

UNIVERSITÉ DE LILLE
ECOLE DOCTORALE : Biologie Santé
SPECIALITE: MICROBIOLOGIE

T H È S E

pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

***Nouvelles perspectives sur les mécanismes génétiques impliqués dans
la propagation de la peste par les puces grâce à l'utilisation de la
bioluminescence***

Présentée et soutenue publiquement le 16 Décembre 2020 à 14 heures
à Lille
par Typhanie Bouvenot

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Jean-Marie LACROIX

Rapporteurs :

Madame le Docteur Carmen BUCHRIESER

Monsieur le Docteur Alain CHARBIT

Directeur de thèse :

Monsieur le Docteur Florent SEBBANE

Invité :

Madame le Docteur Françoise JACOB-DUBUISSON

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail. Je remercie madame le docteur Buchrieser et monsieur le docteur Charbit d'avoir accepté d'être rapporteurs. Je remercie le président du jury : monsieur le professeur Lacroix et madame le docteur Jacob-Dubuisson.

Je remercie aussi mon directeur de thèse le docteur Florent Sebbane pour m'avoir encadrée pendant cette thèse, et de m'avoir donné la possibilité de réaliser mes recherches dans son laboratoire.

Je tiens à remercier tout particulièrement Amélie Dewitte, ma maman du laboratoire, qui m'a beaucoup appris pendant ma thèse. Merci de m'avoir toujours soutenue et aidé tant d'un point de vue travail que morale. Ma thèse aurait été bien différente sans toi.

Je remercie le docteur Sébastien Bontemps-Gallo pour tout ses conseils, son aide et son écoute pendant ma thèse. Tu as toujours su me soutenir et je t'en suis profondément reconnaissante.

Je tiens à remercier le docteur Iman Chouikha qui a toujours su m'écouter et me conseiller. Je n'oublierai jamais tes talents de parolière extraordinaire, ta patience et ton calme.

Je tiens à remercier Anaïs Hujoux, Alix Laffitte et le docteur Servane Le Guillouzer avec qui il a toujours été agréable de travailler, d'échanger. Votre bonne humeur a toujours été contagieuse. Merci au Docteur François Pierre, tes expressions déformées, modifiées voir améliorées resteront dans ma mémoire.

Je remercie aussi le Docteur Elizabeth Pradel, avec qui j'ai eu plaisir de travailler et surtout d'apprendre. Je tiens aussi à remercier le docteur Michael Marceau et le docteur Nadine Lemaître.

Je remercie infiniment Marine Caby, que dire des 8 ans passés ensembles ... La liste de tous les souvenirs et choses pour lesquels je suis reconnaissante commence à être longue. Nous avons pendant nos études partagé un cerveau qui nous a permis en partie d'en arriver là où on en est, mais ce n'était que le début d'une amitié essentielle à mes yeux. Alors merci, pour être qui tu es et ne change jamais. J'ai hâte de voir ce que nous réserve les 8 années à venir.

Je remercie aussi Marie Cabaret, bien que tu ne sois plus sur le continent, nous avons gardé un lien au cours de ces années. Je n'oublierai jamais nos vacances en Corse qui m'ont toujours permis de me détendre pour pouvoir revenir en forme. Merci Marie pour ta bonne humeur et ton soutien inébranlable.

Je remercie aussi mon équipe de tennis, vous êtes trop nombreuses pour vous citer toutes, mais vous avez toutes su à un moment ou à un autre me soutenir. Tout particulièrement Hélène Milville (Grand Schtroups), Amandine Margerin, Julie Murez, Elise Samele et Helene Soltysiak.

Je remercie énormément mes parents. Je n'imagine pas avoir pu terminer ma thèse sans votre soutien constant. Ces remerciements ne sauront jamais refléter à quel point je suis heureuse et reconnaissante d'être votre fille. Encore merci.

