro d'accès: AP003365; *SAV2441*). 50
- Figure 25 : Modèle illustrant l'insertion du Tn916 dans l'ADN du mutant LS21..... 51
- Figure 26: Alignement de la séquence obtenue après le séquençage de la région adjacente au Tn916 (boîte jaune) chez le mutant LS22 et de la séquence du gène *SAV1476* chez *S. aureus* Mu50 qui code pour la « 30S ribosomal protein S1 » (Numéro d'accès: BA000017; *SAV1476*). 52
- Figure 27 : Modèle illustrant l'insertion du Tn916 dans l'ADN du mutant LS22..... 53
- Figure 28: Alignement de la séquence adjacente au Tn916 (boîte jaune) obtenue suite au séquençage du mutant LS22 (avec l'amorce Tn916Dbt) et de la séquence consensus palindromique de la boîte Fur. La boîte verte représente l'amorce Tn916Dbt3 utilisée pour le deuxième séquençage.....54
- Figure 29 : Présence d'une boîte Fur (en vert) en amont du gène homologue à *SAV1477* chez le mutant LS22.....55
- Figure 30 : Alignement de la séquence obtenue suite au séquençage du mutant LS22 avec l'amorce Tn916Dbt3 et de la séquence complémentaire (5' → 3') du gène *SAV1477* (en bleu) qui code pour une protéine hypothétique et de la séquence complémentaire (5' → 3') du gène *SAV1478* (en rouge) qui code pour la cytidylate kinase..... 57
- Figure 31 : Modèle illustrant la disposition des gènes et de la boîte Fur chez le mutant LS22. 57
- Figure 32 : Résultats du RT-PCR sur la souche mère *S. aureus* RN6390 Sm^R en présence et en absence de fer pour les gènes responsables de la résistance à la streptonigrine..... 59

- Figure 33: Graphique illustrant la virulence des mutants LS21 à LS24 de *S. aureus* RN6390 Sm^R par rapport à la souche mère dans un modèle de mammite chez la souris. * : P < 0,001..... 60
- Figure 34: Courbes de croissance de la souche mère *S. aureus* RN6390 Sm^R et de cinq mutants en bouillon MHB sans ajout de tétracycline..... 61
- Figure 35: Voie de synthèse de la DAP, le précurseur de la lysine. 66
- Figure 36: Schéma du vecteur pLTV1 portant le Tn917. xvii
- Figure 37: Résultats d'un PCR permettant l'amplification du gène *erm* porté par le Tn917 sur 15 mutants résistants à la streptonigrine. xix
- Figure 38: Résultats d'un Southern blot sur les mutants par transposon LS1 à LS10 en utilisant la sonde *erm*. L'ADN a été digéré avec l'enzyme de restriction *HindIII*. Contrôle positif : pLTV1..... xix
- Figure 39: Résultats des tests de promotion avec différentes sources de fer pour les mutants de la souche *S. aureus* SHY97-3906, LS1 à LS20. Nombre de mutants incapables d'utiliser les différentes sources de fer..... xx

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des opérons identifiés chez <i>S. aureus</i> , leur substrat et la référence associée	25
Tableau 2 : Résumé de quelques études sur la streptonigrine.....	34
Tableau 3 : Souches bactériennes utilisées	35
Tableau 4 : Souches et conditions étudiées avec les puces à ADN	43
Tableau 5 : Concentration de streptonigrine à laquelle chaque mutant a été isolé	44
Tableau 6 : Résultats des tests de promotion avec différentes sources de fer.....	47
Tableau 7: Résultats de la modulation des gènes connus pour le transport du fer chez les mutants LS21 à LS24.	62

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ABC transporteur : « ATP binding cassette » transporteur

ATP: adénosine triphosphate

ATPase: adénosine triphosphatase

ClfA : « Clumping Factor C »

Da: Dalton

DAP: acide *meso*-diaminopimélique

DEPC: diéthylpyrocarbonate

DO₆₀₀: densité optique à 600 nm

dNTPs: Désoxynucléotides Triphosphate

DtxR: « diphtheria toxin regulator »

Fhu: « ferric hydroxamate uptake »

FnBPA/FnBPB: « fibronectin-binding protein » A / B

FrpB: « Fur-regulated protein B »

Fur : « Ferric Uptake Regulator »

GAPDH: glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

HarA: « haptoglobin receptor A »

Hts: « heme transport system »

IgG : immunoglobuline G

Isd : « iron-regulated surface determinant »

Kb : kilo base

kDa : kilo Dalton

M : mole / litre

MHA: Mueller-Hinton Agar

MSA: Mannitol Salt Agar

NBT/BCIP: « Nitro Blue Tetrazolium/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate »

pb: paire de bases

PBS: « phosphate buffer saline »

SARM: *S. aureus* résistants à la méthicilline

Sbn: « siderophore biosynthesis »

SDAP-deacylase: N-succinyl-L-L-diaminopimelic acid desuccinylase

SE: « staphylococcal enterotoxin »

Sir: « staphylococcal iron regulated »

Sit: « staphylococcal iron transport »

Sst: « staphylococcal siderophore transporter »

StbA: « staphylococcal transferrin-binding protein A »

TAE: Tris-Acétate-EDTA

Tet: tétracycline

THA: Todd-Hewitt Agar

THB: Todd-Hewitt Broth

Tn916: transposon 916

Tpn: « transferrin receptor protein »

TSA: Tryptic Soy Agar

UFC: unité formatrice de colonie

V: volts

*À ma mère, un exemple
de force et de courage
(1944-2003)*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet, autant au niveau personnel que professionnel. Un merci tout particulier pour...

- Dr Mario Jacques, Directeur du GREMIP, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal et directeur de mon projet de maîtrise pour m'avoir permis de réaliser ce projet sous sa brillante direction et aussi pour avoir cru en moi, même lors des intempéries;
- Dr François Malouin, professeur, Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke et codirecteur de mon projet de maîtrise pour sa collaboration lors de ce projet, ses conseils judicieux, les corrections d'affiches et les réunions de travail;
- Dre Josée Harel, professeure titulaire, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal pour sa participation à mon comité conseil et autres réunions improvisées ainsi que pour ses connaissances en biologie moléculaire;
- Dr Daniel Scholl, professeur titulaire, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal pour avoir participé à mon comité conseil;
- Dr Pierre Lacasse et Dr Moussa S. Diarra pour leur collaboration à ce projet, les corrections d'affiches et les réunions de travail;
- Nos collaborateurs de l'Université de Sherbrooke: Marianne Allard pour les puces à ADN et Éric Brouillette pour le modèle de mammites chez la souris;

- Dr Serge Messier, professeur titulaire, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal pour avoir accepté d'être le président du jury d'évaluation de mon mémoire;
- Dre Marie Archambault, professeure adjointe, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal pour avoir accepté d'être membre du jury d'évaluation de mon mémoire;
- les membres du GREMIP pour les nombreuses discussions enrichissantes;
- ma famille ainsi que Steve pour... tout!
- le Fond pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) pour leur soutien financier dans le cadre du programme des Actions Concertées FCAR-
Novalait-AAFC.

I. INTRODUCTION

La bactérie *Staphylococcus aureus* est un des principaux agents infectieux responsables de la mammite bovine. En Ontario, au Canada, environ une vache laitière sur 12 est infectée par *S. aureus* (Rodenburg, 2004). Le fer (Fe^{2+} et Fe^{3+}) est un élément essentiel à la croissance de pratiquement tous les organismes. Toutefois, dans les tissus vivants, le fer n'est presque jamais à l'état libre. Les bactéries pathogènes, comme *S. aureus*, ont donc dû développer une réponse leur permettant de récupérer les molécules de fer (Litwin and Calderwood, 1993). La procédure d'incorporation du fer dans la cellule bactérienne nécessite la présence de protéines réceptrices, à la surface de la bactérie, qui sont spécifiques aux différentes sources de fer (Crosa, 1989; Ratledge and Dover, 2000).

Cette étude portera sur l'identification de nouvelles protéines réceptrices de fer. Le premier objectif sera donc de générer une banque de mutants de la souche *S. aureus* RN6390 à l'aide du transposon Tn916 et ensuite de cribler cette banque, afin d'isoler des mutants déficients au niveau de l'acquisition du fer.

Le Tn916 sera utilisé pour la mutagenèse. Il s'agit d'un transposon conjugatif retrouvé chez la souche *Enterococcus faecalis* CG110 qui porte un gène de résistance à la tétracycline, *tetM*. Par la suite, la procédure d'isolement des mutants déficients au niveau de l'acquisition du fer nécessitera l'utilisation de streptonigrine. Cet antibiotique de type quinone interagit avec le fer intracellulaire pour former des radicaux hydroxyls qui endommagent l'ADN et causent ainsi la mort des cellules. Les mutants de *S. aureus* qui sont incapables de récupérer efficacement le fer présent dans le milieu de culture seront donc résistants à l'antibiotique. La dernière étape du projet consistera à identifier le gène muté.

II. RECENSION DE LA LITTÉRATURE

1. Généralités

1.1 Famille

La bactérie *Staphylococcus aureus* est un des principaux agents infectieux responsables de la mammite bovine. Elle fait partie de la famille des *Micrococcaceae*.

1.2 Caractéristiques phénotypiques

S. aureus est une bactérie à Gram positif qui ne produit pas de spore. Les cellules sont de forme sphérique, mesurent de 0,5 à 1,5 μm de diamètre et se retrouvent seules, en paire, en tétrade, en grappe de raisins ou en amas. Sa température optimale de croissance se situe autour de 30 à 37°C, ce qui en fait un microorganisme mésophile.

Il s'agit d'une bactérie non motile, anaérobie facultative et chimioorganotrophe, c'est-à-dire qui utilise des produits organiques comme source de carbone, d'électrons et d'énergie métabolique. Elle possède un métabolisme à la fois respiratoire et fermentaire et peut réduire les nitrates en nitrites grâce à la nitrate réductase.

S. aureus est généralement catalase et coagulase positives et même si le cytochrome est présent, le résultat obtenu au test de l'oxydase est souvent négatif. Une autre caractéristique importante de cette bactérie est sa susceptibilité à la lyse par la lysostaphine et non par le lysozyme (Bergey and Holt, 1994).

1.3 Résistance aux antibiotiques

Pendant plusieurs années, la méthicilline, un antibiotique de type β -lactamine, était efficace pour traiter les infections à *S. aureus*. Cependant, le pourcentage de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (SARM), aux États-Unis, a augmenté de 2.4% en 1975 à 29% en 1991 (Archer, 1998). L'émergence de souche SARM a rendu ce traitement inefficace. Donc, pour traiter les infections à SARM, la vancomycine, un glycopeptide, représente souvent le seul traitement possible (Archer, 1998; Skaar and Schneewind, 2004).

Toutefois, aux États-Unis, des souches de SARM résistantes à la vancomycine, qui constitue en fait un antibiotique de dernière ligne, ont déjà été isolées en médecine humaine (Ginzburg *et al.*, 2000; McDonald and Hageman, 2004). Cependant, en médecine vétérinaire, pratiquement toutes les souches isolées, jusqu'à maintenant, des cas de mammites chez les bovins sont sensibles à la méthicilline (Barton *et al.*, 2003; Hensen and Rijksuniversiteit te Utrecht, 2000; Yoshimura *et al.*, 2002).

L'acronyme SARM peut également être utilisé pour des résistances multiples puisque ces souches sont résistantes non seulement à la méthicilline et à plusieurs autres β -lactamines, mais aussi aux macrolides (érythromycine), aux aminoglycosides (streptomycine, gentamycine), à la tétracycline, au triméthoprime, aux sulfamides, au chloramphénicol (Salyers and Whitt, 1994) ainsi qu'aux lincosamides et aux fluoroquinolones (Archer, 1998). Ces résistances sont souvent portées par des plasmides (Brock and Madigan, 1991).

1.4 Habitat et pouvoir pathogène

S. aureus est reconnu pour faire partie intégrante de la flore normale de l'homme au niveau des voies respiratoires supérieures. En effet, elle est souvent isolée des muqueuses du nez, de la gorge et du nasopharynx, ainsi que de la surface de la peau (Brock and Madigan, 1991) et 30% des individus en santé sont porteurs asymptomatiques de *S. aureus* (Archer, 1998).

S. aureus peut tout de même causer une large variété d'infections chez l'humain. En effet, cette bactérie peut être responsable d'infections mineures de la peau, comme des boutons et des furoncles, mais aussi d'infections plus sérieuses et invasives comme le syndrome du choc toxique, des pneumonies, des méningites, de l'arthrite, des septicémies, des endocardites et de l'ostéomyélite (Salyers and Whitt, 1994; Skaar and Schneewind, 2004).

Ce microorganisme est aussi considéré comme étant le microorganisme pathogène le plus important et le plus répandu dans le milieu hospitalier avec la bactérie *Escherichia coli*, ce qui, par conséquent, le rend responsable de plusieurs infections nosocomiales. *S. aureus* peut faire partie de la flore normale du personnel de l'hôpital et ainsi être transmis à des patients plus susceptibles aux infections. Comme la bactérie est résistante à un environnement sec, elle peut survivre pendant de longues périodes sur des particules de poussière ou encore sur des objets inanimés et infecter d'autres patients. Étant donné la gravité potentielle de l'infection, l'application rigoureuse des mesures sanitaires est primordiale (Brock and Madigan, 1991).

Le microorganisme peut aussi être isolé de la nourriture, de la poussière et de l'eau (Bergey and Holt, 1994). Dans le cas de nourriture contaminée, la bactérie produit des entérotoxines qui, une fois ingérées, causent des nausées, des vomissements et de la diarrhée (Salyers and Whitt, 1994).

De plus, *S. aureus* est un agent étiologique de la mammite bovine et sa prévalence, chez les infections intramammaires, excède 25% aux États-Unis (National Mastitis Council., 2002). En Ontario, au Canada, environ une vache laitière sur 12 est infectée par *S. aureus* et la prévalence, dans les troupeaux, va de 0 à 50% (Rodenburg, 2004).

2. La mammite bovine

Il existe deux types de mammites. Les mammites contagieuses, causées par *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* ou par *Mycoplasma bovis*; et les mammites environnementales, causées par des agents environnementaux, dont les entérobactéries et les coliformes, comme la bactérie *Escherichia coli*.

Selon la sévérité de l'infection, la mammite à *S. aureus* peut prendre plusieurs formes : mammite sub-clinique, clinique et chronique. La mammite sub-clinique ne peut être détectée visuellement. Elle perturbe la production laitière et est responsable de pertes économiques considérables. La forme clinique est plus sévère. Elle cause une diminution de la production laitière et des symptômes cliniques perceptibles. Finalement, la mammite

chronique est constituée d'infections répétées, mais de faible intensité et sans thérapie efficace.

2.1 Habitat et dissémination

Les principaux réservoirs de *S. aureus* chez la vache sont la peau des glandes mammaires et le lait, lorsqu'elles sont infectées. En ce sens, plusieurs facteurs jouent un rôle important dans la transmission de la bactérie. En effet, les appareils utilisés pour la traite, les mains de celui qui manipule les trayons ainsi que le contenant dans lequel le lait est recueilli constituent tous des moyens de propager le microorganisme entre les bovins (National Mastitis Council., 1999). Il a aussi été suggéré que le contrôle des insectes pourrait aider à prévenir la dissémination de *S. aureus* (National Mastitis Council., 1999).

2.2 Épidémiologie

L'épidémiologie de la mammites bovine causée par *S. aureus* est caractérisée par une augmentation importante dans plusieurs pays depuis quelques années. Cet accroissement pourrait être le résultat de différents facteurs dont l'augmentation du nombre d'animaux dans un troupeau suite à l'introduction de génisses provenant d'autres élevages; la pression de sélection due à l'utilisation d'antibiotiques; et la hausse du rendement, sans qu'il y ait pour autant amélioration des soins (National Mastitis Council., 1999). Les mesures d'hygiène peuvent prévenir l'infection d'une vache à une autre et jouent ainsi un rôle au niveau de l'épidémiologie (Lipman, 1995).

Le polymorphisme de *S. aureus* explique le fait que certaines souches prévalent à certains endroits alors qu'elles sont absentes ailleurs. Les souches ne diffèrent pas seulement qu'au point de vue de leurs caractéristiques bactériologiques, mais possèdent aussi différents modèles épidémiologiques et différentes caractéristiques de pathogénèse (National Mastitis Council., 1999).

2.3 Pathogenèse

Une souche de staphylocoque introduite dans un troupeau peut se multiplier sur la peau et sur les glandes mammaires de l'hôte pendant des semaines ou des mois avant que la maladie se déclare. Le microorganisme doit d'abord remonter le canal galactophore du trayon pour atteindre l'intérieur de la glande où il cause l'infection. Toutefois, *S. aureus* étant non mobile, l'intervention d'une force physique, telle que la pression exercée par l'appareil pendant la traite, est nécessaire (Schalm *et al.*, 1971; West Agro Inc., 1988). Des études antérieures ont démontré que l'introduction artificielle du microorganisme à l'intérieur de ce canal ne cause pas nécessairement l'infection. Certains facteurs influencent ce phénomène dont le nombre de bactéries introduites, la distance à laquelle elles sont déposées à l'intérieur du canal, le laps de temps entre l'inoculation et la première traite, et finalement, l'âge et les caractéristiques génétiques de la vache (Lipman, 1995).

Une fois que la bactérie se retrouve à l'intérieur de la glande mammaire, elle doit adhérer aux cellules épithéliales et coloniser la surface de la muqueuse. Lorsque la peau ou la muqueuse membranaire sont endommagées, la matrice extracellulaire est exposée, favorisant ainsi le risque d'infection. La première étape de l'infection à *S. aureus* est donc l'adhérence à la matrice extracellulaire par des adhésines à la surface de la bactérie pour permettre la colonisation (Brouillette *et al.*, 2002). Par la suite, la présence de la bactérie dans la glande mammaire provoquera une réponse inflammatoire de la part de l'hôte infecté, endommageant ainsi les cellules épithéliales. Ceci aura comme effet de réduire considérablement la production de lait (Hensen and Rijksuniversiteit te Utrecht, 2000). D'autre part, cette inflammation provoquera la libération de facteurs pyrogènes qui se traduira par de la fièvre. Ce niveau d'inflammation dépendra de l'efficacité des mécanismes de défense de la vache, du taux de multiplication du microorganisme et finalement du type et de la concentration des toxines produites (Lipman, 1995).

Lors de la réponse inflammatoire, les leucocytes seront davantage attirés par des molécules chimiotactiques dans le but d'éliminer le microorganisme. Cependant, comme nous le verrons dans la section des facteurs de virulence, *S. aureus* produit une toxine appelée leucocidine qui détruit les globules blancs provoquant la formation de pus dans la glande mammaire.

Il a été observé qu'au fur et à mesure que l'âge de lactation augmente, l'animal devient de plus en plus résistant aux toxines produites par la bactérie. L'inflammation devient moins sévère, mais la présence persistante de globules blancs dans le lait démontre l'infection chronique des glandes mammaires (Schalm et al., 1971).

2.4 Prévention et traitements

La désinfection de l'équipement semble prévenir la dissémination de la bactérie à la surface des glandes mammaires. En effet, ces dernières sont considérées comme étant plus susceptibles de contaminer l'appareil que le lait lui-même. Évidemment, la désinfection des glandes immédiatement après chaque traite durant la période de lactation demeure aussi un moyen de prévention efficace. Toutefois, les mesures d'hygiène lors de la traite ne sont pas suffisantes à elles seules pour contrôler la maladie.

Le traitement d'une mammite clinique vise trois objectifs : 1) traiter les symptômes cliniques; 2) réduire les pertes de lait; 3) prévenir le développement d'une mammite sub-clinique. En effet, le traitement d'une mammite résulte souvent en la conversion d'une mammite clinique en une mammite sub-clinique, c'est-à-dire que la vache semble guérie, mais elle demeure contagieuse et produit moins de lait (Lipman, 1995).

Le contrôle des infections mammaires avec les antibiotiques est très difficile en raison de plusieurs facteurs dont la résistance aux antibiotiques ainsi que la capacité de la bactérie de se loger dans les tissus. En effet, le microorganisme est apte à pénétrer dans les tissus et à former des cavités où il peut adhérer grâce aux adhésines de surface. Pour cette raison, l'injection d'antibiotique directement dans les glandes mammaires ne permet pas d'enrayer la maladie puisque les bactéries logées dans la crevasse sont protégées par des tissus, formant ainsi une barrière contre l'attaque de l'antibiotique (Hensen and Rijksuniversiteit te Utrecht, 2000). De plus, *S. aureus* est capable de survivre, sous forme latente, à l'intérieur des leucocytes échappant ainsi à l'antibiotique et au système immunitaire (Lipman, 1995). Une fois les conditions favorables retrouvées, il recommence à se multiplier.

Il est préférable d'utiliser les antibiotiques lorsque la vache n'est pas en période de lactation. En effet, il a été démontré que le taux de réussite du traitement, pour les mammites aux staphylocoques, est de 28% chez une vache en lactation alors qu'il est de 67% en dehors de cette période (West Agro Inc., 1988).

Comme nous le verrons dans la section suivante, la bactérie peut aussi produire des toxines qui possèdent des propriétés antigéniques. L'exposition à *S. aureus* permet donc la production d'antitoxines. Cette observation donna une lueur d'espoir quant à la production d'un vaccin induisant l'immunité. Toutefois, plusieurs vaccins contre *S. aureus* ont été utilisés ou testés pour prévenir la mammite causée par cette bactérie pathogène, mais sans grand succès (Yancey, 1999). Le problème réside dans le fait qu'en plus des toxines produites, les antigènes présents à la surface de la paroi cellulaire diffèrent d'une souche à l'autre et donc qu'un seul vaccin ne peut être efficace contre toutes les souches de *S. aureus*. De plus, les anticorps induits par un vaccin demeurent dans le sang, mais ne passent pas dans le lait. Pour cette raison, l'administration d'un vaccin directement dans les glandes mammaires fut considérée comme un bon moyen de produire une réponse immune locale. Toutefois, comme pour le traitement aux antibiotiques, il est impératif de tenir compte du moment de la vaccination en relation avec le cycle de lactation. En effet, si l'injection du vaccin a lieu pendant la période de lactation, on risque de ne pas avoir les effets escomptés puisque le vaccin sera aussitôt expulsé de la glande mammaire lors de la traite, alors que si la période de lactation est terminée, le vaccin pourra être plus efficace (Tizard, 2000).

Certains vaccins dirigés contre la protéine A de *S. aureus* semblent efficaces pour induire la production d'anticorps, mais ne protègent pas de façon significative contre les nouvelles infections (National Mastitis Council., 2002). De plus, la vaccination à ADN dirigée contre la région liant le fibrinogène du « Clumping Factor C » (ClfA) de *S. aureus* a procuré une protection partielle dans un modèle de mammite à *S. aureus* chez la souris. En effet, le vaccin a permis, par la production d'anticorps capables de se lier à la surface de la bactérie, d'inhiber l'adhérence au fibrinogène et de favoriser la phagocytose (Brouillette et al., 2002). D'autres vaccins dirigés contre les sérotypes capsulaires 5 et 8 de *S. aureus* ont été expérimentés et semblent prévenir les nouvelles infections avec 52% de réduction (National Mastitis Council., 2002).

En conclusion, l'efficacité des traitements antibactériens demeure faible et aucun vaccin efficace n'est encore disponible pour traiter la mammite à *S. aureus*.

3. Facteurs de virulence

3.1 Adhésines

Un des facteurs impliqués dans la virulence de la bactérie est la présence d'adhésines qui jouent un rôle important dans les premiers stades de développement de la mammite bovine. Elles permettent à *S. aureus* d'adhérer aux cellules épithéliales (Lindahl et al., 1990) et aux protéines de l'hôte comme le fibrinogène, la fibronectine, le collagène, le domaine Fc des molécules d'IgG et la laminine (Naidu et al., 1991b; Taylor and Heinrichs, 2002). Ces protéines de surface, en interagissant directement avec les protéines extracellulaires de l'hôte, contribuent à la virulence et permettent au microorganisme d'échapper au système immunitaire (Dryla et al., 2003).

L'hémagglutinine est reconnue pour agir comme une adhésine puisqu'elle a la capacité de se lier aussi bien aux cellules épithéliales qu'aux globules rouges de mouton (Lindahl et al., 1990). Un autre exemple d'adhésine chez *S. aureus* est le tandem formé des protéines FnBPA et FnBPB (fibronectin-binding proteins). Ces protéines formées de répétitions de groupes de 37 ou 38 acides aminés s'étendent pour traverser le peptidoglycane et finalement se retrouver libres à l'extérieur de la cellule et s'associer à la fibronectine (Taylor and Heinrichs, 2002).

3.2 Capsule polysaccharidique

Le glycocalyx, un réseau de polysaccharides qui compose les capsules, permet aussi l'attachement des bactéries à des surfaces solides (Prescott et al., 1995). De plus, la présence de cette capsule permet à la bactérie de résister à la phagocytose et de repousser les bactériophages et les substances hydrophobes toxiques comme les détergents (Novick and Skurray, 1990). Le fait que cette capsule contienne beaucoup d'eau protège aussi la bactérie contre la dessiccation.

Chez les ruminants, les différents sérotypes capsulaires ainsi que leur prévalence semblent varier d'une région géographique à une autre. Toutefois, il a été établi que les sérotypes 5 et 8 sont les plus prévalents des onze (11) sérotypes capsulaires parmi les souches de *S. aureus* responsables de mammite (Naidu *et al.*, 1991a; Poutrel *et al.*, 1988). De plus, il a été démontré que des anticorps dirigés contre la capsule pourraient être efficaces pour protéger des rongeurs contre la mortalité, les endocardites, les bactériémies et les septicémies (Sordelli *et al.*, 2000). Toutefois, il reste beaucoup de questions concernant l'implication des polysaccharides de surface, chez *S. aureus*, au niveau de la mammite bovine.

3.3 Protéine A

La protéine A est une autre substance qui assure la dissémination du microorganisme pathogène dans l'hôte. Elle est localisée au niveau de la paroi de la bactérie et inhibe la phagocytose par compétition avec les neutrophiles. En effet, les immunoglobulines G (IgG) se fixent sur la protéine A par leur extrémité Fc empêchant ainsi l'interaction du complément avec les IgG fixées (Prescott *et al.*, 1995).

3.4 β -lactamases

L'utilisation excessive d'antibiotiques de type β -lactamines a forcé *S. aureus* à s'adapter en produisant des β -lactamases. Cette enzyme joue un rôle important lors de l'infection puisqu'elle dégrade les β -lactamines comme la pénicilline (Prescott *et al.*, 1995). L'antibiotique n'a donc aucun effet sur les cellules bactériennes.

3.5 Toxines

S. aureus produit des toxines extracellulaires qui augmentent ses propriétés d'agent infectieux. La coagulase fait partie de ces substances. Il s'agit d'une enzyme qui coagule le fibrinogène, une protéine du plasma. Le caillot ainsi formé protège la cellule contre la phagocytose et l'isole des autres mécanismes de défense de l'hôte (Prescott *et al.*, 1995).

Les souches de *S. aureus* coagulase positives produisent souvent un pigment caroténoïde jaune, ce qui leur a d'ailleurs valu le nom de staphylocoques dorés (Prescott et al., 1995).