Sommaire

Remerciements	3
Introduction	7
La peste, le contexte	8
Historique	8
Le bioterrorisme	10
La résistance aux antibiotiques	11
Les changements environnementaux	12
La physiopathologie de la peste	14
Généralité	14
Les différentes formes de peste	15
Le cycle de la peste	16
La puce : le vecteur de la maladie	18
La puce	19
Infection des puces	20
La transmission tardive dépendante de la formation de biofilm	22
La phase de transmission précoce	22
Condition du tube digestif de la puce	23
Yersinia pestis agent causal de la peste	25
La lipoylation	32
Escherichia coli	34
Bacillus subtilis	34
Saccharomyces cerevisiae	35
Plasmodium falciparum	37
Homo sapiens	38
Les réactions de la lipoylation	39
Cétoacide déshydrogénase	40
L'acétoine déshydrogénase	40
Le système de clivage de la glycine	41
La fonction des enzymes lipoylées	41
La pyruvate dehydrogenase (PDH)	41
L'oxoglutarate déshydrogénase (OGDH)	42
La cétoacide à chaîne ramifiée déshydrogénase (BCDH)	42
L'acétoine déshydrogénase (AoDH)	42
Le système de clivage de la glycine (GCV)	43
La bioluminescence	44
La bioluminescence dans le règne animal.	44
La bioluminescence chez les bactéries	48

<i>Mécanismes de bioluminescence</i>	50
<i>Les limites et avantages de l'utilisation de la bioluminescence</i>	50
<i>Utilisation de la bioluminescence chez Y. pestis</i>	51
Objectifs	53
Résultats	54
La Bioluminescence	55
<i>La bioluminescence un outil pour suivre l'infection</i>	55
<i>La bioluminescence est le reflet de l'activité métabolique des bactéries</i>	57
<i>La bioluminescence ne permet pas de diagnostiquer le blocage.</i>	63
<i>Mise à l'épreuve de la bioluminescence dans l'étude de l'infection dans la puce</i>	64
<i>En condition « physique »</i>	64
<i>En condition « génétique »</i>	66
<i>Criblage de la banque de mutants</i>	68
<i>Méthodes de sélection des gènes potentiellement intéressants</i>	68
<i>Etude des gènes potentiellement intéressants</i>	69
<i>Etude de l'implication du gène y2878 dans la puce</i>	71
<i>Etude en bioluminescence</i>	71
<i>Capacité de y2878 à coloniser la puce</i>	72
Etude de l'implication du gène y1173 dans la puce	76
<i>Etude en bioluminescence</i>	76
<i>Rôle de la lipoylation dans l'infection de la puce</i>	79
<i>Rôle de la lipoylation dans la croissance bactérienne</i>	83
<i>Rôle de la lipoylation dans la croissance des bactéries dans le proventricule</i>	85
<i>Mesure de la quantité de lipoate dans les milieux</i>	86
<i>Implication de lplA dans l'infection</i>	87
Discussion	95
Matériels et méthodes	107

Introduction

La peste, le contexte

Historique

La peste est une zoonose causée par la bactérie à Gram négatif, *Yersinia pestis*. Circulant principalement chez les rongeurs et les puces, elle peut occasionnellement toucher l'homme (Pollitzer, 1954; Perry et Fetherson, 1997). Cette maladie a été responsable de nombreuses épidémies au cours de l'histoire, causant de nombreuses morts. La première pandémie, appelée peste Justinienne, a commencé en 541 pour se terminer en 767. Selon les estimations, elle aurait tué 40 à 100 millions d'individus (Rollins *et al.*, 2003). La deuxième pandémie, appelée peste noire par les historiens, a eu lieu du VIII^{ème} siècle au XIV^{ème} siècle. Elle aurait décimé 17 à 28 millions d'êtres humains, soit 30 à 40% de la population Européenne de l'époque. Enfin, la troisième pandémie a commencé en 1855 et est en déclin depuis 1960. (Perry et Fetherson, 1997)