La leucocidine est une protéine antiphagocytaire puisqu'elle détruit les phagocytes (granulocytes et macrophages). Il y a donc lyse des globules blancs, ce qui mène à la formation de pus, d'où l'appellation de coques pyogènes parfois donnée à *S. aureus*.

De plus, *S. aureus* produit des entérotoxines (SE pour « staphylococcal enterotoxin ») qui sont responsables de troubles gastro-intestinaux. Ces toxines sont divisées en sept (7) types, soit SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED et SEE, qui causent des diarrhées et des vomissements (Salysers and Whitt, 1994). D'autres chercheurs ont mis en évidence le type SEH (Ren et al., 1994) et plus récemment, trois (3) nouveaux types d'entérotoxines furent identifiés, soit SEG et SEI (Munson et al., 1998) ainsi que SEJ (Zhang et al., 1998). Ces entérotoxines sont souvent produites par des souches responsables d'empoisonnement alimentaire.

Un autre facteur de virulence de ce microorganisme est représenté par sa capacité de lyser les globules rouges, par la production d'hémolysines, formant ainsi des zones d'hémolyse totale. Cette destruction des cellules du sang provoque une anémie et, par conséquent, un affaiblissement des défenses de l'hôte. De plus, il y a libération du fer contenu dans les érythrocytes, le rendant ainsi disponible pour la croissance microbienne (Prescott et al., 1995). Donc, le fait que *S. aureus* soit capable d'utiliser des protéines qui possèdent un noyau hème tel que l'hémine et l'hémoglobine lui procure un avantage lors de l'infection mammaire étant donné la fuite des protéines sanguines dans le lait (Diarra *et al.*, 2002b). Ceci nous mène donc à traiter plus en détails l'utilisation du fer par *S. aureus*.

3.6 Acquisition du fer

Le fer (Fe^{2+} et Fe^{3+}) est un élément essentiel à la croissance de pratiquement tous les organismes. Il joue un rôle central dans plusieurs processus biologiques et métaboliques (Andrews et al., 2003) aussi bien que dans l'expression des gènes de virulence chez les bactéries (Bullen and Griffiths, 1987; Modun *et al.*, 2000) pour lesquelles la croissance est dépendante de ce métal (Crosa, 1989).

Dans les tissus vivants, le fer n'est presque jamais libre puisqu'il peut catalyser des réactions d'oxydation entraînant la formation de radicaux toxiques dommageables pour les tissus vivants. Toutefois, les conditions physiologiques, à pH neutre, font que le fer se trouve à l'état ferrique (Fe^{3+}) et forme un précipité insoluble. Pour contrer ce phénomène, les mammifères produisent des protéines qui permettent de solubiliser le métal et de le fournir aux cellules de l'hôte. Le fer est donc retenu par ces protéines, constituant ainsi une défense contre les infections (Andrews *et al.*, 2003; Modun *et al.*, 2000; Skaar and Schneewind, 2004) puisque sa disponibilité se trouve en deçà des besoins nutritionnels des bactéries.

En effet, la quantité de fer, chez les vertébrés, atteint une concentration supérieure à 20 μM , mais la quantité de fer libre est d'environ 10^{-12} μM , une concentration nettement inférieure à celle requise pour la croissance bactérienne (0,05 - 0,5 μM) (Martinez *et al.*, 1990). En ce sens, il a été démontré qu'il existe une relation étroite entre la quantité de fer dans l'organisme et la susceptibilité aux infections. De plus, le manque de fer dans le milieu semble être un signal environnemental à la bactérie conduisant à la production de plusieurs toxines et à l'activation des systèmes impliqués dans le transport du fer (Dryla *et al.*, 2003; Ratledge and Dover, 2000).

C'est le cas des bactéries pathogènes, comme *S. aureus*, qui sont capables de développer une réponse adaptative leur permettant de récupérer ces molécules de fer (Litwin and Calderwood, 1993). Il semble aussi que cette réponse soit influencée par la phase de croissance des bactéries, par le site spécifique d'infection, par le niveau d'endommagement du tissu et par la nature de l'hôte infecté (Skaar and Schneewind, 2004).

Les mécanismes d'acquisition du fer sont jusqu'à maintenant mieux connus, probablement parce que plus étudiés, chez les bactéries à Gram négatif principalement chez *E. coli* comparativement aux bactéries à Gram positif comme *S. aureus*.

La procédure d'incorporation du fer dans la cellule bactérienne, autant par les protéines de l'hôte qu'avec les sidérophores, nécessite la présence de protéines réceptrices à la surface de la bactérie qui sont spécifiques aux différentes sources de fer (Crosa, 1989;

Ratledge and Dover, 2000). Alors que ce récepteur se trouve sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif, il est représenté, chez les Gram positif, par une lipoprotéine ancrée dans la membrane cytoplasmique (Andrews et al., 2003) (Figure 1).

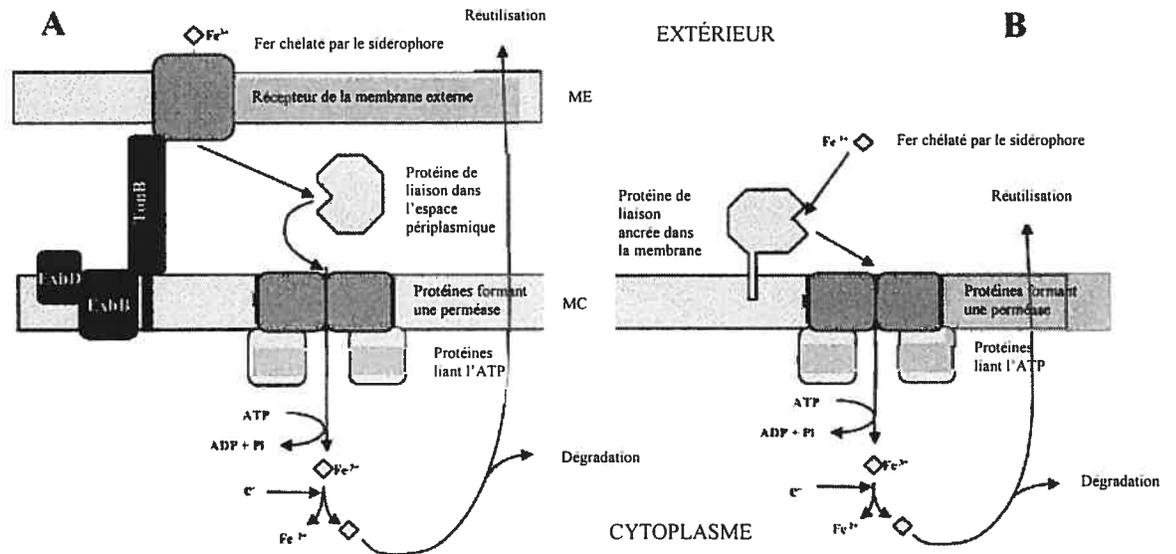


Figure 1 : Acquisition du fer à l'aide de sidérophores (A) chez les bactéries à Gram négatif et (B) chez les bactéries à Gram positif (Adaptée d'Andrews et al., 2003). La protéine située sur la membrane externe des Gram – sert de récepteur et le complexe TonB/ExbB/ExbD lui fournit l'énergie nécessaire à la translocation du complexe Fe-sidérophore à travers la membrane externe. Une protéine périplasmique sert ensuite de véhicule au complexe Fe-sidérophore. Cette protéine, chez les Gram +, est ancrée dans la membrane cytoplasmique. Finalement, l'ABC transporteur, constitué des perméases et des ATPases, permet l'entrée du fer dans la cellule.

Par la suite, le transport des ions est dépendant de l'énergie. Récemment, plusieurs transporteurs ABC ont été identifiés chez *S. aureus*, soit *sirABC*, *sstABCD* et *fhuCBG*, de concert avec *fhuD1* et *fhuD2*, possiblement *sitABC* (Brown and Holden, 2002) et, plus récemment, *htsABC* (Skaar et al., 2004b). Nous reviendrons plus en détails sur ces transporteurs. Pour l'instant, il faut savoir qu'ils sont formés de trois composantes : le récepteur spécifique au substrat sous forme de lipoprotéine à la surface de la membrane cellulaire; une ou deux protéines formant la perméase membranaire; et finalement, l'ATPase qui fournit l'énergie pour le transport au travers de la membrane. Ces composantes sont souvent codées par trois (3) ou quatre (4) gènes transcrits sous forme d'opéron (Brown and Holden, 2002) et ces opérons sont, pour la plupart, régulés par la quantité de fer présent dans le milieu (Cabrera et al., 2001; Heinrichs et al., 1999).

En effet, les bactéries ont la capacité de réguler leur métabolisme en fer en fonction de la disponibilité du métal. Certaines protéines sont impliquées au niveau de la régulation de gènes responsables de l'acquisition du fer. C'est le cas de la protéine Fur (Ferric uptake regulator) (Figure 2). Fur agit comme un répresseur de transcription lorsqu'il est en présence de Fe^{2+} , son co-répresseur, alors qu'en absence de Fe^{2+} , le gène peut être transcrit. Un tel système permet ainsi d'éviter la production de protéines nécessaires à l'acquisition du fer lorsque ce dernier est en concentration suffisante.

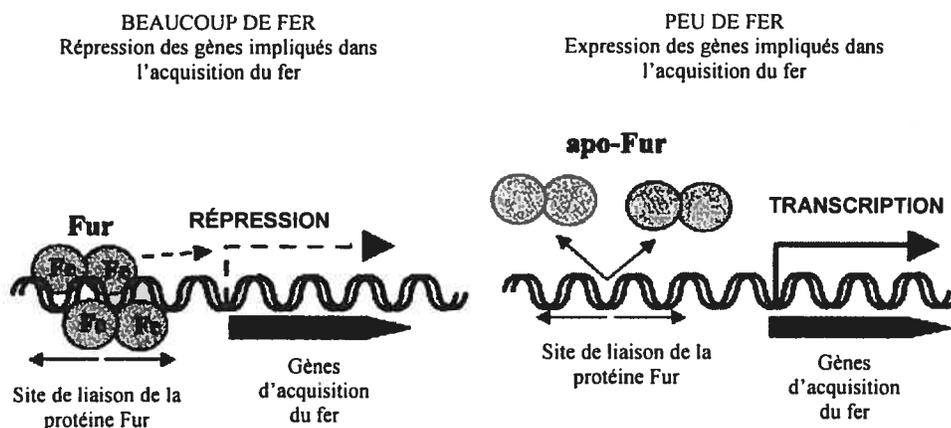


Figure 2: Représentation schématique de la répression par la protéine Fur (Adaptée d'Andrews et al., 2003). Le complexe Fe^{2+} -Fur se fixe entre les résidus -35 et -10 du promoteur du gène régulé par Fur et empêche ainsi la transcription du gène en présence de fer, alors qu'en absence de fer, le gène pourra être transcrit.

Le site de liaison au complexe Fe^{2+} -Fur constitue en fait la boîte Fur et est représentée par une séquence consensus de 19 pb (Andrews et al., 2003) (Figure 3).

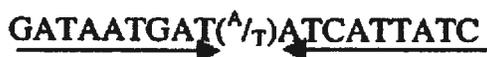


Figure 3: Séquence consensus palindromique de la boîte Fur (Andrews et al., 2003).

S. aureus possède aussi un gène qui code pour la protéine SirH. Ce gène est adjacent à l'opéron *sitABC*, dont nous parlerons un peu plus loin, et est homologue à DtxR (diphtheria toxin regulator) de *Corynebacterium diphtheriae*, qui constitue, lui aussi, un répresseur fer-dépendant (Hill et al., 1998; Modun et al., 2000).

Puisque *S. aureus* est capable de croître et de se multiplier à de faibles concentrations en fer, il est probable que le microorganisme possède plusieurs méthodes

spécifiques d'obtention du fer (Diarra *et al.*, 2002b). Ces méthodes peuvent être classées en deux (2) systèmes d'acquisition : le système d'acquisition direct, soit par l'utilisation des protéines de l'hôte comme les hémoprotéines (hémine et hémoglobine), la ferritine, la transferrine et la lactoferrine; ou encore le système d'acquisition indirect, en faisant intervenir des sidérophores (Diarra *et al.*, 2002b).

3.6.1 Systèmes d'acquisition directe

Cette méthode est utilisée par les bactéries pour leur permettre de s'appropriier le fer complexé aux protéines de l'hôte. Toutefois, ces protéines doivent être reconnues spécifiquement par des récepteurs à la surface des bactéries pour pouvoir incorporer le fer dans la cellule (Ratledge and Dover, 2000).

3.6.1.1 Les hémoprotéines

L'hème est constitué d'un noyau porphyrine avec, au centre, un atome de fer. Lorsque l'atome de fer est sous la forme réduite ou ferreux (Fe^{2+}), le groupement prosthétique est appelé hème (Figure 4).

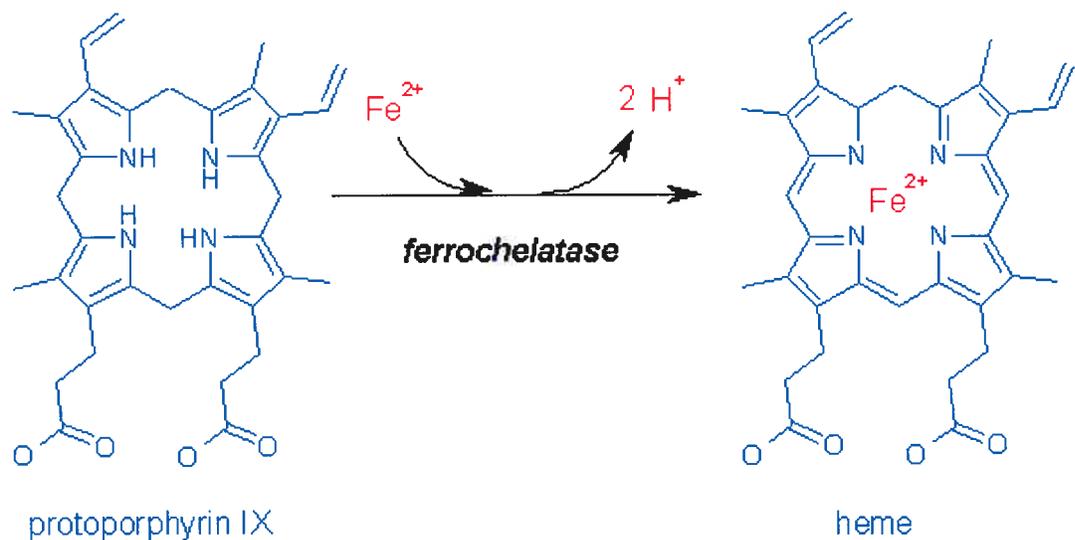


Figure 4: Structure de l'hème (King & Marchesini, 2004). Ajout d'un atome de fer au centre du noyau porphyrine.

Dans le cas où l'atome de fer est sous la forme ferrique (Fe^{3+}), le groupement prosthétique est appelé hématine, si le contre-ion est un hydroxyde (groupement OH), ou alors hémine si le contre-ion est un chlorure (Cl).

L'utilisation de l'hémine par *S. aureus* lui procure un avantage lors de l'infection mammaire puisqu'on observe une fuite de protéines sanguines dans le lait. Le fait que la bactérie soit capable d'utiliser l'hémine a permis de supposer la présence d'un site de liaison spécifique à l'hème chez le microorganisme (Diarra *et al.*, 2002b).

L'hémoglobine, une protéine de l'hôte capable de lier le fer, est la plus abondante dans le sang et se trouve dans les érythrocytes. Son poids moléculaire est d'environ 64,5 kDa et elle possède aussi des groupements hème (Bullen and Griffiths, 1987) sur lesquels sont liés les atomes de fer (Martinez *et al.*, 1990). En fait, elle est constituée de quatre (4) sous-unités globine qui forment 94% de la protéine et de quatre (4) groupements hème qui forment le 6 % restant (Figure 5).

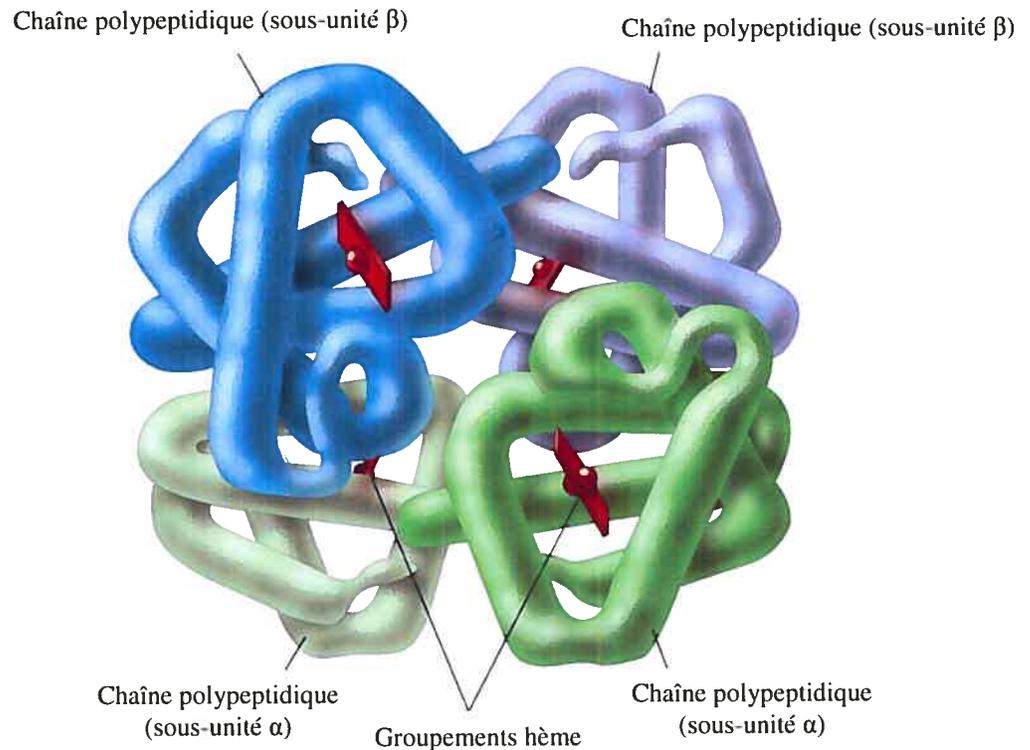


Figure 5: Modèle illustrant l'hémoglobine (Adaptée de Tro, 2003). La protéine est formée de 4 sous-unités globine (α et β) et chacune d'entre-elles est liée à un groupement hème.

Lors de l'hémolyse, une grande quantité d'hémoglobine est relâchée dans le plasma et se complexe alors à l'haptoglobine avec une forte affinité. Ce n'est qu'une fois l'haptoglobine saturée qu'on peut retrouver de l'hémoglobine libre (Bullen and Griffiths, 1987). Toutefois, il est possible que les bactéries puissent utiliser le complexe haptoglobine-hémoglobine à l'aide de certains récepteurs spécifiques. C'est le cas de la protéine HarA (haptoglobin receptor A) qui lie l'haptoglobine et aussi les complexes haptoglobine-hémoglobine. L'expression de HarA est strictement contrôlée par la protéine Fur qui est à son tour contrôlée par le fer et il fut démontré qu'une délétion dans le gène élimine la liaison de l'haptoglobine (Dryla et al., 2003).

Il semble que la protéine HarA fut étudiée par différents groupes de chercheurs. En effet, Taylor et Heinrichs ont désigné cette même protéine SirH (Taylor and Heinrichs, 2002), dont nous traiterons un peu plus loin alors que Morrissey et ses collaborateurs l'ont appelée FrpB (Morrissey et al., 2002). De son côté, Mazmanian lui aurait donné le nom IsdB et l'a localisée dans l'opéron *isd* (iron-regulated surface determinant) (Mazmanian et al., 2003) (Figure 6). Cet opéron semble coder pour des protéines responsables de la liaison à l'hémoglobine et du passage du complexe hème-Fe dans le cytoplasme.

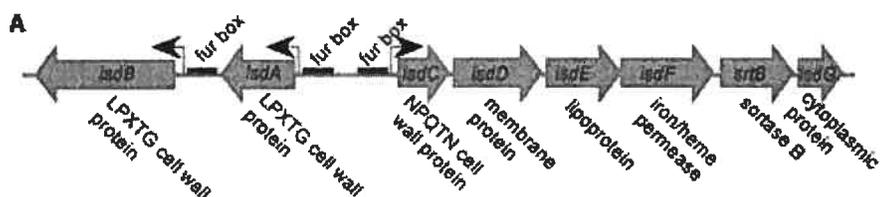


Figure 6: Organisation de l'opéron *isd* chez *S. aureus* (Mazmanian et al., 2003). La présence de boîtes Fur confirme la régulation des unités transcriptionnelles par le fer.

En effet, les auteurs ont suggéré que la protéine IsdB produite par *S. aureus* pourrait lier l'hémoglobine à la surface de la bactérie. Toutefois, *S. aureus* code aussi pour IsdH, une protéine qui semble avoir 85% d'identité en acides aminés avec la protéine IsdB (Skaar and Schneewind, 2004). Ce serait plutôt cette protéine qui serait impliquée au niveau de la liaison avec l'haptoglobine et non la protéine IsdB tel que mentionné plus tôt.

La protéine IsdB lierait donc directement l'hème et l'hémoglobine alors que la protéine IsdH lierait le complexe hémoglobine-haptoglobine (Wandersman and Delepelaire, 2004). Toutefois, comme l'indique la figure 7, le gène *isdH*, qui est aussi régulé par Fur, ne se trouve pas dans l'opéron *isd*.

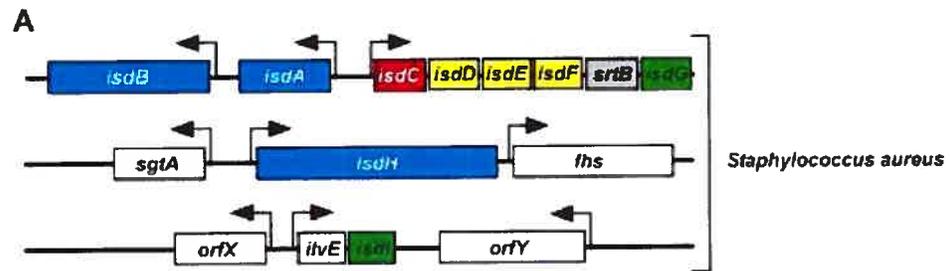


Figure 7: Les gènes *idsH* et *isdI* se trouvent dans deux autres régions distinctes du chromosome de *S. aureus* (Skaar and Schneewind, 2004).

L'hème serait par la suite retiré de l'hémoglobine par les protéines IsdA et IsdB (Figure 8) et transféré à la membrane cellulaire par IsdC. Les protéines IsdD, IsdE et IsdF seraient impliquées au niveau de la translocation au travers la membrane. On suppose donc que la protéine IsdE code pour une lipoprotéine liant l'hème alors que la protéine IsdF est capable de lier l'ATP (Mazmanian et al., 2003).

Par la suite, l'hème doit être dégradé pour pouvoir être utilisé comme source de fer. Ce sont les enzymes IsdG et IsdI qui sont impliquées dans cette étape (Figure 8). Ces protéines, semblables à des oxygénases, catabolisent le noyau hème en deux produits : la biliverdine, un produit de dégradation du noyau porphyrine; et le fer libre, qui peut enfin être utilisé pour la croissance des bactéries (Skaar *et al.*, 2004a). La figure 8 illustre le modèle proposé pour le système de transport Isd.

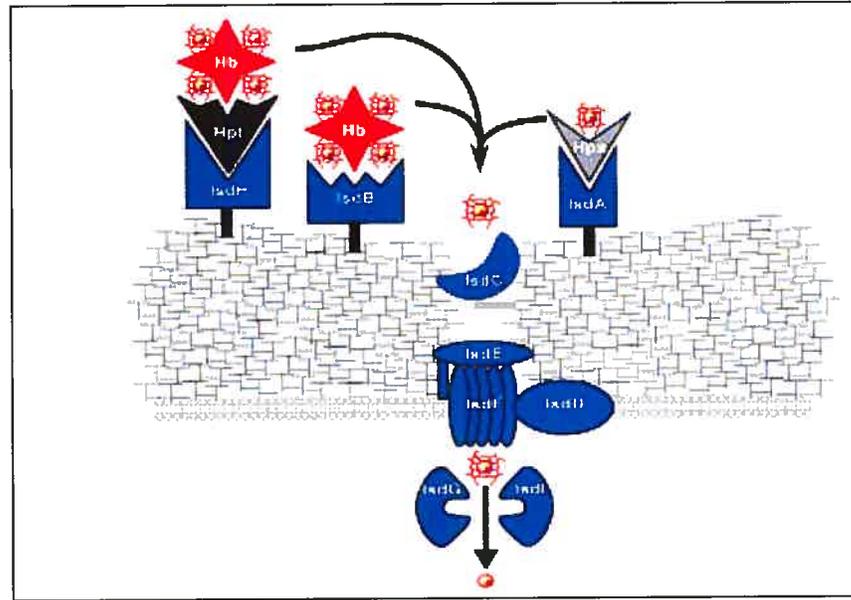


Figure 8: Modèle illustrant le transport du complexe hème-Fe médié par l'opéron *isd* chez *S. aureus* (Skaar and Schneewind, 2004). Les protéines IsdA, IsdB et IsdH sont exposées à la surface grâce aux sortases et sont des récepteurs potentiels pour l'haptoglobine (Hpt), l'hémoglobine (Hb) et pour l'hémopexine (Hpx). Le noyau hème est par la suite retiré du complexe pour ensuite se rendre à la membrane d'une façon IsdC-dépendante. Les protéines IsdD, IsdE et IsdF le transportent alors au travers de la membrane jusque dans le cytoplasme.

Les protéines IsdA, IsdB et IsdH sont toutes requises pour l'utilisation de l'hème comme source de fer (Wandersman and Delepelaire, 2004). Toutefois, il fut démontré que des inactivations génétiques dans les gènes *isdD*, *isdE* et *isdF* n'inhibent pas la croissance sur un milieu avec l'hème comme seule source de fer (Mazmanian et al., 2003), alors que l'inactivation de *htsABC* (heme transport system) réduit significativement l'acquisition de l'hème chez *S. aureus* (Skaar et al., 2004b) (Figure 9) et ainsi devrait atténuer la virulence de *S. aureus* (Rouault, 2004). HtsB et HtsC formeraient les perméases de l'ABC transporteur. Nous verrons plus en détails cet opéron dans la section 3.6.3.6.

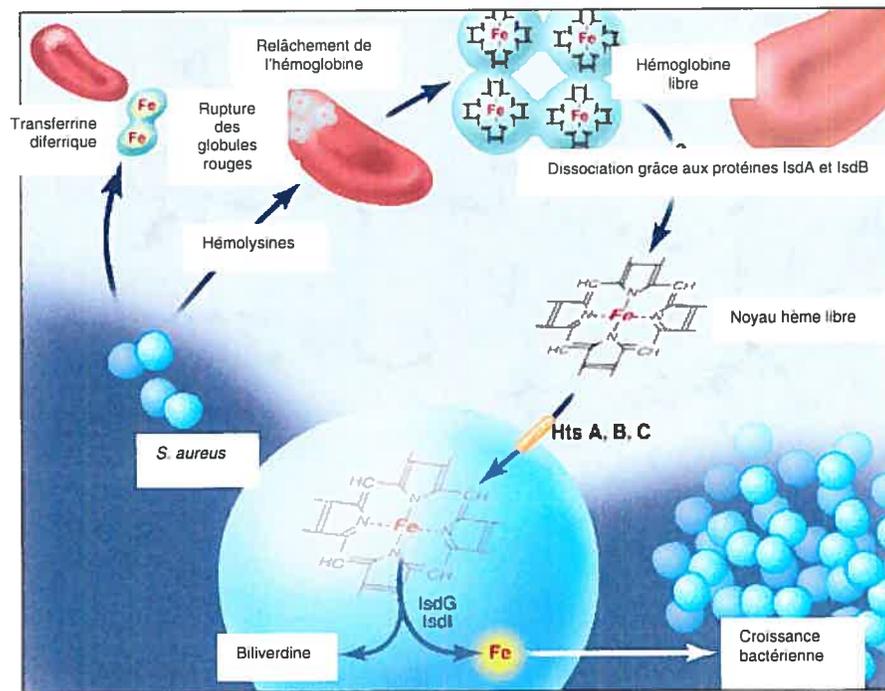


Figure 9: Utilisation du noyau hème par *S. aureus* (Adaptée de Rouault, 2004). *S. aureus* produit d'abord des hémolysines qui lysent les globules rouges libérant ainsi l'hème sous forme d'hémoglobine. La dissociation de l'hémoglobine en noyau hème est encore inconnue, mais les protéines IsdA et IsdB sont probablement impliquées. La bactérie importe ensuite l'hème via des transporteurs issus de l'opéron *htsABC*. L'hème est ensuite catabolisée par les enzymes IsdG et IsdI relâchant ainsi le fer nécessaire à la croissance bactérienne.

3.6.1.2 La transferrine

La transferrine est une protéine monomérique de 80 kDa (Diarra *et al.*, 2002a; Modun *et al.*, 1998; Taylor and Heinrichs, 2002) que l'on retrouve dans le sérum (Wandersman and Delepelaire, 2004). Il y a quelques années, des chercheurs ont découvert la présence d'un récepteur protéique de 42 kDa, ancré dans la membrane cellulaire à la surface de *S. aureus*, qui possède une forte homologie avec la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Modun *et al.*, 1998; Modun and Williams, 1999; Modun *et al.*, 2000). Cette protéine réceptrice, appelée Tpn (transferrin receptor protein), semble avoir une préférence pour certaines transferrines de mammifères. En effet, le récepteur lie préférentiellement les transferrines contenues dans le sérum humain, le sérum de lapin et le sérum de rat comparativement aux transferrines de sérum bovin, porcin ou de poulet.

Plus récemment, il a été démontré que la protéine Tpn, bien qu'elle possède une activité GAPDH, est incapable de lier la transferrine humaine. Ce rôle reviendrait plutôt à

la protéine StbA (staphylococcal transferrin-binding protein A) ancrée dans la membrane cellulaire (Taylor and Heinrichs, 2002). Le gène codant pour la protéine StbA se trouve dans une région de sept (7) kb du chromosome de *S. aureus*, une région qui contient six (6) gènes, tous régulés par la concentration en fer exogène et cette régulation est dépendante de la protéine Fur (Figure 10). En ce sens, l'opéron est précédé d'une séquence fortement similaire à une boîte Fur (Taylor and Heinrichs, 2002).

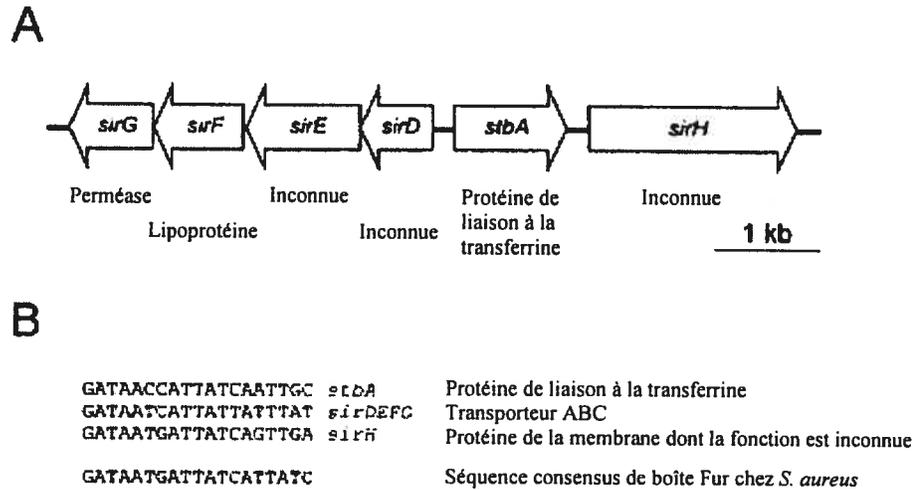


Figure 10: Opéron *sirDEFG* avec les gènes *stbA* et *sirH* (A) et alignement des séquences de la boîte Fur identifiée en amont de l'opéron (B) (Adaptée de Taylor and Heinrichs, 2002).

Alors que les produits des gènes *sirD* et *sirE* demeurent inconnus, ceux des gènes *sirF* et *sirG* montrent des similarités avec des composantes de transporteurs ABC. En effet, la protéine SirF est une lipoprotéine qui ressemble fortement à des lipoprotéines impliquées dans le transport du fer alors que la protéine SirG est fortement hydrophobe et possède de grandes similarités avec des perméases. Immédiatement en aval du gène *StbA*, et transcrit dans la même direction, se trouve le gène *sirH* qui code pour une seconde protéine ancrée dans la membrane, plus grande que la première. Même si la fonction de SirH est toujours inconnue, il est possible que la protéine joue un rôle dans l'acquisition du fer en liant les protéines de l'hôte, par exemple l'hémoglobine, tel que suggéré par les travaux d'Agnieszka en 2003.

La nomenclature de cet opéron fait suite à des résultats obtenus précédemment. En effet, Heinrichs et ses collaborateurs (Heinrichs et al., 1999) ont identifié l'opéron *sirABC*

comme étant constitué de trois (3) gènes localisés ailleurs sur le chromosome dont la fonction est encore indéterminée (voir section 3.6.3.2).

De plus, il semble que le transport du fer à partir de la transferrine ne nécessite aucun contact direct avec la cellule. Ceci fut démontré par l'utilisation d'une membrane à dialyse pour séparer la transferrine marquée des cellules et suggère la présence, dans le surnageant, de molécules capables de récupérer le fer porté par la transferrine et de le transporter au travers de la membrane, donc probablement des sidérophores (Lindsay et al., 1995).

3.6.1.3 La lactoferrine

Le lait, riche en nutriments essentiels, possède des effets bactériostatiques en conditions *in vivo* étant donné la présence d'immunoglobulines, de cellules phagocytaires, de composantes du complément, de lysozyme, de lactoperoxydase et de lactoferrine (Naidu *et al.*, 1991a). Cette dernière est produite de façon naturelle par les cellules d'une glande mammaire en lactation. Chez les mammifères, la lactoferrine chélate le fer dans les sécrétions mucosales, privant ainsi les bactéries pathogènes du métal. De plus, en étant un composant majeur des leucocytes polymorphonucléaires, la lactoferrine contribue ainsi à tuer les bactéries (Naidu *et al.*, 1991a).

Cette protéine du lait de 80 kDa semble inhiber la croissance de certaines souches même si ces dernières possèdent des récepteurs capables de lier la protéine à la surface des cellules (Diarra *et al.*, 2002a). En effet, la lactoferrine semble reconnaître des protéines de poids moléculaires de 32 et 92 kDa (Diarra *et al.*, 2002b), d'autres de 67 et 92 kDa (Naidu *et al.*, 1991a) et finalement de 62 et 67 kDa (Naidu et al., 1992) à la surface de *S. aureus*.

Il semble que ce soit un fragment de la lactoferrine qui lui procure cet effet antibactérien. Ce peptide, appelé lactoferricine, est généré naturellement pendant la digestion de la lactoferrine du lait, par le système digestif des mammifères (Bellamy et al., 1992). Le potentiel antibactérien de la lactoferrine et de la lactoferricine a été étudié seul et en combinaison avec des antibiotiques. Il a été démontré que cette protéine de l'hôte a la

capacité d'augmenter l'activité inhibitrice de certains antibiotiques et aussi de diminuer l'expression de la β -lactamases (Diarra *et al.*, 2002a).

3.6.1.4 La ferritine

Alors que les rôles de la transferrine et de la lactoferrine sont de complexer et de transporter le métal, celui de la ferritine se résumerait à emmagasiner le métal (Ghio *et al.*, 1998). Pendant l'infection mammaire, la concentration en fer dans le lait augmente, probablement en raison de la mort de cellules épithéliales, menant à la libération de ferritine dans le lait (Diarra *et al.*, 2002b). Cette protéine de l'hôte, qui a un poids moléculaire de 500 kDa, permet à certaines bactéries d'obtenir le fer dont elles ont besoin soit par contact direct ou avec l'aide de sidérophores (Diarra *et al.*, 2002b; Ghio *et al.*, 1998; Ratledge and Dover, 2000).

Alors que *S. aureus* est capable de produire des sidérophores, ce ne sont pas toutes les souches qui peuvent utiliser la ferritine comme source de fer. De plus, cette dernière semble inhiber la croissance des souches qui sont incapables de l'utiliser. Ces différences dans la capacité d'utiliser la ferritine suggèrent que les sidérophores à eux seuls ne sont pas suffisants pour acquérir le fer de la ferritine. On peut donc supposer que le relâchement du fer dépend de la production par *S. aureus* d'une protéase extracellulaire capable de cliver la ferritine (Diarra *et al.*, 2002b). En effet, la ferritine semble permettre la conservation du fer dans un réservoir se trouvant dans sa cavité centrale (Andrews *et al.*, 2003) et une seule molécule de ferritine peut contenir entre 1 et 4500 atomes de fer (Fe^{3+}) (Martinez *et al.*, 1990).

3.6.2 Systèmes d'acquisition indirecte

Tôt dans l'infection, les staphylocoques semblent utiliser les sources de fer les plus abondantes pour satisfaire leur besoin en fer, les hémoprotéines (Skaar *et al.*, 2004b). Ce n'est qu'une fois ces protéines épuisées que la bactérie se tournera vers l'utilisation de sidérophores, une voie utilisée par les bactéries lorsque la concentration en fer du milieu est très faible. Ces petites molécules de faible poids moléculaire (< 1000 Da) s'occupent de chélater les ions ferriques et de les fournir à la cellule lorsque le fer est peu disponible pour

les bactéries. L'affinité de ces chélateurs d'ions pour les ions ferriques est suffisante pour soustraire le fer des propres protéines de l'hôte.

Jusqu'à maintenant, quatre (4) types de sidérophores ont été découverts, soit les catéchols qui semblent peu utilisés chez *S. aureus*; les hydroxamates dont le ferrichrome et le desferal sont les plus fréquemment utilisés chez *S. aureus* (Diarra *et al.*, 2002b; Martinez *et al.*, 1990); les carboxylates, dont les staphyloferrines A et B; et finalement, un quatrième type non caractérisé, c'est-à-dire dont le type chimique est encore inconnu, mais dont les aureochelines font partie.

Plusieurs bactéries pathogènes, dont *S. aureus*, sont capables d'utiliser les sidérophores produits par d'autres bactéries ou par certains champignons, mais nécessitent, à leur surface, la présence de protéines réceptrices pour le complexe sidérophore-Fe. Ces sidérophores sont dits exogènes. Par exemple, le ferrichrome et l'aérobactine de type hydroxamate sont des sidérophores produits par d'autres microorganismes, mais que *S. aureus* est capable d'utiliser. C'est aussi le cas avec l'entérobactine, de type catéchol (Brown and Holden, 2002) qui est produit par *E. coli* (Andrews *et al.*, 2003). L'utilisation de sidérophores exogènes de type hydroxamate peut être importante lorsque *S. aureus* coexiste avec d'autres microorganismes qui produisent ce type de sidérophores. Par exemple, le ferrichrome et le desferroxamine sont produits par des champignons présents dans la glande mammaire (Diarra *et al.*, 2002b).

La production de sidérophores par les staphylocoques fut démontrée il y a quelques années. En effet, *S. hyicus* semble produire deux (2) sidérophores, soit la staphyloferrine A et la staphyloferrine B. Ces sidérophores sont aussi produits par certaines souches de *S. aureus* (Haag *et al.*, 1994; Heinrichs *et al.*, 1999; Meiwes *et al.*, 1990). De plus, le microorganisme synthétise un troisième sidérophore, appelé aureocheline, de 577 Da (Courcol *et al.*, 1997; Modun *et al.*, 2000). De ces trois (3) sidérophores, seulement la staphyloferrine A semble lier le fer complexé à la transferrine (Modun *et al.*, 1998; Modun *et al.*, 2000).

De plus, un nouveau sidérophore, la staphylobactine, fut tout récemment mis en évidence par Dale et ses collaborateurs (Dale et al., 2004). Le gène responsable de l'expression de ce sidérophore se trouve tout près de l'opéron *sirABC* (voir section 3.6.3.2).

3.6.3 Transporteurs ABC chez *S. aureus*

Tel que mentionné plus tôt, plusieurs transporteurs ABC ont été identifiés chez les staphylocoques dont cinq (5) chez *S. aureus*, soit *sirABC*, *sstABCD*, et *fhuCBG* en relation avec *fhuD1* et *fhuD2* et possiblement un sixième, *sitABC* (Brown and Holden, 2002). Plus récemment, l'opéron *hstABC* fut découvert (Skaar et al., 2004b). Toutefois, pour certains d'entre eux, le substrat demeure inconnu. Le tableau 1 résume ces opérons et la figure 11 illustre leur disposition dans le génome de la souche de *S. aureus* Mu50.

Tableau 1 : Liste des opérons identifiés chez *S. aureus*, leur substrat et la référence associée.

Opéron	Substrat	Références
<i>sstABCD</i> (staphylococcal siderophore transporter)	Inconnu	(Morrissey et al., 2000)
<i>fhuCBG</i> (<i>fhuD1</i> et <i>fhuD2</i>) (ferric hydroxamate uptake)	Complexe Fer-hydroxamate	(Sebulsky et al., 2000; Sebulsky and Heinrichs, 2001; Sebulsky et al., 2003; Sebulsky et al., 2004)
<i>isdABCDEFGHI</i> (iron regulated surface determinant)	Hémoprotéines	(Mazmanian et al., 2003)
<i>sirABC</i> (staphylococcal iron regulated)	Staphylobactine	(Heinrichs et al., 1999) (Dale et al., 2004)
<i>sitABC</i> (staphylococcal iron transport)	Inconnu	(Cockayne et al., 1998)
<i>hstABC</i> (heme transport system)	Hémoprotéines	(Skaar et al., 2004b)

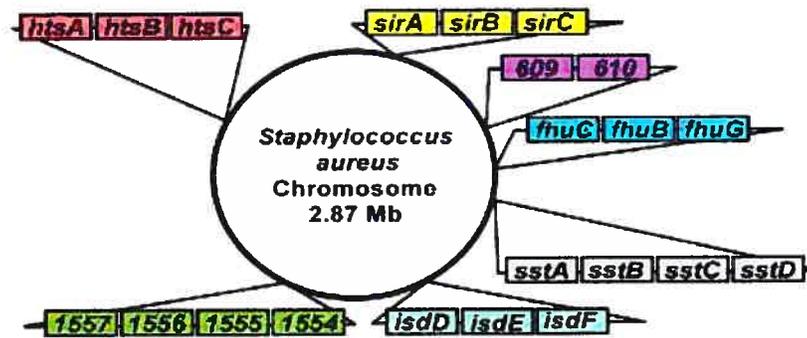


Figure 11: Arrangement génomique des systèmes de transport du fer chez *S. aureus* Mu50 (Skaar *et al.*, 2004b). Suite au séquençage de *S. aureus*, le génome fut annoté. Les gènes *sir*, *sst*, *fhu* et *hts* ont été caractérisés et les gènes non caractérisés portent le numéro correspondant à la position du locus dans le génome de la souche *S. aureus* Mu50.

3.6.3.1 SitABC

L'opéron *sit* (staphylococcal iron transport) fut d'abord identifié chez *S. epidermidis*, mais on soupçonne aussi sa présence chez *S. aureus* (Cockayne *et al.*, 1998). La protéine SitA est une ATPase, SitB est une protéine de membrane cytoplasmique alors que SitC est une lipoprotéine de 32 kDa. Ces trois (3) protéines semblent donc, en considérant leur homologie de séquence, constituer un ABC transporteur. La spécificité de ce transporteur n'a toutefois pas encore été confirmée, mais les auteurs supposent l'implication de sidérophores ou de transferrine.

Des données récentes obtenues par Cockayne et ses collaborateurs suggèrent que l'opéron identifié chez *S. epidermidis* pourrait aussi être régulé par le manganèse amenant ainsi la possibilité que la protéine SitC soit capable de lier et de transporter une variété d'ions métalliques, tel que le fer, le manganèse et aussi le zinc. Cette hypothèse pourrait évidemment être vérifiée en générant des mutants (Cockayne *et al.*, 1998).

3.6.3.2 SirABC

En 1999, Heinrichs et ses collaborateurs ont identifié et caractérisé une protéine de *S. aureus* qui est régulée par le fer. SirA (staphylococcal iron regulated) est une lipoprotéine de 36,7 kDa et fait partie d'un opéron de trois (3) gènes (Heinrichs *et al.*, 1999) (Figure 12).

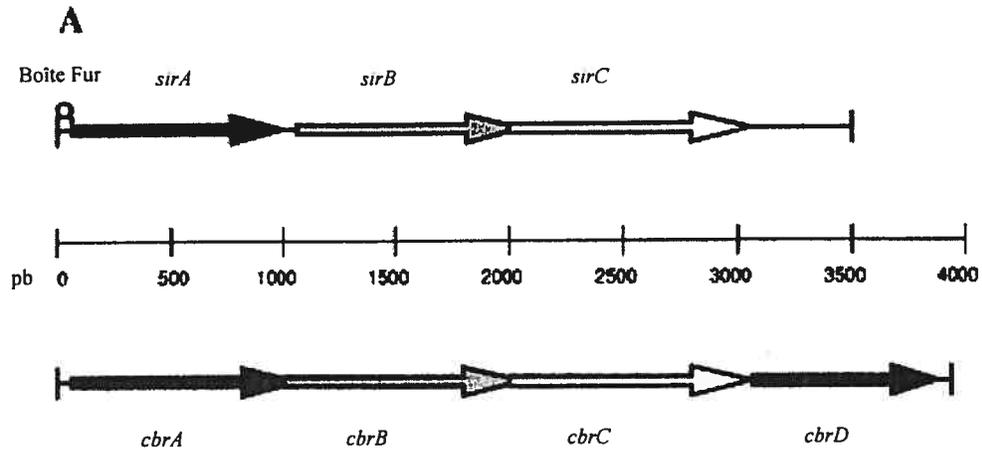


Figure 12: Organisation génétique de l'opéron *sirABC* chez *S. aureus* et opéron *cbr* chez *Erwinia chrysanthemi* (Adaptée de Heinrichs et al., 1999).

L'analyse de la séquence en acides aminés des ORFs de l'opéron *sir* a démontré des homologies avec l'opéron *cbr* identifié chez une bactérie pathogène des plantes, *Erwinia chrysanthemi*. Cet opéron porte quatre (4) gènes impliqués dans le transport de sidérophores.

SirA, associée à la membrane cellulaire, serait impliquée dans la liaison aux sidérophores. Les protéines SirB (35,5 kDa) et SirC (35,7 kDa) sont fortement hydrophobes et permettraient la formation d'un pore à travers lequel serait transporté le complexe sidérophore-Fe.

Le gène *sirA* est précédé d'une région de 19 pb similaire à la boîte Fur chez *E. coli* et *Bacillus subtilis*. La présence de Fur permet de prétendre à une régulation par le fer.

Toujours dans le laboratoire du Dr Heinrichs, un nouvel opéron fut identifié et caractérisé, l'opéron *sbnABCDEFGHI* (siderophore biosynthesis) (Dale et al., 2004) (Figure 13). Ses neuf (9) gènes, aussi régulés par le fer, n'ont pu être identifiés seulement que chez *S. aureus* et non chez les staphylocoques à coagulase négative. L'opéron *sbn* semble donc spécifique à *S. aureus* parmi les staphylocoques.

L'équipe a d'abord isolé un nouveau sidérophore produit par *S. aureus*, qu'ils ont nommé staphylobactine. Il semblerait qu'une inactivation du gène *sbnE* empêche les

souches de *S. aureus* de produire la staphylobactine, qui demeure, jusqu'à maintenant, non caractérisée.

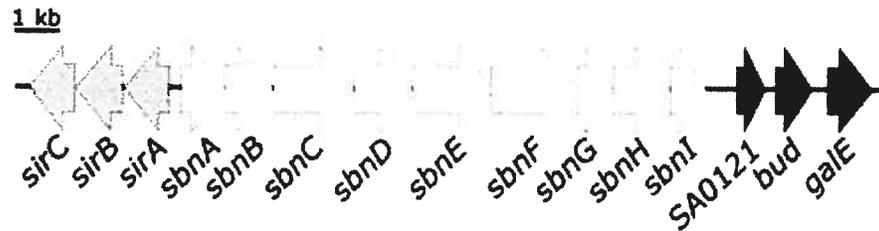


Figure 13: Représentation schématique de l'opéron *sbn* chez *S. aureus* (Dale et al., 2004). Les flèches en noires représentent des régions codantes qui ne sont pas impliquées dans l'acquisition du fer.

Les opérons *sbn* et *sir* sont séparés par une région de 230 pb dans laquelle on suppose la présence de deux (2) séquences homologues à des boîtes Fur. De plus, la proximité de ces opérons permet aux auteurs de prétendre que les protéines SirA, SirB et SirC seraient impliquées dans le transport de la staphylobactine. Des travaux sont d'ailleurs en cours à ce sujet.

3.6.3.3 FhuCBG/FhuCBD

Un opéron de trois (3) gènes, l'opéron *fhuCBG* (ferric hydroxamate uptake) fut identifié chez *S. aureus* (Sebulsky et al., 2000) (Figure 14). Ce même opéron fut aussi identifié par Cabrera et ses collaborateurs, mais sous une nomenclature différente, soit l'opéron *fhuCBD* (Cabrera et al., 2001). Les protéines produites sont impliquées dans l'acquisition du fer à partir de sidérophores de type hydroxamate. Ces protéines possèdent aussi beaucoup de similarité avec les protéines FhuC, FhuB et FhuG de *B. subtilis*.

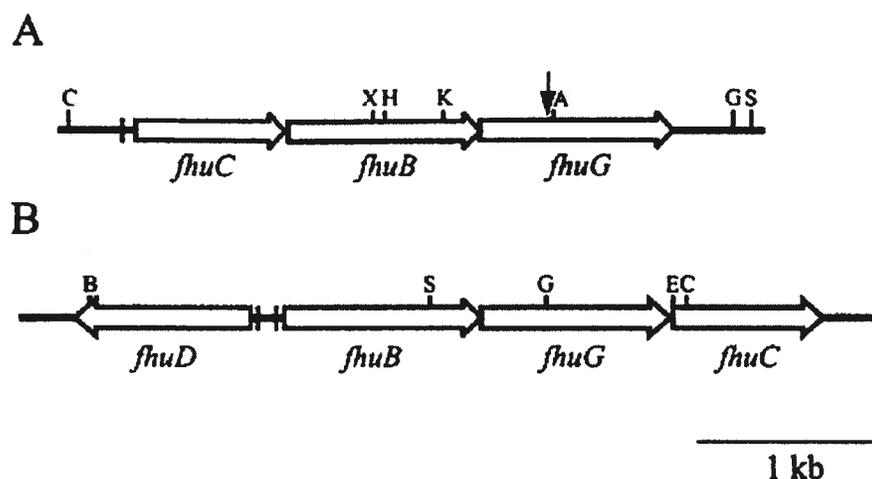


Figure 14: Organisation schématique de l'opéron *fhu* de *S. aureus* (A) et de *B. subtilis* (B) (Sebulsky et al., 2000). La flèche verticale en (A) indique l'endroit de la mutation alors que la ligne perpendiculaire au chromosome, en amont de *fhuC*, indique la localisation de la boîte Fur. Cette boîte Fur se trouve entre les gènes *fhuD* et *fhuBCG* chez *B. subtilis* en (B). Les lettres symbolisent les enzymes de restriction qui coupent dans la séquence.

Comme les protéines FhuB (36 kDa) et FhuG (36,1 kDa) sont fortement hydrophobes, on peut supposer la présence d'un hétérodimère formant une perméase membranaire. Cette perméase semble avoir une large spécificité puisque les complexes ferrichrome-Fe, aérobactine-Fe et desferroxamine-Fe sont tous transportés dans les cellules de *S. aureus* via ce système (Sebulsky et al., 2000). Une mutation dans un des gènes *fhuB* ou *fhuG* résulte en une diminution de l'acquisition du ferrichrome (Cabrera et al., 2001).

La protéine FhuC, de son côté, démontre des similarités de séquences avec des protéines capables de lier l'ATP. Chez *E. coli*, une modification dans cette séquence en acides aminés mène à l'abolition du transport du complexe hydroxamate-Fe. De plus, le fait que le transport du complexe sidérophore-Fe au travers des composantes membranaires demande de l'énergie confirme la fonction de cet opéron.

Une séquence homologue à celle des boîtes Fur a pu être identifiée en amont de la protéine FhuC, permettant ainsi d'affirmer que cet opéron est régulé par la protéine Fur, qui elle, est contrôlée par le niveau de fer. Cette boîte Fur est aussi reconnue par la protéine Fur d'*E. coli*.

La protéine FhuD chez *B. subtilis* est une lipoprotéine. Jusqu'à tout récemment, cette protéine ne possédait pas son homologue chez *S. aureus*, mais Sebulsky et Heinrichs ont finalement réussi à mettre en évidence les protéines FhuD1 et FhuD2 (Sebulsky and Heinrichs, 2001) (voir section 3.6.3.5).

3.6.3.4 SstABCD

En 2000, les travaux de Morrissey et ses collaborateurs ont permis de mettre en évidence l'opéron *sstABCD* (staphylococcal siderophore transporter) (Morrissey et al., 2000) qui constitue un transporteur ABC classique (Figure 15).

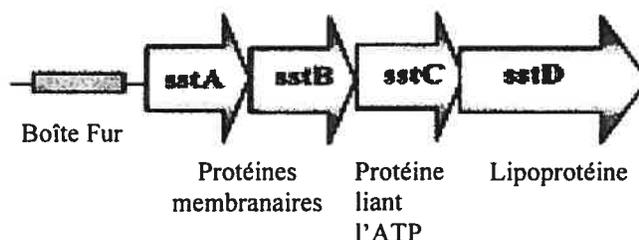


Figure 15: Organisation de l'opéron *sstABCD* chez *S. aureus* (Adaptée de Morrissey et al., 2000). La séquence en amont de l'opéron permet de croire que cet opéron serait régulé par le fer.