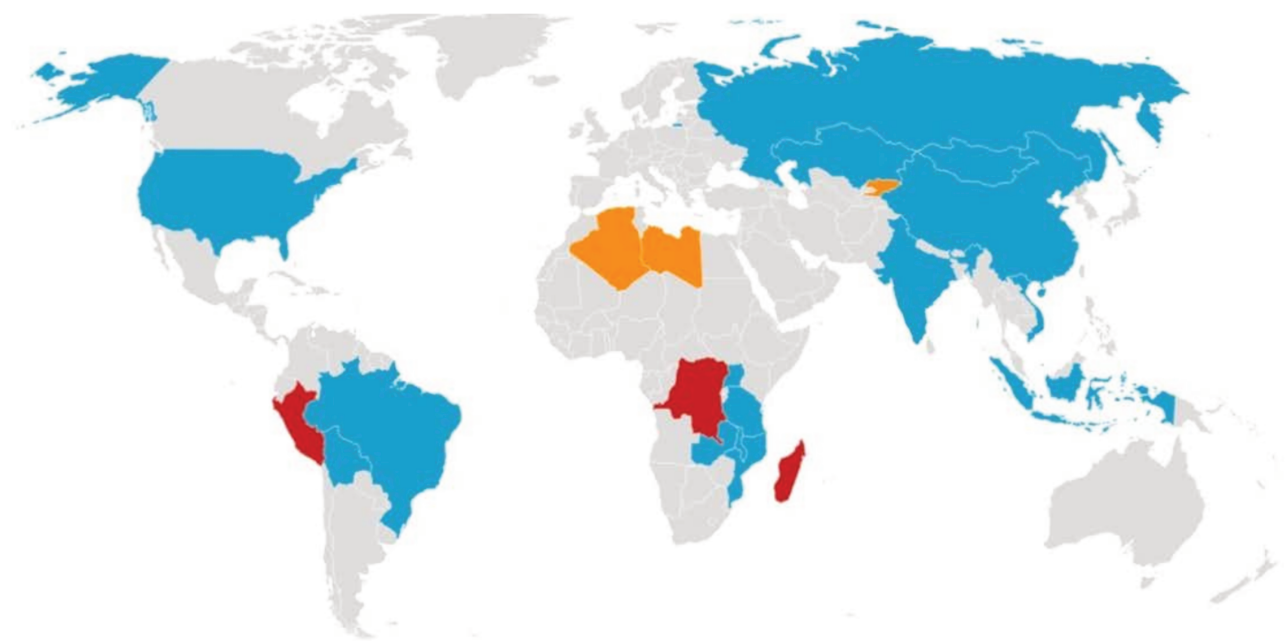


Figure 1 : Répartition des cas de peste depuis 2000. En bleu : cas de peste. En rouge : pays endémique de la maladie. En orange : ré-émergences. D'après les données de l'OMS.

La maladie reste présente sur presque toutes les régions du globe, touchant notamment l'Afrique sub-saharienne, l'Asie ainsi que l'Amérique du nord et du Sud (Figure 1). En 2008, cinq pays déclaraient 98% des cas mondiaux : Madagascar, Ouganda, Pérou, République Démocratique du Congo (RDC) et la république unie de Tanzanie (Relevé épidémiologique hebdomadaire OMS, 2019). De 2010 à 2018, le nombre de cas confirmés de peste dans le monde était d'au moins 4 420, dont 751 décès. De 2008 à 2018, la tendance générale est plutôt à la diminution du nombre de cas

déclaré, avec 2683 cas en 2008 contre 243 cas en 2018 notamment. Cependant, des résurgences peuvent être observées (à Madagascar) sans explications rationnelles certaines années (Figure 2). (Relevé épidémiologique hebdomadaire OMS, 2019)