Les protéines SstA et SstB démontrent une hydrophobicité qui permet de supposer que ce sont des protéines de la membrane cytoplasmique. La protéine SstC, de son côté, possède une homologie significative avec plusieurs protéines capables de lier l'ATP qui sont impliquées dans le transport du fer à partir de sidérophores. Finalement, SstD est une lipoprotéine de 38 kDa qui possède une forte homologie avec des transporteurs de sidérophores de *B. subtilis* et de *Campylobacter jejuni*. De plus, l'expression de SstD semble augmenter lorsque les conditions sont limitées en fer, mais il a aussi été démontré qu'une diminution du niveau de SstD n'affectait pas la croissance de *S. aureus* suggérant ainsi que cet opéron n'est pas requis pour la virulence (Brown and Holden, 2002; Morrissey et al., 2000).

Il est fort probable que la transcription de cet opéron soit aussi régulée par le fer puisqu'on suppose que le gène *sstA* est précédé d'une structure contenant deux (2) séquences que l'on peut comparer à d'autres séquences boîte Fur (Figure 16).

5' - GATAATGATAATCATTATC - 3'	Boîte Fur (séquence consensus chez <i>E. coli</i>)
5' - GATAATGATTATCATTAAI - 3'	Boîte Fur 1 du gène <i>sstA</i> chez <i>S. aureus</i>
5' - ATCAATGATAATGATTATC - 3'	Boîte Fur 2 du gène <i>sstA</i> chez <i>S. aureus</i>
5' - GATAATGATTCTCATTCTC - 3'	Boîte Fur du gène <i>sirA</i> chez <i>S. aureus</i>
5' - GTTCATGATAATCATTATC - 3'	Boîte Fur du gène <i>fhuC</i> chez <i>S. aureus</i>

Figure 16: Homologie de séquence entre les boîtes Fur identifiées chez *S. aureus*, la séquence consensus chez *E. coli* et les séquences des boîtes Fur associées aux gènes *sirA* et *fhuC*. Les différences en acides nucléiques entre les différentes boîtes Fur sont soulignées (Adaptée de Morrissey et al., 2000).

Toutefois, les expériences effectuées n'ont pas permis aux auteurs d'identifier le sidérophore transporté par ces protéines.

3.6.3.5 FhuD1 et FhuD2

Plus tôt, on mentionnait que, contrairement à *B. subtilis*, la lipoprotéine FhuD n'avait toujours pas été retrouvée chez *S. aureus*. Sebulsky et ses collaborateurs ont donc poursuivi leurs recherches et ont finalement identifié et caractérisé deux (2) gènes, soit *fhuD1* et *fhuD2*, qui possèdent des spécificités différentes pour des sidérophores de type hydroxamate et aussi des unités de transcription indépendantes. De plus, les deux (2) gènes ne sont pas localisés près l'un de l'autre, ni près de l'opéron *fhuCBG*. Les auteurs supposent tout de même que les nouvelles protéines interagissent avec ce transporteur (Sebulsky and Heinrichs, 2001).

Pour chacun des gènes *fhuD1* et *fhuD2*, l'examen des séquences en amont ont permis de révéler la présence de boîtes Fur. Leur transcription est donc aussi régulée par la protéine Fur. Toutefois, la façon dont la bactérie bénéficie de la présence de FhuD1 et FhuD2 n'est pas encore clair, mais il semble que FhuD2 participe au transport d'une plus grande étendue de substrats que FhuD1 (Sebulsky and Heinrichs, 2001; Sebulsky *et al.*, 2003).

Récemment, un modèle hypothétique fut élaboré par cette équipe : il semblerait que la protéine FhuD2 soit libérée afin de récupérer le complexe sidérophore-Fe (Figure 17). Elle ne serait donc pas ancrée dans la membrane cytoplasmique.

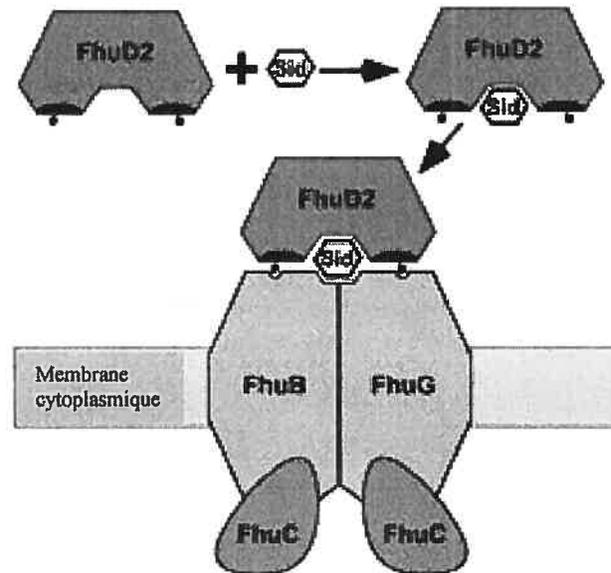


Figure 17: Modèle illustrant la reconnaissance du complexe protéine-ligand (FhuD2-sidérophore) par le transporteur ABC situé dans la membrane cytoplasmique (Adaptée de Sebulsky et al., 2003).

Alors que la position de *fhuCBG* et de *fhuD2* dans le génome demeure conservée, la présence ainsi que la position du gène *fhuD1* est variable (Sebulsky *et al.*, 2004). Tout comme FhuD2, la protéine FhuD1 lie les sidérophores de type hydroxamate, mais avec une affinité moindre. Les données suggèrent donc que FhuD1 est redondante à FhuD2 et joue un rôle mineur dans le transport du fer. De plus, le produit du gène *fhuD1* pourrait partiellement compenser pour la perte de FhuD2.

Les auteurs supposent aussi que les conditions dans lesquelles FhuD1 procurerait un avantage sur FhuD2 n'ont peut-être pas été identifiées et qu'il est possible que FhuD1 joue un rôle plus important avec des sidérophores, toujours de type hydroxamate, qui n'ont pas été testés et qui joueraient un rôle prédominant dans l'environnement naturel de *S. aureus*.

3.6.3.6 HtsABC

Tel que mentionné plus tôt, l'inactivation de l'opéron *htsABC* (heme transport system) réduirait significativement l'acquisition de l'hème chez *S. aureus* (Skaar *et al.*, 2004b). L'analyse des séquences a montré que les protéines HtsB et HtsC formeraient les perméases de cet ABC transporteur étant donné la forte homologie avec HemU (Stojiljkovic and Hantke, 1994) et HmuU (Drazek et al., 2000), les perméases des systèmes

de transport de l'hème chez *Yersinia enterocolitica* et *Corynebacterium diphtheriae* respectivement (Skaar *et al.*, 2004b).

Une boîte Fur a aussi été identifiée huit (8) nucléotides en amont du gène *hstA* impliquant l'activation du système sous des conditions carencées en fer (Rouault, 2004; Skaar *et al.*, 2004b).

4. Description du projet

À l'été 2002, lorsque le projet a débuté, les connaissances sur les transporteurs ABC chez *S. aureus* étaient encore très limitées. Étant donné l'importance du fer pour *S. aureus* et les bactéries pathogènes en général, il était pertinent de poursuivre l'étude dans le but d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans l'obtention de ce métal, particulièrement chez des souches isolées de mammite bovine. Toutefois, comme le lecteur l'aura noté, il y a eu de nombreuses publications au cours des deux dernières années.

Les objectifs de l'étude étaient donc de créer des souches de *S. aureus* déficientes au niveau de l'acquisition du fer dans le but d'identifier de nouveaux gènes responsables du phénotype observé.

Pour ce faire, une technique de mutagenèse par transposon a été utilisée pour produire une banque de mutants. Le Tn916, retrouvé dans la souche d'*Enterococcus faecalis* CG110, est un transposon conjugatif de 18 kb qui porte un gène de résistance à la tétracycline, *tetM* (Franke and Clewell, 1981; Gawron-Burke and Clewell, 1982). Ce transposon a été particulièrement utilisé avec des souches à Gram positif dont *Bacillus anthracis* (Ivins *et al.*, 1988), *B. subtilis* (Scott *et al.*, 1988), *Clostridium difficile* (Hachler *et al.*, 1987), *Listeria monocytogenes* (Kathariou *et al.*, 1987) et aussi avec *S. aureus* (Jones *et al.*, 1987).

Par la suite, une sélection sur un milieu contenant de la streptonigrine (Figure 18) a permis d'isoler des cellules déficientes au niveau de l'acquisition du fer.

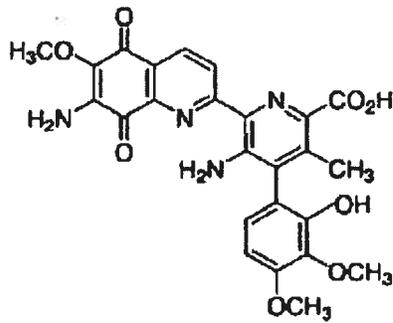


Figure 18 : Structure chimique de la streptonigrine.

La streptonigrine est un antibiotique de type quinone qui se complexe avec le fer intracellulaire pour former des radicaux hydroxyls endommageant ainsi l'ADN (Bolzan and Bianchi, 2001). Les cellules incapables d'utiliser le fer présent dans le milieu de culture seront donc résistantes à l'antibiotique. Cette approche a été utilisée notamment chez *Haemophilus influenzae* (Holland et al., 1991), *E. coli* (Braun et al., 1983), *Neisseria meningitidis* (Dyer et al., 1987) et aussi avec *S. aureus* (Ahn et al., 2004; Chung et al., 2003). Le tableau 1 résume quel type de mutants ont été isolés avec cet antibiotique.

Tableau 2 : Résumé de quelques études sur la streptonigrine.

Bactéries	Mutants isolés	Références
<i>E. coli</i>	2 mutants (récepteur de l'aérobactine) 2 mutants (synthèse de l'aérobactine)	(Braun et al., 1983)
<i>Haemophilus influenzae</i>	2 mutants (liaison de la transferrine et assimilation du fer)	(Holland et al., 1991)
<i>Neisseria meningitidis</i>	10 mutants (acquisition du fer; transferrine et hémoglobine)	(Dyer et al., 1987)
<i>S. aureus</i>	<i>fhuG</i> (complexe fer-hydroxamate)	(Sebulsky et al., 2000)

III. MÉTHODOLOGIE

1. Conditions de croissance des souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont énumérées dans le tableau 3. Les souches de *S. aureus* étaient généralement ensemencées en bouillon Mueller-Hinton (MHB), sur gélose MH agar (MHA) ou encore en bouillon Todd-Hewitt (THB) et sur gélose Todd-Hewitt agar (THA) et incubées à 37°C. Lorsque l'utilisation d'antibiotiques était nécessaire, ces derniers étaient ajoutés au milieu selon les concentration suivantes : tétracycline (10 µg/mL); streptomycine (100 µg/mL).

Tableau 3 : Souches bactériennes utilisées.

Souches	Caractéristiques	Référence et source
<i>E. faecalis</i> CG110	Tn916 (<i>tetM</i>)	(Gawron-Burke and Clewell, 1982) M. Gottschalk ^a
<i>S. aureus</i>		
RN6390	Type sauvage	(Peng <i>et al.</i> , 1988) / M. S. Diarra ^b
RN6390 Sm ^R	Streptomycine résistante	Cette étude
LS21	RN6390 <i>flp</i> :: Tn916	Cette étude
LS22	RN6390 région non-codante :: Tn916	Cette étude
LS23	RN6390 <i>dapE</i> :: Tn916	Cette étude
LS24	RN6390 :: Tn916 (plus d'une insertion)	Cette étude

^a Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, QC, Canada.

^b Agriculture et Agroalimentaire Canada, Centre de recherche et de développement sur le bovin laitier et le porc, Lennoxville, QC, Canada.

2. Construction d'une banque de mutants

Le transposon Tn916 a été utilisé pour la mutagenèse chez la souche *S. aureus* RN6390. Il s'agit d'un transposon conjugatif retrouvé chez la souche *Enterococcus faecalis* CG110 qui porte un gène de résistance à la tétracycline, *tetM* (Gawron-Burke and Clewell, 1982).

Pour permettre l'isolement de mutants, la souche receveuse *S. aureus* RN6390, sensible à la tétracycline, a donc été ensemencée sur une gélose avec un gradient de streptomycine jusqu'à l'obtention de cellules résistantes à 100 µg/mL de streptomycine.

Le Tn916 a été transféré par conjugaison de la souche donneuse, *E. faecalis* CG110, vers la souche receveuse, *S. aureus* RN6390 Sm^R. Pour la conjugaison, les souches ont été ensemencées dans 5 mL de bouillon Todd-Hewitt (THB) avec leurs antibiotiques respectifs et incubées à 37°C, sous agitation, pendant la nuit. Le lendemain, les cultures furent centrifugées et le culot, lavé trois fois et suspendu dans du bouillon THB frais. Les souches *E. faecalis* CG110 et *S. aureus* RN6390 Sm^R furent ensuite mélangées dans un ratio 1 : 100 et déposées (100 µL) sur une gélose sang pour permettre la conjugaison. Suite à une incubation à 37°C pour la nuit, les cellules furent récupérées avec du bouillon THB, lavées trois fois et étalées sur une gélose THA avec streptomycine (100 µg/mL) et tétracycline (10 µg/mL) pour une première ronde de sélection. Le lendemain, une deuxième ronde de sélection sur milieu contenant de la streptomycine et de la tétracycline a permis de récupérer les transconjugants, qui constituent en fait la banque de mutants de *S. aureus* RN6390. Cette banque fut ensuite congelée à -70°C.

3. Sélection sur streptonigrine

La banque de mutants fut étalée sur milieu THA contenant de la streptomycine (100 µg/mL), de la tétracycline (10 µg/mL) et de la streptonigrine à différentes concentrations (de 0 µg/mL à 1 µg/mL) et les géloses furent incubées à 37°C pour la nuit. Les colonies résistantes furent ensuite ensemencées sur gélose sang (TSA contenant 5% de sang de mouton) pour confirmer la production d'hémolyse, une caractéristique typiquement associée à *S. aureus* qui permet de le distinguer aisément d'*E. faecalis*.

Des amorces PCR furent également synthétisées (BioCorp, Montréal, QC, Canada) pour permettre l'amplification d'une partie du gène *tetM* porté par le Tn916. Les amorces Tn916TetMFor (5'-GGACGAAGCACTGAAATA-3') et TetMRev (5'-CGGTAAAGTTCGTCACACAC-3') permettaient d'amplifier un fragment de 2 170 pb

selon les conditions suivantes : 5 min. de dénaturation à 94°C; 30 cycles à 94°C pendant 1 min., 56°C pendant 1 min., 72°C pendant 1 min.; et finalement 7 min. d'élongation à 72°C.

4. Analyse des mutants par Southern blot

L'analyse de l'ADN génomique par Southern blot a permis de vérifier s'il y avait des mutants identiques et aussi de s'assurer qu'il n'y ait qu'une seule insertion du Tn916 dans le génome. L'ADN génomique des mutants a été extrait par homogénéisation avec des billes de zircon/silice de 0,1 mm de diamètre (BioSpec Products, Bartlesville, OK, États-Unis). Un volume de 1,5 mL d'une culture en bouillon a été centrifugé et le culot a été resuspendu dans 1 mL de tampon d'extraction (Tris-HCl 50 mM à pH8, EDTA 5 mM et SDS 3%) avec de la RNaseA à 1 mg/mL. Le mélange a ensuite été homogénéisé au « bead beater » (Mini-BeadBeater-8, BioSpec Products) pendant 3 minutes à 4°C et laissé sur glace pendant 1 minute avant d'être homogénéisé une seconde fois et centrifugé à 16 000 g pendant 3 minutes à 4°C. Le surnageant, qui contient l'ADN, a été récupéré et transféré dans un nouveau tube. De l'acétate d'ammonium à une concentration finale de 2 M a ensuite été ajouté et le mélange est resté sur glace pendant 5 minutes avant d'être centrifugé pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant a été récupéré et une nouvelle centrifugation a été faite afin d'éliminer les résidus et l'acétate d'ammonium restant. L'ADN a ensuite été précipité par l'ajout de 1 mL d'isopropanol, suivi d'une centrifugation à 16 000 g pendant 15 minutes à 4°C et le culot lavé avec de l'éthanol 75% suivi d'une centrifugation à 16 000 g pendant 5 minutes toujours à 4°C. Le surnageant a été retiré délicatement et le culot a séché à l'air pendant environ 10 minutes avant d'être suspendu dans 100 µL d'H₂O stérile. L'ADN extrait a finalement été dosé au spectrophotomètre à 260 nm.

Une quantité de 5 µg d'ADN génomique des mutants de *S. aureus* RN6390 résistants à la streptonigrine, furent donc digérés avec *EcoRI* (qui ne coupe pas dans le Tn916) à 37°C pendant deux heures. Les digestions furent ensuite déposées sur un gel d'agarose 0,7% baignant dans du tampon TAE 1X pour l'électrophorèse et l'ADN a migré avec un courant de 60 V pendant 3 heures.

Le transfert sur membrane s'est fait par capillarité dans une solution de NaOH 0,4M pendant la nuit. Le lendemain, l'ADN sur la membrane a été fixé aux U.V. pendant 2 minutes et la pré-hybridation s'est effectuée à 68°C pendant 5 heures dans une solution 5XSSC + 0,1% N-lauroylsarcosine + 0,02% SDS + 1% d'agent bloquant. La sonde utilisée a été synthétisée grâce aux amorces Tn916TetMFor et TetMRev et marquée à la Digoxigénine-11-dUTP (DIG) (Roche Diagnostic, Laval, Qc, Canada). L'hybridation avec cette sonde s'est fait à 68°C pendant la nuit. Une série de lavages consécutifs (2 fois 5 min. à température ambiante dans du 2XSSC + 0,1%SDS; 2 fois 15 min. à 68°C dans 0,2XSSC + 0,1% SDS pour forte stringence) fut nécessaire avant de détecter les signaux d'hybridation. La sonde marquée à la DIG fut détectée avec des anticorps anti-Digoxigénine, en utilisant le NBT/BCIP (Roche) comme substrat, selon les instructions du manufacturier.

5. Tests de promotion avec différentes sources de fer

Afin de vérifier s'il existait des différences dans l'utilisation de sources de fer par les mutants par rapport à la souche mère *S. aureus* RN6390 Sm^R, le 2,2'-dipyridyl (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) a été utilisé comme chélateur de fer. Ainsi, la concentration à laquelle la souche mère était incapable de croître a pu être déterminée. Cette concentration sera utilisée pour les expériences subséquentes en condition carencée en fer.

Par la suite, des disques portant les différentes sources de fer : hémoglobine bovine (200 µg); hémine bovine (26 µg ou 0,04 µM); ferritine (200 µg); ferrichrome (28 µg ou 0,04 µM); desferroxamine (66 µg ou 10 mM) (Sigma) furent déposés à la surface de 5 géloses THA-dipyridyl, chacune ayant préalablement étéensemencées avec 100 µL d'une suspension bactérienne (pour les 4 mutants et la souche mère) dans du tampon PBS. Les géloses ont été incubées à 37°C pour la nuit.

6. Identification du site d'insertion

L'ADN génomique des mutants a été digéré avec l'enzyme de restriction *HindIII*, une enzyme n'ayant qu'un seul site de restriction dans le Tn916, suivi d'une auto-ligation des fragments. Les produits de ligation ont ensuite été amplifiés par PCR avec deux amorces sortant du Tn916, soit les amorces Tn916Out (5'-CGCACATGCAACATTCTGA-3') et TetMRev (voir section 3 du présent chapitre) (Figure 19).

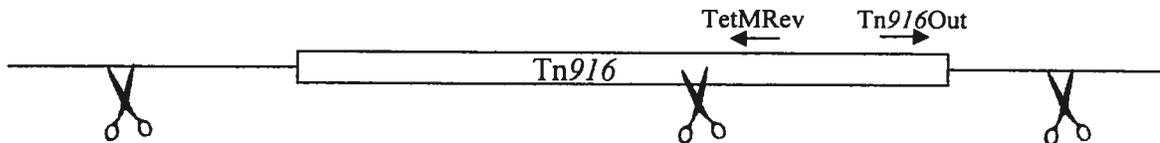


Figure 19 : Modèle illustrant les sites de restriction de *HindIII* dans l'ADN d'un mutant *S. aureus* par Tn916 et emplacement des amorces utilisées pour le PCR sur l'auto-ligation des fragments d'ADN digérés.

Les conditions du PCR sont les suivantes : 5 min. de dénaturation à 94°C; 40 cycles à 94°C pendant 1 min., 60°C pendant 1 min., 72°C pendant 1 min.; et finalement 7 min. d'élongation à 72°C.

Le produit PCR a ensuite été séquencé au Laboratoire d'analyse d'acides nucléiques de l'Université Laval (Québec, Qc, Canada) selon les directives du centre de séquençage. Les réactions de séquençage ont été effectuées avec la trousse « BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit » de Applied Biosystems, selon les recommandations du fournisseur. Les réactions ont ensuite été analysées avec l'appareil « Genetic analyser, model 3100 » de Applied Biosystems. L'amorce utilisée pour déterminer la séquence nucléotidique flanquant le transposon est l'amorce Tn916Out, qui se trouve à 255 pb de la fin du Tn916.

Dans le cas où il n'y a pas eu d'amplification à l'étape de PCR, le séquençage s'est fait directement sur l'ADN génomique du mutant suite à une digestion avec *HindIII* en utilisant la même amorce, soit Tn916Out. La réaction de séquençage nécessitait alors 10 µL d'ADN à séquencer par réaction à une concentration allant de 500 à 1000 ng/µL et nécessitait 4 fois plus de dNTPs marqués avec la « Big Dye Terminator ».

La recherche de similarités de séquences entre la séquence obtenue et celles compilées dans les bases de données, a été réalisée avec le programme BLAST disponible à partir du National Center for Biotechnology Information (NCBI).

L'alignement de séquences a été réalisé avec l'aide du programme ClustalW disponible sur internet (<http://clustalw.genome.jp/>).

La complémentarité de séquence (5'→3') a été effectuée avec le programme Practical Molecular Biology disponible sur internet (http://molbiol.edu.ru/eng/scripts/01_12.html).

7. RT-PCR

Afin de vérifier si le gène muté est régulé par la concentration en fer dans le milieu, la souche mère *S. aureus* RN6390 Sm^R futensemencée dans 100 mL de bouillon MHB sous-agitation à 37°C, pour la nuit. Le lendemain, la culture fut utilisée pour ensemen- cer 200 mL de MHB frais à une DO₆₀₀ d'environ 0,1 pour ensuite être incubée jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ de 0,6. Une fois la DO₆₀₀ = 0,6, la culture fut séparée en 2 x 100 mL pour créer les conditions Fer + / Fer -. Pour la condition Fer +, du FeCl₃ fut ajouté à la culture pour avoir une concentration finale de 5 µM, alors que pour la condition Fer -, du 2,2'-dipyridyl fut ajouté à une concentration finale de 0,6 mM. Les deux cultures ont ensuite été incubées jusqu'à DO₆₀₀ = 1.0 avant d'être séparées en aliquots de 5 mL, traitées au « RNA protect » (Qiagen Inc., Mississauga, ON, Canada), centrifugées et les culots, congelés à -70°C jusqu'à l'extraction de l'ARN.

L'extraction d'ARN s'est fait par homogénéisation du culot bactérien décongelé avec des billes de zircon/silice de 0,1 mm de diamètre (BioSpec Products) après l'ajout de 1 mL de RNAwiz (Ambion, TX, États-Unis) et de 200 µL de chloroforme. Le mélange a été homogénéisé au « bead beater » pendant 3 minutes et laissé à température pièce pendant 10 minutes avant d'être centrifugé à 10 000 g pendant 15 minutes à 4°C. La phase supérieure, qui contient l'ARN, a été récupérée et transférée dans un nouveau tube sans RNase auquel a été ajouté 500 µL d'H₂O traitée au DEPC pour éliminer les RNases. L'ARN a ensuite été

précipité par l'ajout de 1 mL d'isopropanol, suivi d'une centrifugation à 10 000 g pendant 15 minutes à 4°C et le culot lavé avec de l'éthanol 75% sans RNase suivi d'une centrifugation à 10 000 g pendant 5 minutes toujours à 4°C. Le surnageant a été retiré délicatement et le culot a séché à l'air pendant environ 10 minutes avant d'être suspendu dans 50 µL d'H₂O traitée au DEPC. L'ARN a ensuite été dosé au spectrophotomètre à 260 nm.

La synthèse d'ADNc à partir de l'ARN extrait s'est effectuée avec la Superscript II RT (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) et avec des octamères dN8 (BioCorp). Les échantillons ont été préparés avec un mélange de dNTPs, d'octamères, d'ARN et d'H₂O-DEPC. La dénaturation des hexamères s'est effectuée à 65°C, suivi d'une minute sur glace avant d'ajouter le tampon RT (1X) et le DDT (10mM). Les échantillons furent laissés à 42°C pendant 2 minutes juste avant d'ajouter la Superscript II RT (200U). Une incubation à 25°C pendant 10 minutes a précédé la synthèse d'ADNc à 42°C pendant 50 minutes. Par la suite, l'enzyme RT fut dénaturé à 70°C pendant 15 minutes.

Afin de vérifier l'expression des gènes mutés (*flp*, le gène codant pour la protéine ribosomale 30S et *dapE*) en présence et en absence de fer, les amorces utilisées pour le PCR sur l'ADNc de la souche mère sont FlpFor (5'-CGAAGACACGGTAAACCA-3') et FlpRev (5'-TGGTAGCCAAGTCAGTAC-3') qui amplifient un fragment de 1306 pb, DapEFor (5'-GTTAATGAACACCGCGCC-3') et DapERev2 (5'-GGCATCTGTTGCACCTACAA-3') qui amplifient un fragment de 914 pb ainsi que RibFor (5'-GTTGTAAGAGGGCGAC-3') et RibRev (5'-TACACCTGGTGCAATTTC-3') qui amplifient un fragment de 728 pb. Le gène *sirA* (numéro d'accès : AF079518), régulé par le fer, fut utilisé comme gène contrôle. Les amorces utilisées, soit SirAFor (5'-GTTGTTACGCTTGCTTTC-3') et SirARev (5'-CCGCCAGCTAAGTTCCAA-3'), amplifient un fragment de 888 pb. Le gène 16S rRNA (numéro d'accès : L37597.1) a été utilisé comme gène de ménage (Eleaume and Jabbouri, 2004). Les amorces utilisées, soit 16SFor (5'-CGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') et 16SRev (5'-GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCC-3'), amplifient un fragment de 480 pb.

8. Modèle d'infection chez la souris

Afin de comparer la virulence des mutants par rapport à la souche mère *S. aureus* RN6390 Sm^R, les collaborateurs de l'Université de Sherbrooke ont mis au point un modèle de mammité chez la souris (Brouillette *et al.*, 2003; Brouillette *et al.*, 2004a; Brouillette *et al.*, 2004b).

Des souris gestantes CD-1 (Charles River, St-Constant, Canada) furent utilisées 12-14 jours après la naissance des petits. Suite à l'anesthésie, le bout des mamelons fut désinfecté et coupé (1 mm de tissu enlevé) puis 100 µL d'inoculum bactérien fut injecté (100 UFC) dans le canal lactifère avec une aiguille. Deux glandes par souris ont été infectées, soit G4 et D4, qui représentent la quatrième paire de la tête à la queue. Pour chacune des souches testées, soit la souche mère *S. aureus* RN6390 Sm^R et ses quatre mutants, trois (3) souris et deux (2) glandes par souris ont été utilisées pour l'infection expérimentale pour un total de quinze (15) souris.

Le temps d'infection a été de douze (12) heures. Les glandes ont par la suite été prélevées stérilement et homogénéisées dans 2,5 mL final de PBS, puis les dilutions logarithmiques ont été étalées sur gélose MSA pour le décompte bactérien. Les résultats sont donnés en logarithme base 10 des UFC par gramme de glande mammaire.

Les recommandations du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) furent respectées pour toutes les procédures avec les animaux.

9. Puces à ADN

Les collaborateurs de l'Université de Sherbrooke ont également mis au point des puces à ADN (Allard *et al.*, 2005). Ces puces portent 460 gènes dont une centaine de gènes qui, d'après le génome de *S. aureus*, sont ou seraient probablement impliqués dans l'acquisition ou le métabolisme du fer.

Les bactéries ont donc été cultivées en présence (mutant LS24) et en absence de fer (*S. aureus* RN6390 Sm^R et mutants LS21; LS22; LS23; et LS24) avant d'extraire l'ARN. Cet ARN fut ensuite transcrit en ADN complémentaire fluorescent par transcription inverse avec un marquage aminé (5-[3-Amioally]-2-dUTP (Sigma)). Les ADNc ont été marqués aux fluorophores cyanine 3 et cyanine 5 (Cy3 ou Cy5) selon les conditions. Par exemple, l'ADNc marqué au Cy3 (vert) représente les gènes exprimés en présence de fer, alors que l'ADNc marqué au Cy5 (rouge) représente les gènes exprimés en absence de fer. Les ADNc marqués sont ensuite hybridés avec la puce. La pré-hybridation, l'hybridation et les étapes de lavage ont été faites selon les recommandations du fabricant des lames Corning Gaps II servant de puces (Corning). L'intensité des signaux fluorescents mesurés par l'instrument Packard ScanArray est quantifiée avec le logiciel Quantarray (Perkin Elmer). Les gènes exprimés en présence de fer seront en vert, les gènes exprimés en absence de fer seront en rouge, alors que les gènes exprimés dans les deux conditions seront en jaune. Le tableau 4 décrit les conditions étudiées avec les puces à ADN.

Tableau 4 : Souches et conditions étudiées avec les puces à ADN.

Souche X / condition		Souche Y / condition
<i>S. aureus</i> RN6390 Sm ^R / Fer(-)	vs	Mutant LS21 / Fer(-)
<i>S. aureus</i> RN6390 Sm ^R / Fer(-)	vs	Mutant LS22 / Fer(-)
<i>S. aureus</i> RN6390 Sm ^R / Fer(-)	vs	Mutant LS23 / Fer(-)
<i>S. aureus</i> RN6390 Sm ^R / Fer(-)	vs	Mutant LS24 / Fer(-)
Mutant LS24 / Fer(-)	vs	Mutant LS24 / Fer (+)

IV. RÉSULTATS

1. Construction d'une banque de mutants

Le Tn916 s'est inséré de façon aléatoire dans le génome de *S. aureus* RN6390 Sm^R par conjugaison. Ce transposon portant un gène de résistance à la tétracycline (*tetM*) a permis de générer une banque d'environ $1,05 \times 10^{11}$ mutants. Cette banque fut ensuite criblée pour la résistance à la streptonigrine.

2. Sélection sur streptonigrine

Environ 75% de la banque de mutants a ensuite été criblée sur streptonigrine permettant ainsi l'isolement de plusieurs colonies résistantes. Toutefois, il fallait confirmer, par un test d'hémolyse, que les colonies résistantes étaient bel et bien du *S. aureus* et non pas *E. faecalis*. Les résultats de l'hémolyse ont permis de confirmer que quatre (4) de ces colonies résistantes étaient des mutants de *S. aureus*. Ces derniers, nommés LS21, LS22, LS23 et LS24, ont été isolés à différentes concentrations de streptonigrine (Tableau 5). À noter que la souche mère, *S. aureus* RN6390 Sm^R était incapable de pousser sur un milieu en présence de telles concentrations de streptonigrine.

Tableau 5 : Concentration de streptonigrine à laquelle chaque mutant a été isolé.

Mutant	Concentration de streptonigrine
RN6390	< 0,250 µg/mL
LS21	0,250 µg/mL
LS22	0,375 µg/mL
LS23	0,375 µg/mL
LS24	0,375 µg/mL

Par la suite, l'amplification PCR a confirmé la présence du Tn916 dans l'ADN génomique des mutants *S. aureus* LS21-LS24 (Figure 20). Le produit PCR amplifié concorde avec le fragment attendu de 2 170 pb pour les mutants LS21, LS22, LS23 et LS24. Le PCR sur l'ADN de la souche mère *S. aureus* et sur l'ADN d'*E. faecalis* confirme que le fragment amplifié est spécifique au Tn916.

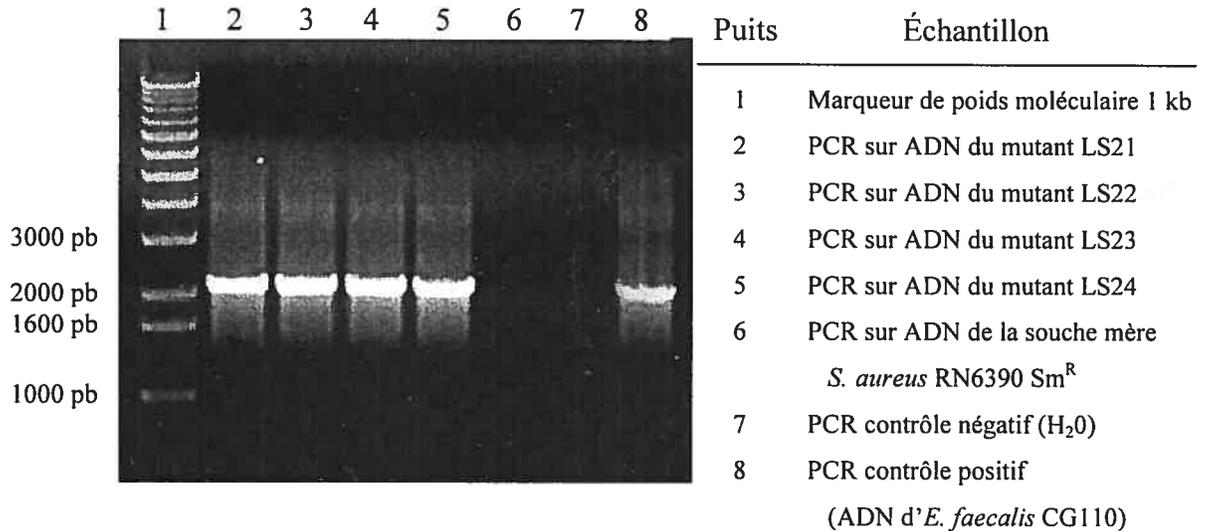


Figure 20 : Résultats du PCR pour l'amplification du Tn916 sur l'ADN génomique des mutants de *S. aureus* RN6390 Sm^R. Le produit attendu était de 2170 pb.

3. Analyse des mutants par Southern blot

L'analyse des résultats du Southern blot permet de vérifier si les mutants isolés sont identiques et aussi de s'assurer que les mutants ne contiennent qu'une seule insertion du Tn916 dans le génome. Les ADN génomiques ont tous été digérés avec l'enzyme de restriction *EcoRI* ainsi que le contrôle positif, soit le vecteur pAM120 qui porte le Tn916. Le contrôle négatif est représenté par la souche mère *S. aureus* RN6390 Sm^R. Pour le mutant LS24, les résultats indiquent qu'il y a eu plus d'une insertion du transposon, alors que pour les mutant LS21, LS22 et LS23, il n'y en a eu qu'une seule (Figure 21). Les mutants présentent tous un profil différent, ce qui permet de conclure que le transposon s'est inséré à différents endroits dans le génome.

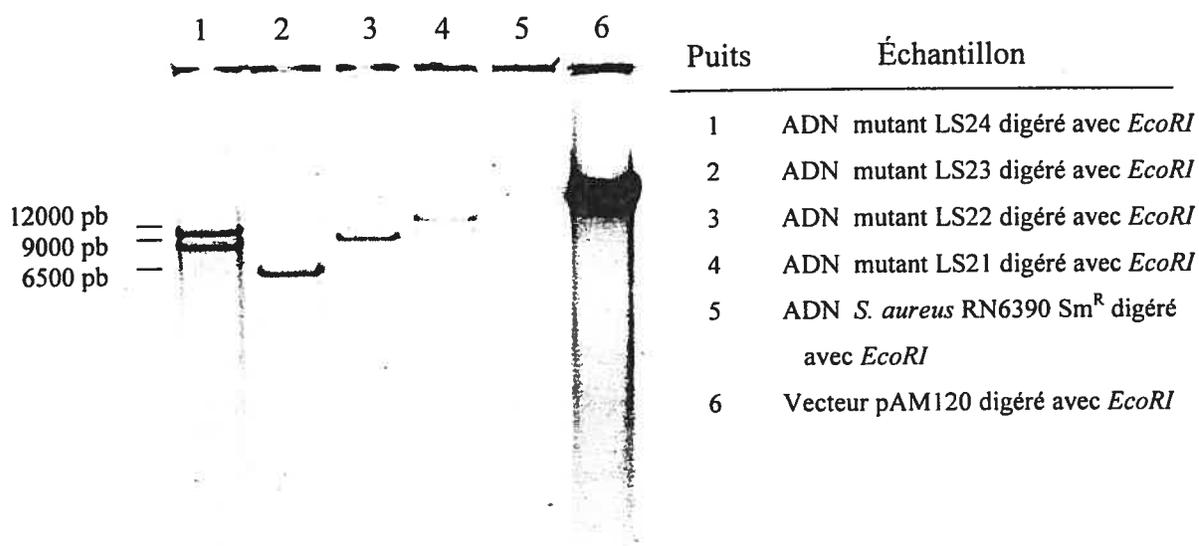


Figure 21 : Résultat du profil d'hybridation par Southern blot avec la sonde Tn916 marquée à la DIG.

4. Tests de promotion avec différentes sources de fer

Des tests de promotion ont été effectués avec différentes sources de fer afin de déterminer la capacité des mutants à les utiliser par rapport à la souche mère. Les résultats ont démontré que les mutants peuvent utiliser la plupart de ces sources de fer aussi bien que la souche mère, à l'exception de l'hémine bovine (Tableau 6). De plus, le mutant LS21 présente une faible croissance, toujours par rapport à la souche mère, avec l'hémoglobine et l'hémine bovine (les hémoprotéines) en plus du desferroxamine. Le mutant LS24, présente, en plus de l'hémine bovine, des difficultés de croissance en présence de l'hémoglobine bovine, donc avec les deux hémoprotéines. À noter que le terme « faible croissance » a été utilisé dans le cas où il n'y avait seulement qu'un léger voile bactérien autour du disque, comparativement à la souche mère, où des colonies étaient apparentes.

Tableau 6 : Résultats des tests de promotion avec différentes sources de fer. +, croissance; +/-, croissance très faible.

Souche	Hémoglobine bovine	Hémine bovine	Ferritine	Ferrichrome	Desferroxamine
RN6390 Sm ^R	+	+	+	+	+
LS21	+ / -	+ / -	+	+	+ / -
LS22	+	+ / -	+	+	+
LS23	+	+ / -	+	+	+
LS24	+ / -	+ / -	+	+	+

5. Identification du site d'insertion

Afin d'identifier le gène inactivé par l'insertion du Tn916 dans l'ADN génomique de *S. aureus*, la région adjacente au transposon fut séquencée. Le séquençage a été concluant pour le mutant LS23 suite au PCR sur le produit de ligation et la séquence obtenue présente 95% d'identité avec le gène *dapE* qui code pour la désuccinylase de l'acide N-succinyl-L-L-diaminopimélique (SDAP-déacylase) (Figure 22).

```

LS23      1  CGTNCAGGNCGNANNGNCCNCGGNTGAGAGGNGCANCACGAGCGTCTNTGTGCNTAN
S. aureus -----

LS23      61 ATNTTACGATGAATTTACTACGNATNTACCACTTCTGACNGCNAAGACNTGAGGAAANAT
S. aureus -----

LS23      121 GCNNNGAAACGTGAAGNATCTTCCTACNGTAAANATACNCGAAAGCACNTNGNATAANGC
S. aureus -----

LS23      181 TTTNCGAGCNTTTNAGAAAAATATAAAAAAGATAATTAGAAAATTTNACTTTGTTNAGAAT
S. aureus -----

LS23      241 AAAAATTATGTTTATATAAATATATATACTACTTTGAAANGGTGTGAGCTTCATGNCNGC
S. aureus -----ATGACAAC
                                     *** * *

LS23      301 NTTTAGTGAACATGNNGNAATTCGGTTACTAGCNGATMNTGTTGAACTACANACTGANNA
S. aureus 9 TTTTAGTGA AAAAGAAAAAATTC AATTACTAGCAGATATTGTTGAACTACAAACTGAAAA
      ***** * *      ***** ***** *** ***** ***** *

LS23      361 TACTAATGANATAGACGTTTGTAATTATTTAAAAGATTTATTCGACAAGTACNNTATTA
S. aureus 69 TAATAATGAAATAGACGTTTGTAATTATTTAAAAGATTTATTCGACAAGTACGATATTA
      ** ***** ***** ***** *****

LS23      421 ATCTGAAATTTTGAAAGTTAATGAACACCGCGCCAATATCGTTGCAGAAATCGGTAACGG
S. aureus129 ATCTGAAATTTTGAAAGTTAATGAACACCGCGCCAATATCGTTGCAGAAATCGGTAACGG
      *****

LS23      481 CTCACCTATACTCGTATTGAGTGGTCATATGGATGTTGTTGATGCAGGAAATCAAGATA
S. aureus189 CTCACCTATACTCGCATTGAGTGGTCATATGGATGTTGTTGATGCAGGAAATCAAGATA
      *****

LS23      541 TTGGACTTATCCCCCTTTTCAACTCACAGAAAAAGATGGCAAATTATACGGTCGAGGCAC
S. aureus249 TTGGACTTATCCCCCTTTTCAACTCACAGAAAAAGCTGGCAAATTATACGGTCGAGGCAC
      *****

LS23      601 AACGGATATGAAAGGCGGTCTGATGGCTTTGGTCATCACACTCATTGAATTTAAAAGAACA
S. aureus309 AACGGATATGAAAGGCGGTCTGATGGCTTTGGTCATCACACTCATTGAATTTAAAAGAACA
      *****

LS23      661 AAATCAATTGCCCTCAAGGAACGATAAGATTACTAGCTACTGCTGGCGAAGAGAAAGAACA
S. aureus369 AAATCAATTGCCCTCAAGGAACGATAAGATTACTAGCTACTGCTGGCGAAGAGAAAGAACA
      *****

LS23      721 AGAAGGTGCCAAAATTATTGGCTGATAA-GGCTATTTAGACGATGTAGATGGCTTAATT - -
S. aureus429 AGAAGGTGCCAAAATTATTGGCTGATAAAGGCTATTTAGACGATGTAGATGGCTTAATTAT
      *****

LS23      778 -----
S. aureus489 TGCTGAACCAACTGGATCTGGAATTTATTATGCACATAAAGGGTCTATGTCATGTAAAGT

```

Figure 22 : Alignement de la séquence *dapE* obtenue après le séquençage de la région adjacente au *Tn916* (boîte jaune) chez le mutant LS23 et de la séquence *dapE* chez *S. aureus* Mu50 (Numéro d'accès: AP003364; SAV2006).

Le Tn916 se serait donc inséré dans la région promotrice du gène *dapE* (Figure 23), soit 57 pb en amont du gène, empêchant ainsi la fixation de l'ARN polymérase et donc l'expression de la SDAP-déacylase.

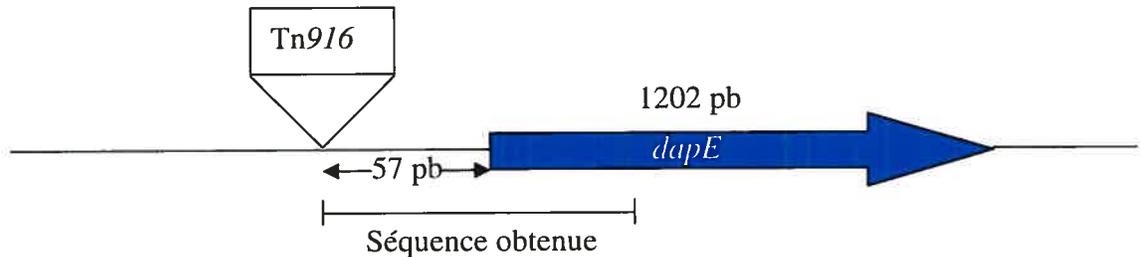


Figure 23: Modèle illustrant l'insertion du Tn916 dans l'ADN du mutant LS23.

La recherche de séquences consensus associées aux boîtes Fur et SirR n'a pas permis, par alignement de séquences, d'identifier ces boîtes.

Pour les mutants LS21 et LS22, l'approche utilisée pour l'amplification et le séquençage de LS23 n'a pas fonctionné. L'ADN génomique de ces mutants a donc été digéré avec *HindIII* avant d'être séquencé au Laboratoire d'analyse d'acides nucléiques de l'Université Laval tel que mentionné précédemment. Le séquençage s'est effectué directement sur le génome, toujours avec l'amorce Tn916Out.

Pour le mutant LS21, la séquence obtenue présente 98% d'identité avec SAV2441, récemment nommé *flp*, un gène de 1 497 pb qui code pour la « *fntA*-like protein » ou FLP (Figure 24).

```

LS21      748  TATCTTTTCCGTCITTTAAGTTCTCTGTITTTTAAAGGTTGCCCTATAATAAGTCITTTA
S. aureus  -----

LS21      688  AAGTTGATTGAAACATAAATCTCCTATTCCCTTTTATACTTTTTGATGGATATCACTATAC
S. aureus  -----

LS21      628  GCCTATCTTTCCAAAAAGTATAGAGAGTTAATTAATATTTTTTATGTAATTATACGCCTA
S. aureus  -----

LS21      568  TTAACATATAAGGTGTCAAAAATAATGGTAAATATACCTCTTTAATTAATTTATTCAATG
S. aureus  -----

LS21      508  GAACTGGTATAATAAAAATAAATCTCATTAGGCACTTAAGTAAATTTAACATATAAAAAG
S. aureus  -----

LS21      448  AACGTTTATGACTACTAAAAAAGTATTTTTCTATCCATTTCTATTATCATTTTAGTCGC
S. aureus  -----ATGACTACTAAAAAAGTATTTTTCTATCCATTTCTATTATCATTTTAGTCGC
                *****

LS21      388  CATTTC AATTGCTATATATATAACATTTAAATAGCAATACGAAGACACGGTTAACCAATGA
S. aureus  53  CATTTC AATTGCTATATATATAACATTTAAATAGCAATACGAAGACACGGTTAACCAATGA
                *****

LS21      328  TTCGCAACAACAAAATAGATACAATTATCGAACATGATTTACAAAAGGGACATATTCCTGG
S. aureus  113  TTCGCAACAACAAAATAGATAAAAATATCGAGCATGATTTACAAAAGGGACACATTCCTGG
                *****

LS21      268  AGCATCAATTTTAATAGTAAACAAAGTATAAAATTTCTAATTATCTTT-TTATATTTTCTT
S. aureus  AGCATCAATTTTAATAGTAAAAAATGGCAAAGTTTTTTTAAATAAAGGTTATGGTTATCA
                ***** ** * ** * * ** * ** * ** *

LS21      208  AAATGCTCGTAAAGC-----CTTATTCTATGT----GCNTTCGAGTATTTTTACTGT
S. aureus  173  AGATGTTGATAAAAAAGTCAAAGCTTCTCCACAACAAAGTATGAAATGCTTCTAATAAC
                * * * * * ** * * * * * * * * * *

LS21      148  AGGA-----AGATACTTCACGTTTCTNTGCATATTTCTCCTCATGTCTTAGCTGTCAGAAG
S. aureus  233  TAAAGCTTTCACAGGCTTTCGCAATTTTAAAATTAGCTCAAGAAGGTCGATTAAACTTAAA
                * * * * * ** * * * * * ** * * * * *

LS21      88  TGGTAAATAAGTAGTAAATTCATTTNTCTCTACTAAGCAACAAGANNNGNNGCTGANNCT
S. aureus  293  TGATGACGTATCCAAACATGTGCCCTCATTTTAAAAATGAACATAAATGGTCAAAAATGAAAC
                ** * * * * * ** * * * * * * * * * *

LS21      28  TCTCTTTATTNCAANGCGTTTCATTTCC-----
S. aureus  353  TATTACGATTAAGCAACTTTTGGCTCAAACAAGTGGTATACCCTAGTGATATTACAAGCGA
                * * * * * ** * * * *

```

Figure 24: Alignement de la séquence complémentaire (5' → 3') obtenue après le séquençage de la région adjacente au Tn916 (boîte jaune) chez le mutant LS21 et de la séquence du gène *SAV2441* (*flp*) chez *S. aureus* Mu50 qui code pour la « fmtA-like protein » ou FLP (Numéro d'accès: AP003365; *SAV2441*). La boîte rouge représente le début du gène *SAV2440* qui code pour une protéine similaire à une perméase pour acides aminés.

Le transposon se serait donc inséré dans le gène *SAV2441* (*flp*) empêchant ainsi la traduction du gène et donc, l'expression de la protéine FLP (Figure 25).

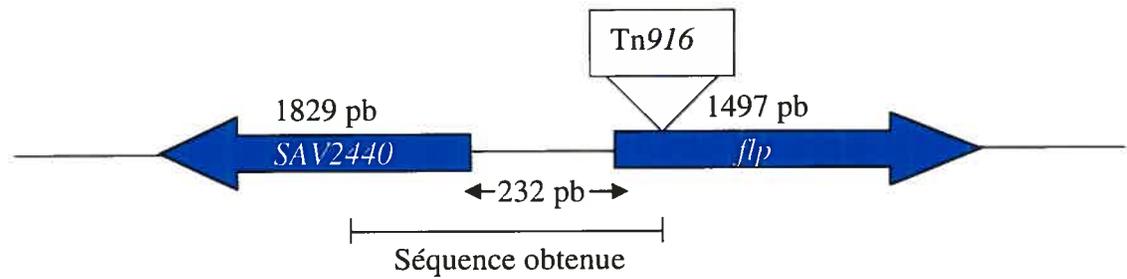


Figure 25: Modèle illustrant l'insertion du Tn916 dans l'ADN du mutant LS21.

Encore ici, la recherche de séquences consensus associées aux boîtes Fur et SirR n'a pas permis, par alignement de séquences, d'identifier ces boîtes.

Pour LS22, la séquence obtenue présente des homologies avec le gène *SAV1476* (175 pb) qui code pour la « 30S ribosomal protein S1 » (Figure 26).

```

LS22      1  TGGCGGAAATGAAACGCCTTGTAATAAAGAGAAGNANCNNMMTCNNTCTTGTTGCTTAG
S. aureus  -----

LS22      61  TAGANANAAATGAATTTACTACTTATTTACCACTTCTGACAGCTAAGACATGAGGAAATA
S. aureus  -----

LS22     121  TGCANAGAAACGTGAAGTATCTTCTACAGTAAAAATACTCGAAAGCACATAGAATAAAG
S. aureus  -----

LS22     181  CTTTACGAGCATTTAAGAAAAATATAAAAAAGATAATTAGAAATTTATACTTTGTTTGTATT
S. aureus  -----

LS22     241  AAAAAATATGTATAAACATAGCGGACTTTATTACTTGTGTTGAATATATGGTTGTAATCAAT
S. aureus  -----

LS22     301  ATATGTCCAACCTAATATACAGAAATGAGATTAAGTGACATATTTATGGATAACAACAAATTT
S. aureus  -----

LS22     361  ACTAAATGTAATAAAGGTAGAATTTCTGACAAATTCTGTCAGTTTATAAGATGTTATAAA
S. aureus  -----

LS22     421  TATGTANTGATATGAGGAGGCAAACAAGATGACTNAAGAATTCAATGAATCAATGATTAAC
S. aureus  -----
                    ATGACTGAAGAAATTCATGAATCAATGATTAAC
                    *****

LS22     481  GATATTAAGAAGGTGACAAAGTCAC'TGGCGAGGTACAACAAGTTGAAGACAAGCCAGTT
S. aureus  34  GATATTAAGAAGGTGACAAAGTCAC'TGGCGAGGTACAACAAGTTGAAGACAAGCAAGTT
                    *****

LS22     541  GTTGTTCATATCCACNGTAGTAAATTTAATGGGATTATTCCTATTAGTCAACTATCTACG
S. aureus  94  GTTGTTCATATCAACGGTGGTAAATTTAATGGGATTATTCCTATTAGTCAACTATCTACG
                    *****

LS22     601  CGTCATATTGATAGCCCAAGTGAAGTTGTAAAAGAGGGCGACCAAGTTGAAGCATATGTC
S. aureus  154  CATCATATTGATAGCCCAAGTGAAGTTGTAAAAGAGGGCGACGAAGTTGAAGCATATGTC
                    * *****

LS22     661  ACTAAAGTTGAGTTT'TGATGAAGAAAATGAACCTGGAGCTTACATCTTATCTTGAAGACA
S. aureus  214  ACTAAAGTTGAGTTT-GATGAAGAAAATGAAACTGGAGCTTACATCTTATCTAGAAGACA
                    *****

LS22     721  ACTTTGAAACTGAG-----
S. aureus  274  ACTT-GAAACTGAGAAGTCTTATAGTTATTTACAAGAAAATTAGATAATAATGAAATCA
                    ****

```

Figure 26: Alignement de la séquence obtenue après le séquençage de la région adjacente au Tn916 (boîte jaune) chez le mutant LS22 et de la séquence du gène SA_{V1476} chez *S. aureus* Mu50 qui code pour la « 30S ribosomal protein S1 » (Numéro d'accès: BA000017; SA_{V1476}). Les séquences consensus sont en vert (boîte TTGACA) et en rouge (boîte TATA).

Le transposon se serait donc inséré entre les gènes *SAVI476* et *SAVI477* qui code pour une petite protéine hypothétique (Figure 27). Ces numéros correspondent à la position des locus dans le génome de la souche *S. aureus* Mu50.

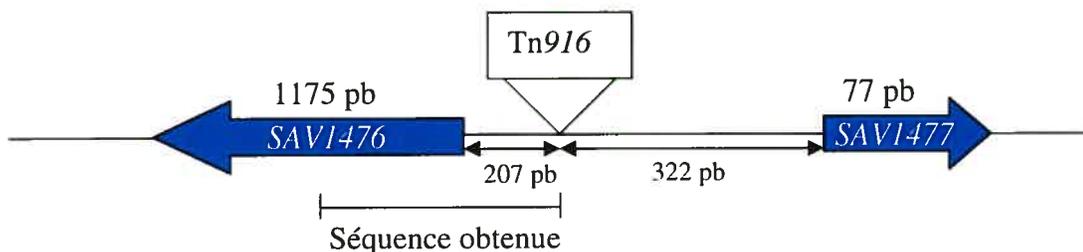


Figure 27: Modèle illustrant l'insertion du *Tn916* dans l'ADN du mutant LS22.