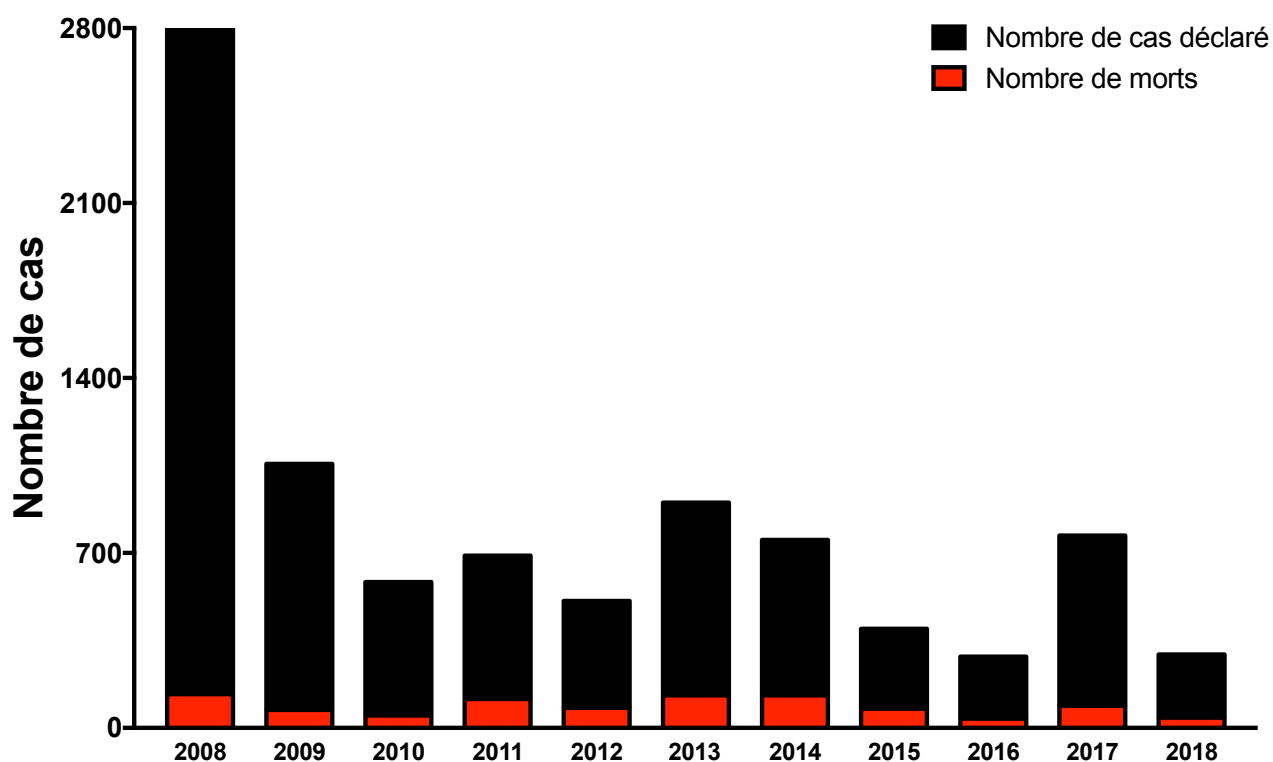


Figure 2 : Nombre de cas déclarés de peste et de morts par année. D'après les chiffres de l'OMS.

Les raisons de la diminution du nombre de cas sont difficiles à interpréter. Cependant, les systèmes de surveillances épidémiologiques peuvent dans des régions isolées et mal couvertes par le système de santé ignorer des cas sporadiques, notamment en Afrique. La faiblesse extrême du système de santé conduit à un manque de prélèvement et d'investigation biologique pour repérer les cas. Malgré cela, cette sous-évaluation ne devrait en aucun cas modifier la tendance générale à la baisse de l'incidence mondiale observée (Relevé épidémiologique hebdomadaire OMS, 2019).

En effet, les conditions d'isolement de certaines régions ne conduisent pas à des épidémies de grande dimension et si c'est le cas, elles finissent quand même par être détectées. Des études rétrospectives permettent de déterminer le véritable nombre de cas et de morts dans les régions pouvant les avoir sous-estimés. Enfin, la peste étant une maladie favorisée par la pauvreté, une certaine amélioration des conditions de vie et une meilleure protection vis à vis des rongeurs (au Pérou par exemple) expliquerait la diminution du nombre de cas (Relevé épidémiologique

hebdomadaire OMS, 2019). Mais, cette amélioration dans certains pays endémiques ne supprime pas pour autant la maladie. En effet, les pays les plus touchés par la peste restent Madagascar et la République Démocratique du Congo. Pour ces derniers, un défaut de gestion des déchets, un manque d'eau potable et le manque d'infrastructure augmentent la zone de reproduction pour les rats et leurs puces, favorisant la transmission de la maladie. Récemment du 1er août au 22 novembre 2017, Madagascar a subi une flambée épidémique avec 2575 cas confirmés, probables ou suspects conduisant à la mort de 221 personnes. Le 15 décembre 2017, la majorité des cas ont été classifiés comme pneumonique (1985 soit 77%) parmi ces cas 393 (20%) sont confirmés, 626 (32%) sont probables et 966 (49%) restent suspects. 377 (15%) ont été classifiés comme peste bubonique et un cas de peste septicémique a été identifié, 212 restent non classifiés (soit 8%). (OMS, 2017 plague outbreak). En plus de ces facteurs classiques, la peste est également une menace bioterroriste aggravée par l'émergence de souches multi-résistantes aux antibiotiques.