Comme la souche RN6390 n'a pas été séquencée, il est possible que les gènes autour du site d'insertion soient différents d'une souche à l'autre. Ainsi, afin de vérifier si l'insertion du *Tn916* peut avoir un effet sur le gène *SAVI477* et aussi afin de connaître exactement la distance entre le site d'insertion du transposon et ce gène, une nouvelle amorce sortant de l'autre côté du transposon, *Tn916Dbt* (5'-GAATGAATGTTTGATGGTC-3') fut synthétisée. L'analyse des séquences obtenues démontre qu'il y aurait présence d'une boîte Fur de l'autre côté du site d'insertion (Figure 28).

```

LS22      1  TTTGTTTTTCNTNNGTTCACCTCCATTTNNAATCGGGTAAAAAAATANNCACCTCATTTTT
Boîte Fur  -----

LS22     61  TGAAGTGCTACCTATTAAATATTCAAATTTTATTGGAAGTATCTTTATATCTTCACCTT
Boîte Fur  -----

LS22    121  TCAAGGATAAAATCNTCGTATCAAAGCTCATTCATAANTAGTAAATTAGTAGTAAATTGAG
Boîte Fur  -----

LS22    181  TGGTTTTGACCTTGATAAAAGTGTGATAAGTCCAGTTTTTTATGCGGATAACTAGATTTTTTA
Boîte Fur  -----

LS22    241  TGCTATTTTAAATACAAAAATTAGCATAGCTCACTATTTTGTTTTATAAGTNTGTCATTT
Boîte Fur  -----

LS22    301  CATTGTTCTCTACAAGATATATTATAGTAAATTTTATACTTTTATAAAACAAAAAGCCA
Boîte Fur  -----

LS22    361  CGAAATAAGCAACTTTTACATTTG--AATAGTAAGAAGACGGTATAATAGTGCATCTTT
Boîte Fur  -----
                ACTATTACTATTAGTAATAGT-----
                ***:****:;*  *****

LS22    421  TNNNAATTATTACATAGGTCATTTTTTGNNACTAAAACAGCTTCTTTTGCAATACTTAGAT
Boîte Fur  -----

LS22    481  TTGTAACACTCATTTNCTTACCATTNGCAAAATGCTTTATGAATGTAATGNAATTATTTT
Boîte Fur  -----

LS22    541  TGNAANTCCAATAATTTNCCTTNTANCNATTNCTGGNTTACTTTTNGGAAAAANCTTACA
Boîte Fur  -----

LS22    601  CCAATNNACNGNCGCCNTTNGCTTTTTTCCAAAAANNAAAAAGGCCACTTTTCNNTCCNN
Boîte Fur  -----

LS22    661  CNNTNGAATAAAAACNCCNCCCTTTTAANTTTGGNNAACCATTNNTCNGACCTNCCAATT
Boîte Fur  -----

LS22    721  TGNTNATNCCCTAAACCGTNTCACCTTTCCAAATCGNNNNCNCNTGACCTTNCTCCANN
Boîte Fur  -----

LS22    781  TTCAANN
Boîte Fur  -----

```

Figure 28: Alignement de la séquence adjacente au *Tn916* (boîte jaune) obtenue suite au séquençage du mutant LS22 (avec l'amorce *Tn916*Dbt) et de la séquence consensus palindromique de la boîte Fur. La boîte verte représente l'amorce *Tn916*Dbt3 utilisée pour le deuxième séquençage.

Une boîte Fur se trouve donc, chez *S. aureus* RN6390, en amont du gène homologue au gène *SAVI477* de la souche *S. aureus* Mu50 (Figure 29).

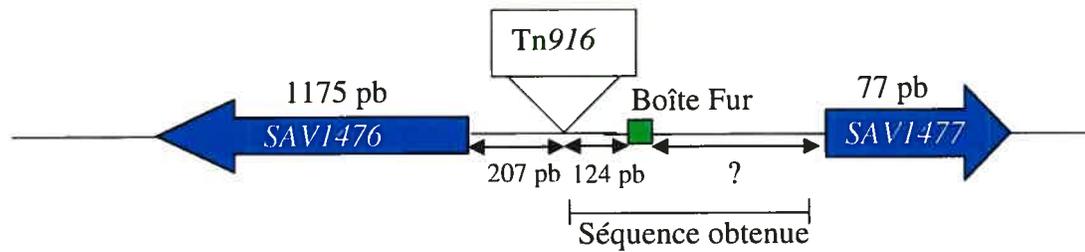


Figure 29 : Présence d'une boîte Fur (en vert) en amont du gène homologue à *SAVI477* chez le mutant LS22.

Une seconde amorce fut synthétisée Tn916Dbt3 (5'-CGTATATAGTGCATCTTTCTC -3') (boîte verte, figure 28) et utilisée pour un autre séquençage afin d'identifier le gène adjacent à cette boîte Fur. Les résultats démontrent, chez *S. aureus* Mu50, un pourcentage d'identité de 96% avec deux gènes (Figure 30). Le premier code pour une petite protéine hypothétique, alors que le deuxième code pour la cytidylate kinase.

LS22 1 GAATTATTACATAGGTCATTTTTTTGTGACTAAAACAGCTTCTTTTGCATACTTAGATTT
S. aureus -----

LS22 61 GTAACACTCATTCTTACCATTGTAATAATGCTTTATGAATGAATGAATTATTTTTGG
S. aureus -----

LS22 121 AATTCTAATAATTTACCTTTATTATTTCTGTTTACTTTTTGAAAACTTACACAATTGAC
S. aureus -----TTACTTTTTGAAAACTTACACAATTCAC
***** **

LS22 181 TGACGCATTTGCTTTTACCAAAAATAAAAAGGCAACTTTCATTCATCGTTGAATAAAAAT
S. aureus 30 TGACGCATGAACTTTTACCAAAAATAAAAAGGCAACTTTCATTCATCAT-----
***** :.*****.*

LS22 241 CACCTTTTAATTTGAGTAAATCATTATCAGAACATTCAAATTTGTATATGCGTTAAGCGTT
S. aureus -----

LS22 301 GCACATTACAAATAGATAGTTATGACTTACTAGATTATTTAATTTGACTCACCATCGCTA
S. aureus -----TTATTTAATTTGACTCACCATCGCTA

LS22 361 AAATTCGTCAGTAACTTCTTCAATCGTCTTGCCGTGCGTATCTAATGTCACCTGCATCAT
S. aureus 27 AAATTCGTCAGTAACTTCTTCAATCGACTTCCCTGCGTATCTAATGTCACCTGCATCAT
***** :.*****.*

LS22 421 CTGCTTTTCTTAATGGTGATATTTACGGTTCATGTCATATGATCACGTGCTTCAATAT
S. aureus 87 CTGCTTTTCTTAATGGTGATATTTACGGTTCATGTCATATGATCACGTGCTTCAATAT
***** :.*****.*

LS22 481 CACGTTTAAATCTTCAAAATTTGATTCGATACCTCTTAATGATTATCTTTATATCTTC
*S. aureus*147 CACGTTTAAATCTTCAAAATTTGATTCGATACCTCTTAATGATTATCTTTATATCTTC

LS22 541 TTTCTGCTCGCTCTTCAACTGATGCAATCATATATACTTTTAAATCTGCATCTGGTAGCA
*S. aureus*207 TTTCTGCTCGCTCTTCAACTGATGCAATCATATATACTTTTAAATCTGCATCTGGTAGCA

LS22 601 CTACAGATCCGATATCGCGACCATCCATTACGATACCTTTTTCTGCAGCTAACTCTTTT
*S. aureus*267 CTACAG- TTCCGATATCGCGACCATCCATTACGATACCTTTTTCTGCAGCTAACTCTTTT
***** *****

LS22 661 TGTTTTTTAACGGCGAATAAACGTACTGGCTCTTTAGATGCAACGTATGAAACATGTTGC
*S. aureus*327 TGTTTTTTAACGGCGAATAAACGTACTGGCTCTTTAGATGCAACGTATGAAACATGTTGC
***** .*****.*

LS22 721 GTCACATCATTATTTCTTAAAAGGCGTGNTACATCT-CGGTATCENNAATG--ACCATGG
*S. aureus*387 GTCACATCATTATTTCTTAAAAGGCGTGNTACATCT-CGGTATCENNAATG--ACCATGG
*****.* **.****** ** *.* ***** **.*:*.:

LS22 781 ACCTTTTCNGCTTAN--AGTTAAATCTAAGNNG--TTGGGCCACTAGTTTGGCAAGGCC
*S. aureus*447 ACCTTTTCNGCTTAN--AGTTAAATCTAAGNNG--TTGGGCCACTAGTTTGGCAAGGCC
.* **.*:*.*****: ***** .. *****.* *****.* **

LS22 841 CANG--TTGGTTAATTTNAAAATTGG--AGGTAAGGCCN--AAAATGGCCCG----G
*S. aureus*507 CANG--TTGGTTAATTTNAAAATTGG--AGGTAAGGCCN--AAAATGGCCCG----G
.* **.* *****.*:*. :.* **.* **.* **.* **.* **.* **.*

```

LS22      901 AACNANAAAANATGAAGTCCGNGG--ACACCGTTCCCATNG--ATTTTNGGGGNCNNGG
S. aureus567 ACATAAATCATTGATAGTTCGCTGK TACACGTTTCGCAATGTACTTTTCGGGAGCA
          *...* *:..*.: ::* ** * **** ** * :. * ** . * .
LS22      961 GCCNTNANGNAANAAGGGGTNGGNGATTCCCCCGGGGN
S. aureus627 CTGGACCATCTAATGCAATATTAATGGCTTTCAT----
          ** . . . . . : * : * ..* . : * * .

```

Figure 30 : Alignement de la séquence obtenue suite au séquençage du mutant LS22 avec l'amorce Tn916Dbt3 et de la séquence complémentaire (5'→ 3') du gène SAVI477 (en bleu) qui code pour une protéine hypothétique et de la séquence complémentaire (5'→ 3') du gène SAVI478 (en rouge) qui code pour la cytidylate kinase.

Le Tn916 se trouve donc à 192 pb du gène SAVI477 pb, qui lui, est séparé du gène SAVI478 par 85 pb (Figure 31).

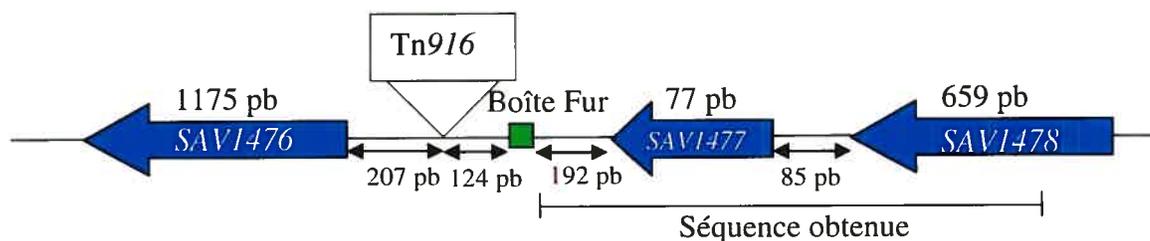


Figure 31 : Modèle illustrant la disposition des gènes et de la boîte Fur chez le mutant LS22.

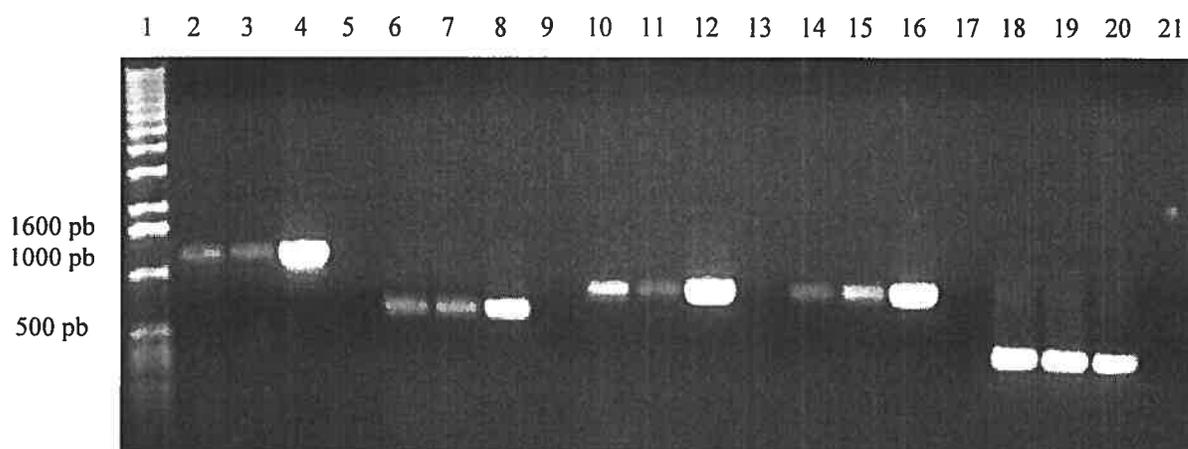
Les résultats du séquençage démontrent que le gène SAVI477, qui code pour une protéine hypothétique, est présent chez les souches Mu50 et N315. De plus, la recherche de similarités de séquence avec le programme BLAST a permis de confirmer la présence de cette protéine hypothétique chez les souches Mu50 (100% d'identité) et N315 (100% d'identité), mais aussi chez les souches COL (98% d'identité) et MRSA252 (93% d'identité). Pour le gène SAVI478, il est présent chez les souches N315 (98% d'identité), MW2 (98%), MSSA476 (98%), COL (98%), Mu50 (98%) et MRSA252 (98%).

Toutefois, l'orientation des gènes SAVI477 et SAVI478 ne permet pas de prétendre que ces gènes sont régulés par la protéine Fur. La boîte Fur régulerait plutôt le gène SAVI476 qui code pour la « 30S ribosomal protein S1 ». En effet, la transcription du gène, régulée par la protéine Fur, pourrait être empêchée par la présence du Tn916 entre le gène et cette boîte Fur.

Pour ce qui est du mutant LS24, les résultats du séquençage montrent un seul signal jusqu'à 240 pb (correspondant au Tn916) et par la suite, il y a détection de deux signaux, ce qui confirme les résultats du Southern blot qui montraient une double insertion. Ces deux signaux empêchent donc l'identification du gène responsable du phénotype de la résistance à la streptonigrine.

6. RT-PCR

Le RT-PCR a permis de déterminer si les gènes mutés sont régulés, chez la souche mère, par la concentration en fer présente dans le milieu de culture. Pour le gène de ménage, soit le gène 16S rRNA qui code pour un ARN ribosomal, l'expression semble constante, peu importe la condition observée (Figure 32). Pour ce qui est du gène contrôle, soit *sirA* qui est régulé par le fer, il est plus fortement exprimé en absence de fer qu'en présence de fer, ce qui concorde avec la littérature (Heinrichs et al., 1999). Les résultats obtenus avec les gènes inactivés chez les mutants n'ont démontré, chez la souche mère *S. aureus* RN6390 Sm^R, aucune régulation par le fer (Figure 32). En effet, les gènes semblent aussi bien exprimés en présence qu'en absence de fer, à l'exception du gène *dapE* qui est plus exprimé en présence de fer qu'en absence de fer chez la souche mère.



Puits	Échantillon
1	Marqueur de poids moléculaire 1 kb
2	PCR pour amplifier <i>flp</i> sur ADNc de la souche mère RN6390 Sm ^R en présence de fer
3	PCR pour amplifier <i>flp</i> sur ADNc de la souche mère RN6390 Sm ^R en absence de fer
4	PCR pour amplifier <i>flp</i> sur ADN de la souche mère RN6390 (contrôle positif)
5	PCR pour amplifier <i>flp</i> sur H ₂ O (contrôle négatif)
6	PCR pour amplifier <i>rib</i> sur ADNc de la souche mère RN6390 Sm ^R en présence de fer
7	PCR pour amplifier <i>rib</i> sur ADNc de la souche mère RN6390 Sm ^R en absence de fer
8	PCR pour amplifier <i>rib</i> sur ADN de la souche mère RN6390 (contrôle positif)
9	PCR pour amplifier <i>rib</i> sur H ₂ O (contrôle négatif)
10	PCR pour amplifier <i>dapE</i> sur ADNc de la souche mère RN6390 Sm ^R en présence de fer
11	PCR pour amplifier <i>dapE</i> sur ADNc de la souche mère RN6390 Sm ^R en absence de fer
12	PCR pour amplifier <i>dapE</i> sur ADN de la souche mère RN6390 (contrôle positif)
13	PCR pour amplifier <i>dapE</i> sur H ₂ O (contrôle négatif)
14	PCR pour amplifier <i>sirA</i> sur ADNc de la souche mère RN6390 Sm ^R en présence de fer
15	PCR pour amplifier <i>sirA</i> sur ADNc de la souche mère RN6390 Sm ^R en absence de fer
16	PCR pour amplifier <i>sirA</i> sur ADN de la souche mère RN6390 (contrôle positif)
17	PCR pour amplifier <i>sirA</i> sur H ₂ O (contrôle négatif)
18	PCR pour amplifier 16S sur ADNc de la souche mère RN6390 Sm ^R en présence de fer
19	PCR pour amplifier 16S sur ADNc de la souche mère RN6390 Sm ^R en absence de fer
20	PCR pour amplifier 16S sur ADN de la souche mère RN6390 (contrôle positif)
21	PCR pour amplifier 16S sur H ₂ O (contrôle négatif)

Figure 32 : Résultats du RT-PCR sur la souche mère *S. aureus* RN6390 Sm^R en présence et en absence de fer pour les gènes responsables de la résistance à la streptonigrine.

7. Modèle d'infection chez la souris

Afin de comparer, *in vivo*, la croissance des mutants par rapport à la souche mère *S. aureus* RN6390 Sm^R, un modèle d'infection chez la souris mis au point par les collaborateurs de l'Université de Sherbrooke fut utilisé. Les résultats indiquent une diminution de la croissance des mutants par rapport à la souche mère (Figure 33) et cette diminution de croissance est significative pour tous les mutants par rapport à la souche mère. L'analyse statistique a été effectuée par ANOVA (one-way analysis of variance) et avec le test Tukey-Kramer.

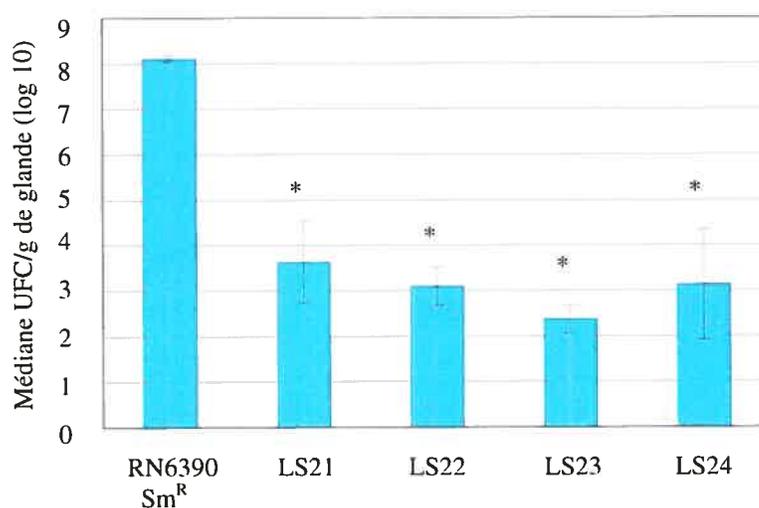


Figure 33: Graphique illustrant la croissance des mutants LS21 à LS24 de *S. aureus* RN6390 Sm^R par rapport à la souche mère dans un modèle de mammite chez la souris. * : P < 0,001.

Afin de confirmer ces résultats, la croissance de ces 4 mutants résistants à la streptonigrine fut évaluée en condition *in vitro*, en absence de tétracycline. Comme les résultats furent recueillis après 12 heures d'infection dans le modèle de mammite, la courbe de croissance a été effectuée sur 12 heures avec une prise de DO₆₀₀ après 24 heures, en plus d'effectuer aussi la courbe de croissance pour un mutant X de la souche *S. aureus* RN6390 Sm^R (aussi par Tn916), mais streptonigrine sensible.

Les résultats démontrent (Figure 34) que la croissance des mutants, en absence de tétracycline et par rapport à la souche mère, est légèrement atténuée (temps de latence et temps de doublement), même dans un milieu riche en fer.

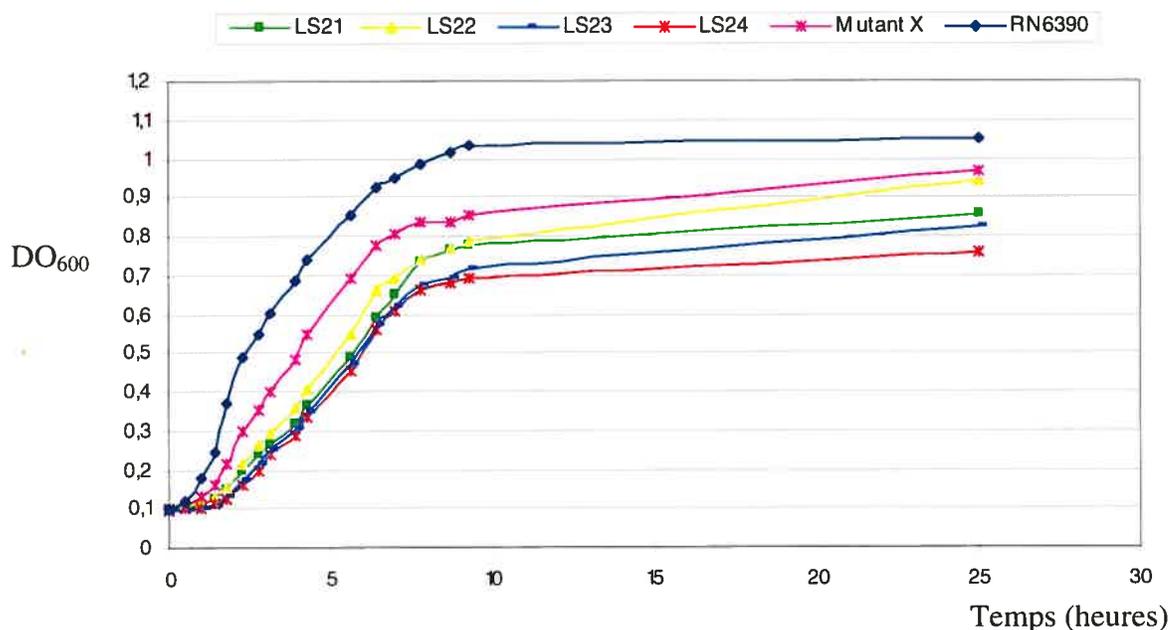


Figure 34: Courbes de croissance de la souche mère *S. aureus* RN6390 Sm^R et de cinq mutants en bouillon MHB sans ajout de tétracycline.

8. Puces à ADN

Les hybridations sur puces démontrent que les systèmes de transport du fer paraissent généralement moins induits en absence de fer chez les mutants LS21, LS22, LS23 et LS24 que chez la souche mère *S. aureus* RN6390 Sm^R (Tableau 7). En effet, un ratio mutant / souche mère < -1 démontre une induction plus faible chez le mutant comparativement à la souche mère, alors que ce ratio, lorsque >1 montre une surexpression du gène chez le mutant. La plupart des gènes impliqués dans l'acquisition du fer sont donc plus exprimés chez la souche mère que chez les mutants, mais sont tout de même légèrement induits chez ces derniers (Tableau 7). Le patron d'expression semble très semblable entre les 4 mutants.

À noter que le système *isd*, impliqué dans le transport de l'hème, semble le plus affecté dans son induction (boîte rose, Tableau 7) et dans son niveau d'expression pour tous les mutants (boîte bleue, Tableau 7). De plus, le système de production et de capture de la staphylobactine semble davantage supprimé chez le mutant LS21 (boîte orange, Tableau 7).

ORF COL	gene	description	Log2 ratio mutant-Fer (cy5) / parent-Fer (cy3)				Log2 ratio LS24-Fer (cy5) / LS24+Fer (cy3)	Log2 ratio SHY97-Fer (cy5) / SHY97+Fer (cy3)
			LS21	LS22	LS23	LS24	LS24	SHY97-3906
SA0097	<i>sirC</i>	Possible staphyloactin ABC transporter	-0.90	-0.56	-0.12	-0.36	0.90	2.63
SA0098	<i>sirB</i>	Possible staphyloactin ABC transporter	-2.56	-2.10	-1.77	-2.16	0.29	4.34
SA0099	<i>sirA</i>	Possible staphyloactin ABC transporter	-4.32	-3.14	-2.64	-2.23	2.96	6.09
SA0100	<i>sbnA</i>	Staphyloactin biosynthesis, pyridoxal-phosphate dependent enzyme	-3.84	-2.77	-2.50	-2.18	3.25	7.27
SA0101	<i>sbnB</i>	Staphyloactin biosynthesis, ornithine cyclodeaminase, putative	-3.84	-2.67	-2.47	-2.16	2.65	5.09
SA0102	<i>sbnC</i>	Staphyloactin biosynthesis, siderophore biosynthesis protein, lucC family	-3.37	-2.27	-2.02	-1.91	3.12	7.20
SA0104	<i>sbnE</i>	Staphyloactin biosynthesis, lucA family	-2.94	-2.37	-1.98	-1.91	2.85	6.40
SA0105	<i>sbnF</i>	Staphyloactin biosynthesis, lucC family	-2.84	-2.37	-1.96	-1.64	2.77	6.65
SA0106	<i>sbnG</i>	Staphyloactin biosynthesis	-2.56	-2.35	-1.94	-1.71	2.16	5.74
SA0107	<i>sbnH</i>	Staphyloactin biosynthesis, pyridoxal-dependent decarboxylase	-2.71	-2.12	-1.85	-1.43	2.81	6.73
SA0108	<i>sbnI</i>	Staphyloactin biosynthesis	-2.74	-2.18	-1.96	-1.72	3.06	4.58
SA0161		conserved hypothetical protein (Fur box search)	-0.72	-1.22	-0.40	-0.85	0.94	3.16
SA0688	<i>mntC</i>	Possible manganese ABC transporter, ATP-binding protein	1.28	1.80	1.31	0.77	0.33	1.57
SA0689	<i>mntB</i>	Possible manganese ABC transporter, ATP-binding protein	0.88	1.42	1.17	0.75	0.57	1.10
SA0690	<i>mntA</i>	Possible manganese ABC transporter, ATP-binding protein	0.80	1.46	1.26	0.70	0.79	1.81
SA0691	<i>mntR</i>	Divalent metal ion-dependant transcriptional repressor	1.11	0.24	0.35	0.24	0.64	0.76
SA0704	<i>fluA</i>	Ferrichrome transport ATP-binding protein	0.32	-0.23	0.02	0.30	2.68	3.59
SA0705	<i>fluB</i>	Ferrichrome transport permease	0.73	0.25	0.18	0.30	1.75	2.85
SA0706	<i>fluG</i>	Ferrichrome transport permease	0.66	0.18	-0.19	-0.21	1.47	2.67
SA0796	<i>ssaA</i>	Possible ferrichrome ABC transporter, permease	-1.84	-2.18	-1.58	-1.71	1.85	4.63
SA0797	<i>ssaB</i>	Possible ferrichrome ABC transporter, permease	-1.46	-1.53	-1.37	-1.38	1.81	3.36
SA0798	<i>ssaC</i>	Possible ferrichrome ABC transporter, ATP-binding protein	-1.38	-1.24	-0.81	-1.25	0.70	2.47
SA0799	<i>ssdD</i>	Possible ferrichrome ABC transporter, membrane-bound lipoprotein	-1.79	-1.51	-1.42	-1.33	2.14	4.25
SA0977	<i>frpA</i>	Fur-regulated protein A, possible membrane protein	-0.73	-0.46	-0.43	-0.51	0.49	3.53
SA1045		Possible ferrichrome ABC transp. ATP-binding	-1.91	-1.37	-1.38	-1.38	0.23	1.96
SA1138	<i>isdB</i>	heme-iron transport, LPXTG cell wall surface anchor protein	-4.14	-2.98	-3.32	-3.84	-0.18	4.96
SA1140	<i>isdA</i>	heme-iron transport, LPXTG cell wall surface anchor protein	-4.42	-3.27	-2.94	-2.98	2.19	2.83
SA1141	<i>isdC</i>	heme-iron transport, NPQTN cell wall surface anchor protein	-3.98	-3.06	-2.71	-3.18	0.12	3.01
SA1142	<i>isdD</i>	iron-regulated surface determinant (isd)	-0.45	-0.65	-0.64	-1.11	-0.47	0.40
SA1143	<i>isdE</i>	heme-iron transport, lipoprotein	-3.42	-2.71	-2.53	-3.02	-0.04	4.31
SA1144	<i>isdF</i>	heme-iron transport, iron/heme permease	-2.80	-2.23	-1.51	-2.30	-0.51	3.23
SA1145	<i>srtB</i>	sortase B	-2.40	-1.56	-1.26	-2.30	-0.20	1.65
SA1146	<i>isdG</i>	heme-iron transport, cytoplasmic protein	-1.58	-	-0.29	-1.14		3.99
SA2138	<i>cztB</i>	Co(III)/Zn(II)-specific sensor	-1.37	-0.14	-0.35	-0.59	0.20	1.96
SA2165	<i>hnsA</i>	Possible heme-iron transport system, ABC transporter permease	-0.10	-0.03	-0.14	0.02	2.81	3.97
SA2166	<i>hnsB</i>	Possible heme-iron transport system, ABC transporter permease	-0.58	-0.20	-0.18	-0.18	2.63	4.09
SA2167	<i>hnsC</i>	Possible heme-iron transport system, ABC transporter, ATP-binding protein	-2.40	-1.38	-1.17	-1.11	4.90	5.79
SA2170		putative transporter (Fur box search)	-0.99	-1.47	-0.84	-0.93	2.46	3.21
SA2277	<i>fluD2</i>	Ferrichrome transport membrane receptor	-0.78	-0.80	-0.40	0.00	3.35	4.50
SA2369		pyridine nucleotide disulfide reductase (Fur box search)	-0.17	-0.67	-0.19	-0.01	2.43	1.44
SA2431		ABC transporter, ATP binding/permease (Fur box search)	-1.47	-0.32	-0.27	-1.18		3.21
SA2564	<i>feoB</i>	Possible iron-transport protein	0.06	-0.34	-0.15	-0.27	1.00	1.46

Gènes au moins 2 fois "sous-exprimés" dans son expérience (log2 ratio= -1)
Ratios en caractères gras ont au moins un log2 ratio <= -2.5)
Gènes au moins 2 fois "sur-exprimés" dans son expérience (log2 ratio >= 1).
Le fond de couleur bleu montre la sous-expression importante du système *isd* pour le transport de l'hème chez tous les mutants.
Le fond de couleur orange montre en plus que la synthèse du sidérophore staphyloactine est affectée chez le mutant LS21.
Le fond de couleur jaune montre que le système de transport du ferrichrome n'est pas affecté chez les mutants.
Le fond de couleur rose montre que le système de transport de l'hème n'est pas induit normalement chez LS24.

Tableau 7: Résultats de la modulation des gènes connus pour le transport du fer (et surexprimés chez la souche SHY97-3906 en absence de fer) chez les mutants LS21 à LS24.

Le profil du mutant LS24 a pu être étudié en présence et en absence de fer. Les résultats démontrent que la plupart des systèmes d'acquisition du fer sont surexprimés en absence de fer, comparativement à la présence de fer (Tableau 7). De plus, le fait que ce mutant ait été étudié dans les deux conditions permet de prétendre, en plus, que les gènes impliqués dans le transport ou le métabolisme du fer, sont surexprimés chez ces mutants en absence de fer, mais moins que chez la souche mère *S. aureus* RN6390 Sm^R.

Bref, les mutations, chez ces 4 mutants, n'empêchent pas totalement l'expression des gènes, mais on note une diminution de transcription par rapport à la souche mère.

V. DISCUSSION

Le fer est un nutriment essentiel à la croissance de pratiquement tous les microorganismes. Toutefois, même s'il est présent en forte quantité chez l'hôte, la concentration à laquelle le fer est disponible est de beaucoup inférieure à celle requise pour la croissance bactérienne puisqu'il est emprisonné par des protéines de l'hôte telle que l'hémoglobine, l'hémine, la transferrine et la ferritine. Les bactéries pathogènes ont donc été forcées de s'adapter à ces conditions en développant une réponse qui leur permet de récupérer ces molécules de fer. Ces mécanismes d'acquisition du fer sont, encore à ce jour, mieux connus chez les bactéries à Gram négatif, principalement chez *E. coli*, que chez les bactéries à Gram positif comme *S. aureus*.

L'objectif de cette étude était donc de générer des mutants de *S. aureus* résistants à la streptonigrine et potentiellement déficients au niveau de l'acquisition du fer, pour ensuite identifier les gènes mutés.

Avant de travailler avec le Tn916, le projet s'effectuait avec une souche de champ de *S. aureus* (SHY97-3906) et avec le Tn917, un transposon de la même famille que le Tn916. Toutefois, les résultats issus de ces expériences n'ont pas été concluants, mais méritent tout de même d'être mentionnés. J'invite donc le lecteur à prendre connaissance de ces résultats et des conclusions qui en découlent dans l'annexe I. Pour l'instant, voyons de plus près les résultats obtenus avec le Tn916.

La construction d'une banque de mutants avec la souche *S. aureus* RN6390 Sm^R a permis l'isolement de quatre (4) mutants résistants à la streptonigrine, soit LS21 à LS24.

Pour ce qui est des résultats du séquençage, il est à noter que le génome de *S. aureus* a été séquençé chez six (6) souches différentes, soit Mu50, N315, COL, MRSA252, MSSA476 et MW2. Les résultats des séquençages des mutants ont été analysés à partir de la souche Mu50, mais les mêmes gènes sont présents chez la plupart des 6 souches.

Pour les mutants LS21 et LS22, l'approche utilisée pour le séquençage de LS23 n'a pas fonctionné. Il est probable que le fragment à amplifier était de taille trop volumineuse. Le séquençage s'est donc fait directement sur le génome suite à une digestion avec l'enzyme de restriction *HindIII*.

Pour le mutant LS21, la séquence obtenue démontre que le Tn916 s'est inséré directement dans un gène homologue au gène *SAV2441* de la souche *S. aureus* Mu50 qui code pour la FLP (« FmtA-like protein »), une protéine de 56,4 kDa. Il n'y a pas si longtemps, le gène codant pour la FLP fut identifié comme étant le gène *flp* (fmtA-like protein) (Komatsuzawa *et al.*, 2000).

Comme son nom l'indique, cette protéine possède une certaine homologie avec la protéine FmtA produite par le gène *fmtA*, soit 25% d'identité (Figure 35) (Komatsuzawa *et al.*, 2000). De plus, ces deux protéines possèdent une partie C-terminale hydrophobe permettant leur ancrage dans la membrane (Komatsuzawa *et al.*, 2000).

La FmtA (factor which affects the methicillin resistance level and autolysis in the presence of Triton X-100) serait un des facteurs responsables de la résistance à la méthicilline chez *S. aureus*, même si sa fonction précise demeure inconnue (Komatsuzawa *et al.*, 1997). De plus, la présence du gène *fmt* a été vérifiée par PCR et le gène semble être présent parmi toutes les souches de *S. aureus* testées, incluant des souches sensibles à la méthicilline (Komatsuzawa *et al.*, 1997).

La protéine FLP présente aussi des homologies avec des PBPs (penicillin binding proteins) dont 33% d'identité avec celle de *B. subtilis* (Komatsuzawa *et al.*, 2000). En effet, la FLP possède trois (3) motifs conservés qui sont présents chez les PBPs et les β -lactamases. De plus, les PBPs sont reconnues pour être responsables de l'assemblage, du maintien et de la régulation des structures peptidiques du peptidoglycane (Loo *et al.*, 2000). Des mutations dans des gènes responsables de la biosynthèse du peptidoglycane peuvent donc résulter en un manque de rigidité de la membrane cellulaire.

Pour le mutant LS22, le Tn916 s'est inséré 207 pb en amont du gène homologue au gène *SAV1476* et 322 pb en amont du gène homologue au gène *SAV1477* de la souche *S.*

aureus Mu50. Le premier de ces gènes code pour une protéine ribosomale 30S et le second code pour une protéine hypothétique. Comme il est possible de repérer les séquences consensus en amont du gène homologue au gène *SAV1476* (Figure 26), il est probable que l'ARN polymérase puisse se fixer et débiter la transcription. On peut donc conclure que l'expression du gène n'est pas affectée par l'insertion du *Tn916* et donc que la protéine ribosomale sera synthétisée.

Afin de connaître exactement la distance qui sépare le *Tn916* du gène homologue au gène *SAV1477* chez le mutant LS22, le séquençage s'est aussi fait dans l'autre sens avec l'amorce *Tn916Dbt*. Suite aux séquences obtenues, aucune homologie avec *SAV1477* (77 pb) n'a pu être démontrée, mais l'alignement de séquences permet de prétendre à une régulation par le fer étant donnée la présence d'une boîte Fur. Par contre, le second séquençage avec l'amorce *Tn916Dbt3* a démontré la présence du gène *SAV1477*, qui est présent chez les souches Mu50 et N315, et ensuite du gène *SAV1478* (ou *cmk* pour cytidine monophosphate kinase) présent chez la plupart des souches séquencées jusqu'à maintenant. Le premier de ces gènes code pour une petite protéine hypothétique de 77 pb (*SAV1477*), alors que le second code pour la cytidylate kinase (*SAV1478*). Toutefois, étant donné l'orientation de ces deux gènes, il est très peu probable que la protéine Fur puisse avoir un effet sur ces gènes (Figure 31).

Pour le mutant LS23, l'insertion du *Tn916* s'est faite dans la région promotrice du gène *dapE*, un gène de 1 224 pb qui code pour la désuccinylase de l'acide N-succinyl-L-L-diaminopimélique (SDAP-déacylase). Cet enzyme est impliqué, chez *E. coli*, dans la voie de synthèse de l'acide *meso*-diaminopimélique (DAP) (Figure 36). Toujours chez *E. coli*, DAP est reconnu pour être le précurseur de la lysine et aussi une composante structurale du peptidoglycane (Born *et al.*, 1998; Karita *et al.*, 1997).

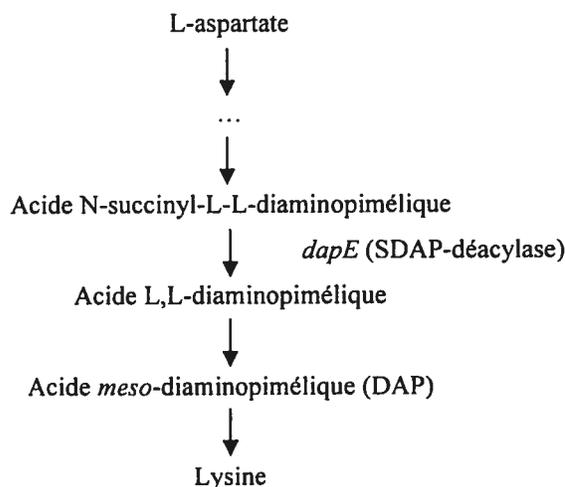


Figure 35: Voie de synthèse de la DAP, le précurseur de la lysine.

Toutefois, les monomères composant le peptidoglycane diffèrent, chez *E. coli* par rapport à *S. aureus*, dans la nature du troisième acide aminé dans la chaîne L-alanyl- γ -D-glutamyl- X -D-alanyl-D-alanine, où X est l'acide *meso*-diaminopimélique chez *E. coli* ou la L-lysine chez *S. aureus* (Mengin-Lecreulx *et al.*, 1999). De plus, ce troisième résidu de la chaîne peptidique joue un rôle clé dans l'intégrité du peptidoglycane puisqu'il est directement impliqué dans les liaisons peptidiques.

Certains métaux comme le Co^{2+} , le Mn^{2+} ou le Zn^{2+} peuvent jouer un rôle dans l'action de la streptonigrine, comme c'est le cas avec le fer, en augmentant son effet bactériostatique (White and Yeowell, 1982). Le fait que la SDAP-déacylase possède une activité aspartyl peptidase Mn^{2+} -dépendante (Broder and Miller, 2003) peut expliquer pourquoi le mutant LS23 a été isolé sur milieu contenant de la streptonigrine.

Une observation intéressante est que, chez le mutant LS21, tout comme chez LS23, le gène muté présente un lien avec le peptidoglycane. En effet, pour le gène *flp* qui a été muté chez LS21, la protéine produite, FmtA-like protein, tout comme la protéine FmtA, est associée à la synthèse du peptidoglycane (Komatsuzawa *et al.*, 2000). Pour le gène *dapE*, chez LS23, la protéine produite mène à la synthèse de la lysine, une composante structurale du peptidoglycane. Le fait que cette caractéristique revienne chez deux mutants résistants à la streptonigrine mérite une attention particulière. L'hypothèse expliquant l'isolement des

mutants LS21 et LS23 sur streptonigrine pourrait être en lien avec la synthèse du peptidoglycane. Dans le cas où une protéine impliquée dans la synthèse du peptidoglycane serait mutée, il est probable que l'intégrité de ce dernier soit affectée. Ainsi, il est possible que ceci modifie l'entrée du fer dans la cellule, peut-être à cause d'une protéine réceptrice mal ancrée dans la membrane, déstabilisée ou encore inaccessible. Ainsi, la streptonigrine ne pourrait pas se complexer au fer pour exercer son effet de dégradation sur l'ADN. D'un autre côté, il est possible que ce soit l'entrée de la streptonigrine dans la bactérie qui soit empêchée par l'intégrité du peptidoglycane.

Les tests de promotion effectués avec les sources de fer ont démontré quelques différences dans l'utilisation, par les mutants, des hémoprotéines (hémoglobine et hémine bovine) par rapport à la souche mère RN6390 Sm^R. Ces différences peuvent être dues à une incapacité des hémoprotéines de s'accrocher à leur récepteur situé sur la membrane (Figure 8), récepteur qui est peut-être déstabilisé par la mutation dans la biosynthèse du peptidoglycane. Ainsi, l'incorporation du noyau hème serait plus laborieuse.

Comme mentionné plus tôt, la recherche de séquences consensus associées aux boîtes Fur et SirR (homologue à DtxR chez *C. diphtheriae*) a pu être effectuée sur chacune des séquences obtenues suite au séquençage. Cette recherche a permis d'identifier, par alignement de séquences, une boîte Fur chez le mutant LS22. Les résultats du RT-PCR (Figure 32) confirment que les gènes mutés (*flp* chez le mutant LS21 et *dapE* chez le mutant LS23) ne sont pas régulés par le fer. Pour ce qui est du mutant LS22, où la présence d'une boîte Fur a été mise en évidence en amont du gène responsable de la synthèse d'une protéine ribosomale 30S, il n'y a aucune différence d'expression détectable en présence ou en absence de fer. Il est probable que la boîte Fur identifiée soit trop loin du gène dont la transcription a été étudiée, une hypothèse qui s'appuie sur la présence de séquences consensus (boîtes verte et rouge, Figure 26) en amont du gène et juste avant l'insertion du Tn916. Comme le RT-PCR est une technique semi-quantitative, il aurait été intéressant de compléter avec un PCR en temps réel, qui fournit des données beaucoup plus précises.

La double insertion du Tn916 dans le mutant LS24 empêche l'identification du gène responsable du phénotype de résistance à la streptonigrine. Toutefois, l'utilisation des puces à ADN, mises au point par nos collaborateurs de l'Université de Sherbrooke, aurait

pu permettre l'identification, par génomique comparative, du gène responsable de l'isolement du mutant LS24 sur streptonigrine. Ces puces portent 460 gènes de *S. aureus*, dont une centaine de gènes du génome de *S. aureus*, qui seraient probablement impliqués dans l'acquisition du fer. Toutefois, comme il s'agit d'une hybridation transcriptomique et non génomique, il n'a pas été possible d'identifier le gène responsable de la résistance à la streptonigrine, mais il semble que le mutant ait le même profil que les trois autres.

Les résultats des puces à ADN démontrent que tous les mutants expriment beaucoup moins plusieurs composantes du système de transport de l'hème (locus *isd* COL SA1138-SA1146) (boîte bleue, Tableau 7). Ceci pourrait expliquer leur incapacité à utiliser aussi bien l'hémine ou l'hémoglobine que la souche mère. Ce locus *isd* porte aussi la sortase B de *S. aureus* (COL SA1145), une enzyme impliquée dans l'attachement de certaines composantes du système *isd* au peptidoglycane, plus précisément sur la lysine ou au moins indirectement sur la lysine. L'expression des protéines IsdA, IsdB et IsdC, qui possèdent le signal sortase LPXTG ou l'équivalent, est d'ailleurs moins forte chez les mutants que chez la souche mère (Tableau 7). Ainsi, l'hypothèse sur l'intégrité du peptidoglycane pour les mutant LS21 et LS23 est d'autant plus forte empêchant ainsi le positionnement du système *isd*. Toutefois, il reste à découvrir comment une mauvaise intégration des composantes des systèmes de transport du fer peut affecter la transcription de ces gènes.

Les résultats montrent aussi que le mutant LS21 sous-exprime aussi fortement les gènes nécessaires à la production du sidérophore staphylobactine (locus *sbn* COL SA0100 à SA0102 et SA0104 à SA0108) (boîte orange, Tableau 7), ce qui pourrait expliquer sa difficulté à obtenir le fer à partir de la desferroxamine si celui-ci agit comme un chélateur plus qu'une source de fer directement utilisable, c'est-à-dire dans le cas où la staphylobactine arracherait le fer de la desferroxamine pour favoriser l'acquisition du complexe FeIII-staphylobactine par *S. aureus*.

Le système de transport du ferrichrome ne semble pas affecté chez les mutants (boîte jaune, Tableau 7). Ceci explique les résultats obtenus lors des tests de promotion, à savoir leur capacité d'utiliser le ferrichrome.

Les résultats montrent aussi que le mutant LS24 est quand même capable d'induire la plupart des systèmes de transport du fer lors d'une carence du milieu, sauf pour le système de transport de l'hème (boîte rose, Tableau 7). Les résultats montrent aussi que, quoique induits, le niveau d'expression des systèmes d'acquisition du fer chez LS24 est beaucoup moins élevé que ce qu'on observe chez une souche contrôle SHY97-3906 (Tableau 7). Toutefois, il serait nécessaire d'étudier les niveaux d'induction chez la souche mère *S. aureus* RN6390 Sm^R, en présence et en absence de fer.

En ce qui concerne le modèle de mammite chez la souris, il a été possible d'évaluer la croissance des mutants, en conditions *in vivo*, en comparaison avec la souche mère. Les résultats permettent de prétendre qu'il y a une diminution de la capacité de se multiplier chez les mutants LS21 à LS24 (Figure 33). En effectuant une courbe de croissance en milieu riche, soit dans un bouillon MHB sans tétracycline, on a pu constater que les mutants streptonigrine résistants ainsi que le mutant X sensible à streptonigrine, ont une croissance atténuée par rapport à la souche mère (Figure 34). Ceci implique que le transposon s'est inséré au niveau de gènes importants pour la croissance, comme les gènes impliqués dans la synthèse du peptidoglycane, expliquant partiellement la différence significative observée dans le modèle de mammite (Figure 33), où les mutants pourraient être désavantagés étant donné leur faible taux de croissance. En fait, il aurait été intéressant d'étudier plusieurs autres facteurs, dont l'état général de la souris par la présence de signes cliniques comme de la fièvre et la présence de lésions macroscopiques. Au niveau post-mortem, il aurait été intéressant de faire une coupe histologique des glandes mammaires et de vérifier l'infiltration de cellules immunitaires telles que des neutrophiles et des macrophages. Ainsi, il aurait été possible de vérifier la virulence des mutants par rapport à la souche mère.

VI. CONCLUSION

La mutagenèse avec le Tn916 a permis de générer une banque de mutants. De cette banque, quatre (4) mutants de *S. aureus* RN6390 résistants à la streptonigrine ont été isolés : 2 mutants au niveau de la biosynthèse du peptidoglycane; 1 mutant présentant une boîte Fur; et 1 mutant possédant plus d'une insertion.

Les gènes responsables du phénotype ont été identifiés, à l'exception du mutant LS24, où la double insertion du transposon dans l'ADN du mutant empêche l'identification du gène responsable de la résistance à la streptonigrine. Pour les autres mutants, ce sont les gènes *flp* (mutant LS21), le gène codant pour la protéine ribosomale 30S (mutant LS22) et le gène *dapE* (mutant LS23) qui ont été affectés.

Ces mutants présentent quelques différences dans l'utilisation des sources de fer par rapport à la souche mère, tel que démontré directement par les tests de promotion et indirectement par les résultats des puces à ADN. De plus, un taux de croissance plus faible chez les mutants, par rapport à la souche mère, peut expliquer, en partie, les résultats obtenus dans le modèle de mammite chez la souris. Toutefois, il aurait été intéressant d'étudier d'autres paramètres, dans ce modèle, pour vérifier la virulence des mutants.

Quoiqu'il en soit, le fait de combiner la mutagenèse avec le Tn916 et la streptonigrine comme antibiotique pour la sélection de mutants semble être une approche efficace. Le criblage d'un plus grand nombre de mutants ainsi que l'ajout d'une source de fer devraient permettre l'isolement de mutants ayant une modification génétique au niveau des systèmes d'acquisition du fer. L'ajout d'une source de fer rendrait ainsi le criblage plus spécifique.

VI. BIBLIOGRAPHIE

- Ahn, Y.J., Park, S.K., Oh, J.W., Sun, H.Y., and Shin, S.H. (2004) Bacterial growth in amniotic fluid is dependent on the iron-availability and the activity of bacterial iron-uptake system. *J Korean Med Sci* **19**: 333-340.
- Allard, M., E. Brouillette, H. Moisan, M. Jacques, P. Lacasse, M.S. Diarra, and F. Malouin. 2005. Transcriptomic analysis of iron-regulated genes in *Staphylococcus aureus*. Fourth Montreal Microarray Symposium, Biotechnology Research Institute, NRCC, Montreal, 17-18 mars 2005.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K., and Rodriguez-Quinones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 215-237.
- Archer, G.L. (1998) *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Clin Infect Dis* **26**: 1179-1181.
- Barton, M.D., Pratt, R., and Hart, W.S. (2003) Antibiotic resistance in animals. *Commun Dis Intell* **27 Suppl**: S121-126.
- Bellamy, W., Takase, M., Wakabayashi, H., Kawase, K., and Tomita, M. (1992) Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J Appl Bacteriol* **73**: 472-479.
- Bergey, D.H., and Holt, J.G. (1994) *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Bolzan, A.D., and Bianchi, M.S. (2001) Genotoxicity of streptonigrin: a review. *Mutat Res* **488**: 25-37.
- Born, T.L., Zheng, R., and Blanchard, J.S. (1998) Hydrolysis of N-succinyl-L,L-diaminopimelic acid by the *Haemophilus influenzae* *dapE*-encoded desuccinylase: metal activation, solvent isotope effects, and kinetic mechanism. *Biochemistry* **37**: 10478-10487.
- Braun, V., Gross, R., Koster, W., and Zimmermann, L. (1983) Plasmid and chromosomal mutants in the iron(III)-aerobactin transport system of *Escherichia coli*. Use of streptonigrin for selection. *Mol Gen Genet* **192**: 131-139.
- Brock, T.D., and Madigan, M.T. (1991) *Biology of microorganisms*. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice Hall.
- Broder, D.H., and Miller, C.G. (2003) DapE can function as an aspartyl peptidase in the presence of Mn²⁺. *J Bacteriol* **185**: 4748-4754.

- Brouillette, E., Lacasse, P., Shkreta, L., Belanger, J., Grondin, G., Diarra, M.S., Fournier, S., and Talbot, B.G. (2002) DNA immunization against the clumping factor A (ClfA) of *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* **20**: 2348-2357.
- Brouillette, E., Talbot, B.G., and Malouin, F. (2003) The fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* may promote mammary gland colonization in a lactating mouse model of mastitis. *Infect Immun* **71**: 2292-2295.
- Brouillette, E., Grondin, G., Lefebvre, C., Talbot, B.G., and Malouin, F. (2004a) Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol* **101**: 253-262.
- Brouillette, E., Martinez, A., Boyll, B.J., Allen, N.E., and Malouin, F. (2004b) Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure *in vivo*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **41**: 35-41.
- Brown, J.S., and Holden, D.W. (2002) Iron acquisition by Gram-positive bacterial pathogens. *Microbes Infect* **4**: 1149-1156.
- Brown, J.S., and Holden, D.W. (2002) Iron acquisition by Gram-positive bacterial pathogens. *Microbes Infect* **4**: 1149-1156.
- Bullen, J.J., and Griffiths, E. (1987) *Iron and infection: molecular, physiological, and clinical aspects*. Chichester; Toronto: Wiley.
- Cabrera, G., Xiong, A., Uebel, M., Singh, V.K., and Jayaswal, R.K. (2001) Molecular characterization of the iron-hydroxamate uptake system in *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1001-1003.
- Camilli, A., Portnoy, A., and Youngman, P. (1990) Insertional mutagenesis of *Listeria monocytogenes* with a novel Tn917 derivative that allows direct cloning of DNA flanking transposon insertions. *J Bacteriol* **172**: 3738-3744.
- Chung, J.H., Park, M.H., Kim, J.H., Lim, Y., and Shin, S.H. (2003) Growth and siderophore production of staphylococci in human peritoneal dialysate. *J Korean Med Sci* **18**: 158-162.
- Cockayne, A., Hill, P.J., Powell, N.B., Bishop, K., Sims, C., and Williams, P. (1998) Molecular cloning of a 32-kilodalton lipoprotein component of a novel iron-regulated *Staphylococcus epidermidis* ABC transporter. *Infect Immun* **66**: 3767-3774.
- Courcol, R.J., Trivier, D., Bissinger, M.C., Martin, G.R., and Brown, M.R. (1997) Siderophore production by *Staphylococcus aureus* and identification of iron-regulated proteins. *Infect Immun* **65**: 1944-1948.
- Crosa, J.H. (1989) Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol Rev* **53**: 517-530.