Le bioterrorisme

Le bioterrorisme est une menace majeure. Il peut se décliner en quatre catégories : biologique, chimique, pyrotechnique explosif et nucléaire. L'utilisation de micro-organismes comme agent de guerre biologique apparaît comme inévitable (Broussard, 2001). Le risque biologique est d'une nature différente aux autres catégories et notamment les risques explosifs et nucléaires. En effet, trois particularités peuvent être signalées : d'une part, il nécessite un diagnostic étiologique qui n'est pas évident. Ensuite, une fois l'agent biologique identifié, il faut évaluer la sensibilité de celui-ci aux agents anti-infectieux. Enfin, un certain nombre de pathogènes (dont la peste et la variole) peuvent se révéler contagieux et ceci nécessite de mettre en place une stratégie pour isoler les patients suspects et, a fortiori, les patients infectés (Raoult: rapport de mission, 2003). Les attentats du 11 septembre aux Etats-Unis ont encore plus augmenté les inquiétudes concernant le terrorisme. Les accidents avec l'anthrax soulignent le risque de l'utilisation d'agents biologiques par des pays, des groupes terroristes ou des individus (Broussard, 2001). (Rapport d'information de l'Assemblée Nationale, 2003 ; Raoult: rapport de mission, 2003). Au vu des dangers liés aux risques biologiques, les pathogènes ont été étudiés afin de les classer en fonction des risques que chacun représente. Les critères utilisés pour les catégoriser ont été : 1) la facilité pour la production et la dissémination, 2) le début retardé des symptômes, 3) la capacité pour causer un fort taux de morbidité, de mortalité et 4) la difficulté de diagnostic. En France, d'après le rapport n° 2046 de l'Assemblée Nationale : « L'arme biologique fait déjà partie de l'arsenal des moyens susceptibles d'être utilisés par des

terroristes. Dans ce cas, on craint la dissémination de bactéries ou de virus pathogènes ». Le plan biotox a donc été mis en place pour répondre à cette menace. Ce plan comprend deux parties. 1) La vigilance et la mobilisation face à une menace terroriste ou de danger de nature biologique. 2) L'intervention, ce qui comprend les moyens et les procédures à mettre en place pour répondre à la menace. Les agents pathogènes de la peste, du charbon, de la tularémie sont considérés comme les plus dangereux dans ce plan et présentent un risque majeur pour la santé publique.

La résistance aux antibiotiques

L'apparition des résistances aux antibiotiques est une menace supplémentaire. C'est un phénomène naturel dû à la pression de sélection qui conduit à la mise en place de mécanisme pour rendre l'antibiotique inefficace. Certaines espèces bactériennes sont naturellement résistantes à certains antibiotiques (résistances innées). Ces espèces et les autres peuvent aussi acquérir par transfert horizontal une ou des résistances portées par une autre bactérie ou via l'intermédiaire de bactériophages, ou suite à des mutations génétiques (Sherpa *et al.*, 2015). La propagation de la résistance aux antibiotiques fut accentuée par la sur-utilisation des antibiotiques en médecine (50 % des prescriptions d'antibiotiques ne seraient pas nécessaire selon une étude effectuée aux Etats-Unis et en agriculture (80 % des antibiotiques utilisés). La résistance aux antibiotiques conduit déjà à la mort de 50 000 personnes chaque année en Europe et aux Etats-Unis. D'ici 2050, selon une estimation, 10 millions de personnes mourront par an dû à l'augmentation des résistances chez l'ensemble des bactéries (O'Neil, 2014).