- Dale, S.E., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G., and Heinrichs, D.E. (2004) Role of siderophore biosynthesis in virulence of *Staphylococcus aureus*: identification and characterization of genes involved in production of a siderophore. *Infect Immun* **72**: 29-37.
- Diarra, M.S., Petitclerc, D., and Lacasse, P. (2002a) Effect of lactoferrin in combination with penicillin on the morphology and the physiology of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *J Dairy Sci* **85**: 1141-1149.
- Diarra, M.S., Petitclerc, D., and Lacasse, P. (2002b) Response of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis to exogenous iron sources. *J Dairy Sci* **85**: 2141-2148.
- Drazek, E.S., Hammack, C.A., and Schmitt, M.P. (2000) *Corynebacterium diphtheriae* genes required for acquisition of iron from haemin and haemoglobin are homologous to ABC haemin transporters. *Mol Microbiol* **36**: 68-84.
- Dryla, A., Gelbmann, D., von Gabain, A., and Nagy, E. (2003) Identification of a novel iron regulated staphylococcal surface protein with haptoglobin-haemoglobin binding activity. *Mol Microbiol* **49**: 37-53.
- Dyer, D.W., McKenna, W., Woods, J.P., and Sparling, P.F. (1987) Isolation by streptonigrin enrichment and characterization of a transferrin-specific iron uptake mutant of *Neisseria meningitidis*. *Microb Pathog* **3**: 351-363.
- Eleaume, H., and Jabbouri, S. (2004) Comparison of two standardisation methods in real-time quantitative RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* genes expression during *in vitro* growth. *J Microbiol Methods* **59**: 363-370.
- Franke, A.E., and Clewell, D.B. (1981) Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid. *J Bacteriol* **145**: 494-502.
- Gawron-Burke, C., and Clewell, D.B. (1982) A transposon in *Streptococcus faecalis* with fertility properties. *Nature* **300**: 281-284.
- Ghio, A.J., Carter, J.D., Samet, J.M., Reed, W., Quay, J., Dailey, L.A., Richards, J.H., and Devlin, R.B. (1998) Metal-dependent expression of ferritin and lactoferrin by respiratory epithelial cells. *Am J Physiol* **274**: L728-736.
- Ginzburg, E., Namias, N., Brown, M., Ball, S., Hameed, S.M., and Cohn, S.M. (2000) Gram positive infection in trauma patients: new strategies to decrease emerging Gram-positive resistance and vancomycin toxicity. *Int J Antimicrob Agents* **16 Suppl 1**: S39-42.
- Haag, H., Fiedler, H.P., Meiwes, J., Drechsel, H., Jung, G., and Zahner, H. (1994) Isolation and biological characterization of staphyloferrin B, a compound with siderophore activity from staphylococci. *FEMS Microbiol Lett* **115**: 125-130.

- Hachler, H., Kayser, F.H., and Berger-Bachi, B. (1987) Homology of a transferable tetracycline resistance determinant of *Clostridium difficile* with *Streptococcus (Enterococcus) faecalis* transposon Tn916. *Antimicrob Agents Chemother* **31**: 1033-1038.
- Heinrichs, J.H., Gatlin, L.E., Kunsch, C., Choi, G.H., and Hanson, M.S. (1999) Identification and characterization of SirA, an iron-regulated protein from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **181**: 1436-1443.
- Hensen, S.M., and Rijksuniversiteit te Utrecht (2000) *Bovine staphylococcus aureus mastitis: bacterial adhesion and invasion in relation to pathogenesis and antimicrobial sensitivity = bovine staphylococcus aureus mastitis: bacteriële hechting en invasie in relatie tot de pathogenese en antimicrobiële gevoeligheid*. Utrecht: Universiteit Utrecht.
- Hill, P.J., Cockayne, A., Landers, P., Morrissey, J.A., Sims, C.M., and Williams, P. (1998) SirR, a novel iron-dependent repressor in *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **66**: 4123-4129.
- Holland, J., Towner, K.J., and Williams, P. (1991) Isolation and characterisation of *Haemophilus influenzae* type b mutants defective in transferrin-binding and iron assimilation. *FEMS Microbiol Lett* **61**: 283-287.
- Ivins, B.E., Welkos, S.L., Knudson, G.B., and Leblanc, D.J. (1988) Transposon Tn916 mutagenesis in *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* **56**: 176-181.
- Jones, J.M., Yost, S.C., and Pattee, P.A. (1987) Transfer of the conjugal tetracycline resistance transposon Tn916 from *Streptococcus faecalis* to *Staphylococcus aureus* and identification of some insertion sites in the staphylococcal chromosome. *J Bacteriol* **169**: 2121-2131.
- Karita, M., Etterbeek, M.L., Forsyth, M.H., Tummuru, M.K., and Blaser, M.J. (1997) Characterization of *Helicobacter pylori* *dapE* and construction of a conditionally lethal *dapE* mutant. *Infect Immun* **65**: 4158-4164.
- Kathariou, S., Metz, P., Hof, H., and Goebel, W. (1987) Tn916-induced mutations in the hemolysin determinant affecting virulence of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **169**: 1291-1297.
- King, Michael W. & Marchesini, Sergio, « Heme and Porphyrin Metabolism », <<http://www.med.unibs.it/~marchesi/heme.html>>, 21 septembre 2004.
- Komatsuzawa, H., Sugai, M., Ohta, K., Fujiwara, T., Nakashima, S., Suzuki, J., Lee, C.Y., and Suginaka, H. (1997) Cloning and characterization of the *fnt* gene which affects the methicillin resistance level and autolysis in the presence of triton X-100 in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 2355-2361.

- Komatsuzawa, H., Choi, G.H., Fujiwara, T., Huang, Y., Ohta, K., Sugai, M., and Suginaka, H. (2000) Identification of a *fmtA*-like gene that has similarity to other PBPs and beta-lactamases in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **188**: 35-39.
- Lindahl, M., Holmberg, O., and Jonsson, P. (1990) Adhesive proteins of haemagglutinating *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *J Gen Microbiol* **136** (Pt 5): 935-939.
- Lindsay, J.A., Riley, T.V., and Mee, B.J. (1995) *Staphylococcus aureus* but not *Staphylococcus epidermidis* can acquire iron from transferrin. *Microbiology* **141** (Pt 1): 197-203.
- Lipman, L.J.A. (1995) *Escherichia coli* and *staphylococcus aureus* mastitis: epidemiology and pathogenesis = *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* mastitis: epidemiologie en pathogenese. Utrecht: Universiteit Utrecht.
- Litwin, C.M., and Calderwood, S.B. (1993) Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* **6**: 137-149.
- Loo, C.Y., Corliss, D.A., and Ganeshkumar, N. (2000) *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. *J Bacteriol* **182**: 1374-1382.
- McDonald, L.C., and Hageman, J.C. (2004) Vancomycin intermediate and resistant *Staphylococcus aureus*. What the nephrologist needs to know. *Nephrol News Issues* **18**: 63-64, 66-67, 71-62 passim.
- Martinez, J.L., Delgado-Iribarren, A., and Baquero, F. (1990) Mechanisms of iron acquisition and bacterial virulence. *FEMS Microbiol Rev* **6**: 45-56.
- Mazmanian, S.K., Skaar, E.P., Gaspar, A.H., Humayun, M., Gornicki, P., Jelenska, J., Joachmiak, A., Missiakas, D.M., and Schneewind, O. (2003) Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* **299**: 906-909.
- Meiwes, J., Fiedler, H.P., Haag, H., Zahner, H., Konetschny-Rapp, S., and Jung, G. (1990) Isolation and characterization of staphyloferrin A, a compound with siderophore activity from *Staphylococcus hyicus* DSM 20459. *FEMS Microbiol Lett* **55**: 201-205.
- Mengin-Lecreulx, D., Falla, T., Blanot, D., van Heijenoort, J., Adams, D.J., and Chopra, I. (1999) Expression of the *Staphylococcus aureus* UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate:L-lysine ligase in *Escherichia coli* and effects on peptidoglycan biosynthesis and cell growth. *J Bacteriol* **181**: 5909-5914.
- Modun, B., Evans, R.W., Joannou, C.L., and Williams, P. (1998) Receptor-mediated recognition and uptake of iron from human transferrin by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **66**: 3591-3596.

- Modun, B., and Williams, P. (1999) The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infect Immun* **67**: 1086-1092.
- Modun, B., Morrissey, J., and Williams, P. (2000) The staphylococcal transferrin receptor: a glycolytic enzyme with novel functions. *Trends Microbiol* **8**: 231-237.
- Morrissey, J.A., Cockayne, A., Hill, P.J., and Williams, P. (2000) Molecular cloning and analysis of a putative siderophore ABC transporter from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **68**: 6281-6288.
- Morrissey, J.A., Cockayne, A., Hammacott, J., Bishop, K., Denman-Johnson, A., Hill, P.J., and Williams, P. (2002) Conservation, surface exposure, and *in vivo* expression of the Frp family of iron-regulated cell wall proteins in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **70**: 2399-2407.
- Munson, S.H., Tremaine, M.T., Betley, M.J., and Welch, R.A. (1998) Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **66**: 3337-3348.
- Naidu, A.S., Andersson, M., Miedzobrodzki, J., Forsgren, A., and Watts, J.L. (1991a) Bovine lactoferrin receptors in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *J Dairy Sci* **74**: 1218-1226.
- Naidu, A.S., Miedzobrodzki, J., Musser, J.M., Rosdahl, V.T., Hedstrom, S.A., and Forsgren, A. (1991b) Human lactoferrin binding in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* **34**: 323-328.
- Naidu, A.S., Andersson, M., and Forsgren, A. (1992) Identification of a human lactoferrin-binding protein in *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* **36**: 177-183.
- National Mastitis Council. (1999) 38th Annual meeting - National Mastitis Council. Vol. v. 38 Washington, D.C.: National Mastitis Council.
- National Mastitis Council. (2002) 41st Annual meeting - National Mastitis Council. Vol. v. 41 Washington, D.C.: National Mastitis Council.
- Novick, R.P., and Skurray, R.A. (1990) *Molecular biology of the staphylococci*. New York, N.Y. Federal Republic of Germany Cambridge, U.K.: VCH Publishers; VCH Verlagsgesellschaft; VCH Publishers UK.
- Peng, H.L., Novick, R.P., Kreiswirth, B., Kornblum, J., and Schlievert, P. (1988) Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **170**: 4365-4372.
- Poutrel, B., Boutonnier, A., Sutra, L., and Fournier, J.M. (1988) Prevalence of capsular polysaccharide types 5 and 8 among *Staphylococcus aureus* isolates from cow, goat, and ewe milk. *J Clin Microbiol* **26**: 38-40.

- Prescott, L.M., Harley, J.P., and Klein, D.A. (1995) *Microbiologie*. Bruxelles: De Boeck-Wesmael.
- Ratledge, C., and Dover, L.G. (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**: 881-941.
- Ren, K., Bannan, J.D., Pancholi, V., Cheung, A.L., Robbins, J.C., Fischetti, V.A., and Zabriskie, J.B. (1994) Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxin. *J Exp Med* **180**: 1675-1683.
- Rodenburg, Jack, « Réforme des vaches laitières, Les producteurs laitiers sont touchés par la fermeture de la frontière américaine »,
<<http://www.gov.on.ca/OMAFRA/french/livestock/dairy/facts/cullingcows.htm>>, 01 juillet 2004.
- Rouault, T.A. (2004) Microbiology. Pathogenic bacteria prefer heme. *Science* **305**: 1577-1578.
- Salyers, A.A., and Whitt, D.D. (1994) *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*. Washington, D.C.: ASM Press.
- Schalm, O.W., Carroll, E.J., and Jain, N.C. (1971) *Bovine mastitis*. Philadelphia: Lea and Febiger.
- Schenk, S., and Laddaga, R.A. (1992) Improved method for electroporation of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **73**: 133-138.
- Scott, J.R., Kirchman, P.A., and Caparon, M.G. (1988) An intermediate in transposition of the conjugative transposon Tn916. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 4809-4813.
- Sebulsky, M.T., Hohnstein, D., Hunter, M.D., and Heinrichs, D.E. (2000) Identification and characterization of a membrane permease involved in iron-hydroxamate transport in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **182**: 4394-4400.
- Sebulsky, M.T., and Heinrichs, D.E. (2001) Identification and characterization of *fhuD1* and *fhuD2*, two genes involved in iron-hydroxamate uptake in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **183**: 4994-5000.
- Sebulsky, M.T., Shilton, B.H., Speziali, C.D., and Heinrichs, D.E. (2003) The role of FhuD2 in iron(III)-hydroxamate transport in *Staphylococcus aureus*. Demonstration that FhuD2 binds iron(III)-hydroxamates but with minimal conformational change and implication of mutations on transport. *J Biol Chem* **278**: 49890-49900.
- Sebulsky, M.T., Speziali, C.D., Shilton, B.H., Edgell, D.R., and Heinrichs, D.E. (2004) FhuD1, a ferric hydroxamate binding lipoprotein in *Staphylococcus aureus*: a case of gene duplication and lateral transfer? *J Biol Chem*.
- Skaar, E.P., Gaspar, A.H., and Schneewind, O. (2004a) IsdG and IsdI, heme-degrading enzymes in the cytoplasm of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **279**: 436-443.

- Skaar, E.P., Humayun, M., Bae, T., DeBord, K.L., and Schneewind, O. (2004b) Iron-source preference of *Staphylococcus aureus* infections. *Science* **305**: 1626-1628.
- Skaar, E.P., and Schneewind, O. (2004) Iron-regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus*: stealing iron from heme. *Microbes Infect* **6**: 390-397.
- Sordelli, D.O., Buzzola, F.R., Gomez, M.I., Steele-Moore, L., Berg, D., Gentilini, E., Catalano, M., Reitz, A.J., Tollersrud, T., Denamiel, G., Jeric, P., and Lee, J.C. (2000) Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analyses. *J Clin Microbiol* **38**: 846-850.
- Stojiljkovic, I., and Hantke, K. (1994) Transport of haemin across the cytoplasmic membrane through a haemin-specific periplasmic binding-protein-dependent transport system in *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **13**: 719-732.
- Taylor, J.M., and Heinrichs, D.E. (2002) Transferrin binding in *Staphylococcus aureus*: involvement of a cell wall-anchored protein. *Mol Microbiol* **43**: 1603-1614.
- Tizard, I.R. (2000) *Veterinary immunology: an introduction*. Philadelphia, PA; Montreal: W.B.Saunders.
- Tro, Nivaldo J., « Introductory chemistry, Chapter 19, Biochemistry », <<http://wps.prenhall.com/wps/media/objects/476/488316/ch19.html>>, 2003.
- Wandersman, C., and Delepelaire, P. (2004) Bacterial Iron Sources: From Siderophores to Hemophores. *Annu Rev Microbiol*.
- West Agro Inc. (1988) *Udder health: mastitis prevention and control*. Kansas City, Mo: West Agro.
- White, J.R., and Yeowell, H.N. (1982) Iron enhances the bactericidal action of streptonigrin. *Biochem Biophys Res Commun* **106**: 407-411.
- Yancey, R.J., Jr. (1999) Vaccines and diagnostic methods for bovine mastitis: fact and fiction. *Adv Vet Med* **41**: 257-273.
- Yoshimura, H., Ishimaru, M., and Kojima, A. (2002) Minimum inhibitory concentrations of 20 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Japan. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **49**: 457-460.
- Zhang, S., Iandolo, J.J., and Stewart, G.C. (1998) The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). *FEMS Microbiol Lett* **168**: 227-233.

VIII. ANNEXE 1

Mutagenèse avec le Tn917
et la souche de champ *S. aureus* SHY97-3906

INTRODUCTION

Au tout début du projet, nous devons travailler avec une souche de champ isolée d'un cas de mammite bovine, soit *S. aureus* SHY97-3906, et la mutagenèse devait se faire avec le Tn917, un transposon de la même famille que le Tn916. Les expériences effectuées entre septembre 2002 et janvier 2004 ne peuvent pas faire partie du cœur de ce mémoire, parce que non concluantes, mais méritent tout de même d'être mentionnées. C'est pour cette raison que je les présente dans cette annexe.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le Tn917 est un transposon porté par le vecteur pLTV1 (Camilli *et al.*, 1990) (Figure 37) qui sera électroporé chez la souche de champ de *S. aureus*. On retrouve aussi, sur ce vecteur, un gène de résistance à l'érythromycine (*erm*), résistance associée au Tn917; un gène de résistance à l'ampicilline (*bla*), pour la sélection suite à une transformation chez une bactérie à Gram négatif; un gène de résistance au chloramphénicol (*cat*), pour la sélection suite à une transformation chez une bactérie à Gram positif; le gène *lacZ* qui code pour la β -galactosidase; une origine permettant la réplication chez les Gram positif (Ts rep); une origine permettant la réplication chez les Gram négatif (ColE1rep); un gène de résistance à la tétracycline (*tet*); un gène de thermosensibilité (*Ts rep*); ainsi qu'un site de clonage multiple.

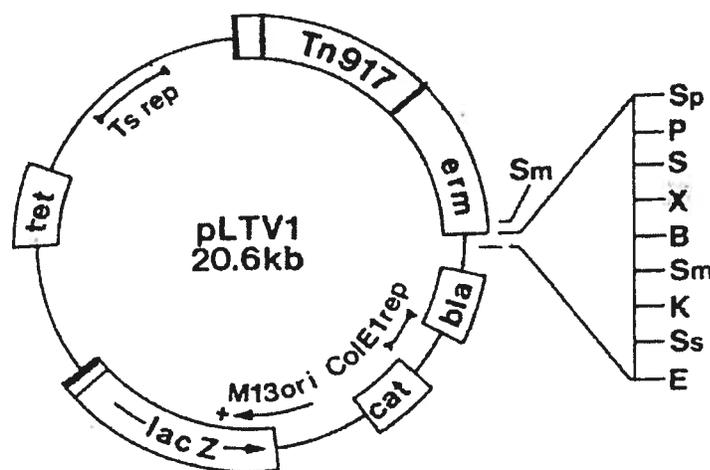


Figure 36: Schéma du vecteur pLTV1 portant le Tn917.

Ce vecteur a été électroporé chez la souche de champ *S. aureus* SHY97-3906 selon le protocole décrit par Schenk & Laddaga (Schenk and Laddaga, 1992; Sebulsky *et al.*, 2000). Brièvement, des cellules électrocompétentes de *S. aureus* SHY97-3906 ont été préparées et mises en présence, pendant une minute sur glace, de 100 ng du vecteur pLTV1 à électroporer. L'électroporation s'est effectuée à 2.5 V, 200 Ω de résistance et 25 μ F de capacitance. Par la suite, 600 μ L de bouillon LB a été ajouté aux cellules et ces dernières ont été incubées pendant 45 minutes à 30°C avant d'être étalées sur une gélose LB ampicilline (100 μ g/mL) et incubées pour la nuit à 30°C afin de préserver le plasmide thermosensible.

Par la suite, le protocole de mutagenèse nécessite l'implication du gène *Ts rep*. Ce gène de thermosensibilité indique que le plasmide a une température permissive de 30°C. En augmentant la température d'incubation à 43°C après avoir introduit le vecteur dans la bactérie, l'unité transposable de 13,7 kb, pourra s'insérer au hasard dans l'ADN génomique de la souche mère, causant ainsi la perte des gènes *tet* et *Ts rep*.

La banque de mutants ainsi générée pourra être utilisée pour la sélection sur streptonigrine.

RÉSULTATS, DISCUSSION ET CONCLUSION

Dès l'électroporation, on suspectait qu'il y avait un problème avec le vecteur puisque, normalement, les cellules portant le pLTV1 auraient dû pousser sur gélose en présence de tétracycline, grâce au gène *tet*, ce qui n'était pas le cas. De plus, le fait qu'il ait fallu attendre 48 heures pour obtenir des colonies suite à l'électroporation augmente le risque de contamination ou l'apparition de colonies résistantes spontanées. Par la suite, nous avons constaté, que la souche de champ de *S. aureus* portait un plasmide naturel d'une taille supérieure à 15 kb alors que le poids moléculaire du vecteur pLTV1 est de 20,6 kb, ce qui a pu facilement nous induire en erreur, puisqu'il est laborieux de les différencier sur un gel d'agarose de 0,7%.

Nous avons tout de même poursuivi les expériences, c'est-à-dire le protocole de mutagenèse par des incubations à 43°C et ensuite la sélection sur streptonigrine qui a

permis d'isoler vingt (20) colonies que nous avons cru être des mutants. Par la suite, nous avons fait des PCR contrôles (Figure 38) afin de s'assurer que le transposon était présent chez les mutants. Les résultats démontrent que les amorces utilisées ont permis l'amplification d'un fragment, démontrant ainsi la présence du gène *erm* porté par le Tn917.

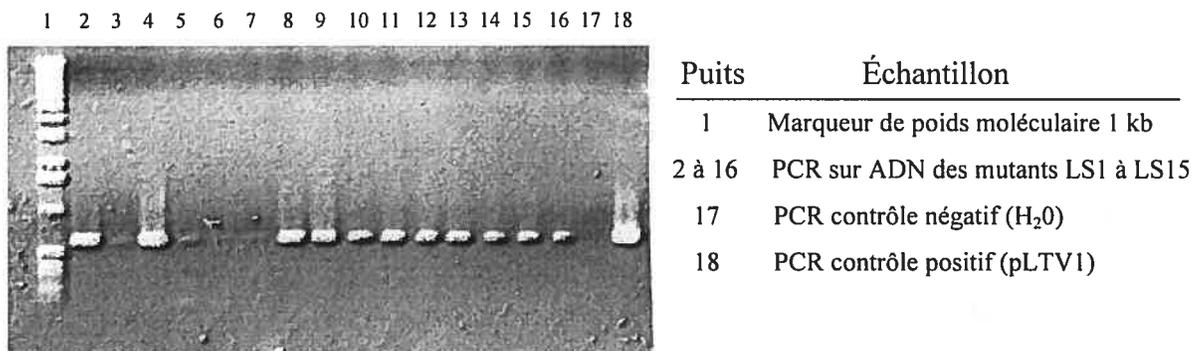


Figure 37 : Résultats d'un PCR permettant l'amplification du gène *erm* porté par le Tn917 sur 15 mutants résistants à la streptonigrine.

Par la suite, des Southern blot ont été effectués afin de vérifier le nombre d'insertion du Tn917 chez ces mutants (Figure 39). Les résultats ne démontrent aucune hybridation avec la sonde *erm* pour chacun des mutants, ni pour la souche mère *S. aureus* SHY97-3906 qui porte le vecteur pLTV1. Ces résultats entraînent donc une remise en question concernant la nature des mutants.

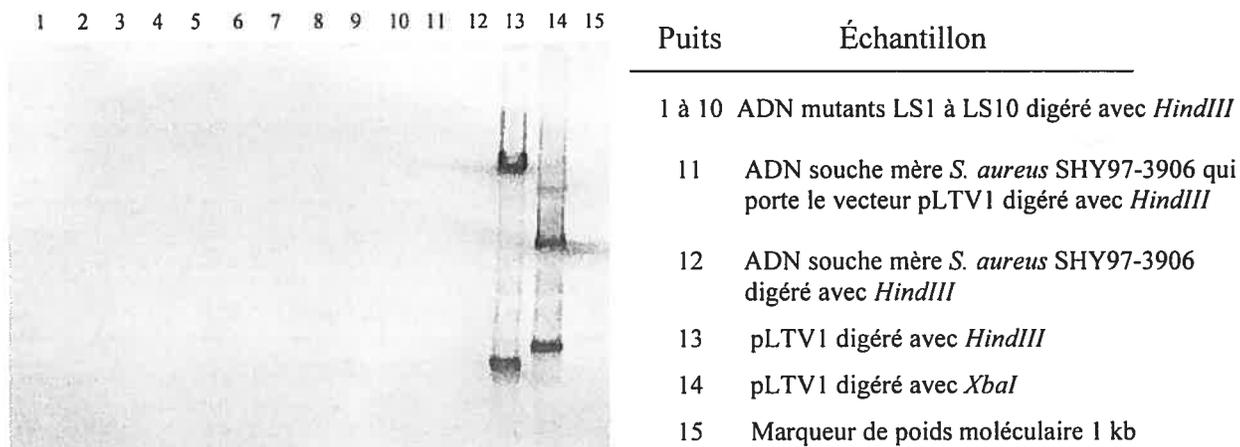


Figure 38 : Résultats d'un Southern blot sur les mutants par transposon LS1 à LS10 en utilisant la sonde *erm*. L'ADN a été digéré avec l'enzyme de restriction *HindIII*. Contrôle positif : pLTV1

Des tests de promotions avec différentes sources de fer pour chacun de ces vingt (20) mutants en utilisant du 2,2'-dipyridyl comme chélateur de fer ont tout de même été effectués. Les résultats démontrent que la plupart des mutants n'utilisent plus le desferroamine, ni le ferrichrome et trois (3) sur les vingt (20) isolés sont incapables d'utiliser la ferritine (Figure 40).

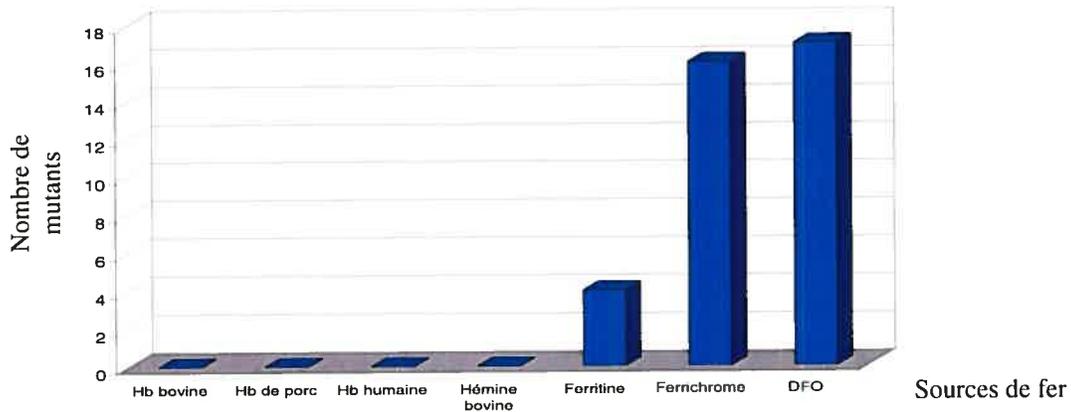


Figure 39 : Résultats des tests de promotion avec différentes sources de fer pour les mutants de la souche *S. aureus* SHY97-3906, LS1 à LS20. Nombre de mutants incapables d'utiliser les différentes sources de fer.

Une série de clones a été tentée, mais, évidemment, aucune de ces expériences n'a donné de résultats concluants.

Plus tard, une identification bactérienne effectuée au service de diagnostic (laboratoire du Dr Serge Messier, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal) a confirmé que les mutants isolés sur streptonigrine étaient en fait des staphylocoques coagulase négative (*Staphylococcus* spp.) et non du *S. aureus*.

L'hypothèse qui pourrait expliquer l'échec de cette technique est que la souche de champ, portant un plasmide naturel, aurait empêché l'électroporation avec pLTV1 probablement à cause d'une incompatibilité de plasmide. Les colonies obtenues suite à l'électroporation sont en fait de la contamination due à l'incubation prolongée des géloses, expliquant ainsi pourquoi la sonde utilisée pour le Southern blot, avec la souche de champ SHY97-3906 portant le vecteur pLTV1, n'a pas hybridé avec l'ADN digéré. Les mutants streptonigrine résistants LS1 à LS20 ne sont malheureusement d'aucun intérêt.