Actuellement, le traitement de 1ère intention conseillé par l'ANSM (agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé) contre *Y. pestis* est composé de ciprofloxacine, d'ofloxacine, de levofloxacine (fiche n°3 du plan biotox). En cas de complication, le traitement de deuxième intention est à base de : doxycycline, de gentamycine ou de triméthoprime-sulfaméthoxazole (ANSM). La bactérie est sensible en générale aux β -lactames (même s'ils ne sont pas utilisés en traitement), aux aminoglycosides et aux fluoroquinolones (Frean *et al.*, 2003 ; Hernandez *et al.*, 2003 ; Wong *et al.*, 2000). La majorité des clones de *Y. pestis* sont en revanche résistants à la colistine, la polymixine B et aux macrolides (Frean *et al.*, 2003 ; Wong *et al.*, 2000). Même si l'occurrence d'apparition de résistance aux antibiotiques chez *Y. pestis* est faible, des clones résistants ont déjà été découverts. Par exemple en 1995, une souche isolée à Madagascar d'un patient atteint de peste bubonique possédait un plasmide de multirésistance aux antibiotiques. Cette

souche était résistante à l'ampicilline, au chloramphénocile, à la kanamycine, à la streptomycine, à la spectinomycine, aux sulfonamides, à la tétracycline et à la minocycline (Galimand *et al.*, 1997). En 1997, une autre souche résistante a été isolée à Madagascar, elle possédait un plasmide codant la streptomycine phosphotransférase qui augmente fortement la résistance à la streptomycine (Guiyole *et al.*, 2001). Les plasmides de ces deux souches étaient transférables facilement à d'autres souches de *Y. pestis* ou *E. coli*. De plus, une étude sur 100 clones de *Y. pestis* isolés en Mongolie entre 1960 à 2007 à partir de mammifères tel que les rongeurs et les lagomorphes mais aussi à partir de vecteurs comme les puces, a mis en évidence un clone résistant à presque tout les antibiotiques utilisés en prophylaxie ou en thérapie. Ce clone de *Y. pestis* était résistant à la gentamycine, la tétracycline, la doxycycline, la triméthoprim, sulfaméthoxacol, chloramphénicol, streptomycine et n'est resté sensible qu'à la ciprofloxacine (Kiefer *et al.*, 2012). Ces trois souches montrent que l'apparition de résistance est une menace vis à vis des traitements actuels.

Les changements environnementaux

De plus, les changements environnementaux tel que l'urbanisation et le réchauffement climatique pourraient affecter le nombre de cas et de foyers de peste dans l'avenir. L'urbanisation se caractérise par une rapide intensification de l'agriculture, des changements socio-économiques et une fragmentation écologique (Hassel *et al.*, 2016). Ce phénomène va encore augmenter dans les prochaines décennies, notamment dans les pays en développement où les prédictions montrent qu'une augmentation de 90% de population aurait lieu dans les villes. L'urbanisation affecte la biodiversité, altère les communautés dans la nature et conduit souvent à une diminution de la richesse en espèces. Malgré une reconnaissance de son importance, les mécanismes qui affectent la santé des animaux, la population des animaux sauvages et l'écologie des maladies restent peu connus. Cependant, il apparaît clair que l'urbanisation provoque un chevauchement spatial entre les zones où les hôtes et les vecteurs de maladies vivent, contribuant alors à l'émergence ou à la ré-émergence d'agent pathogènes (Hassel *et al.*, 2016).

Des facteurs comme la densité de population, la migration, les échanges commerciaux, l'assainissement et l'accès à l'eau potable peuvent améliorer la transmission de pathogène et affecter la dynamique des vecteurs des maladies. Alors que des facteurs sociaux qui conduisent à des inégalités sanitaires comme le statut socio-économique, le logement, l'origine ethnique, le sexe

et l'éducation influencent l'épidémiologie de maladies infectieuses dans les zones urbaines (Bradley *et al.* Tizer, 2007 ; Alirol *et al.*, 2010).

Depuis les années 1990, des progrès ont été accomplis dans le monde conduisant à une meilleure gestion de la prolifération des rongeurs. En effet, le pourcentage de personnes ayant accès à des installations sanitaires appropriés est passé de 54% en 1990 à 68% en 2015 dans le monde. Cependant des importantes inégalités dans certaines régions persistent (Unicef et OMS progress on sanitation and drinking water, 2015). Madagascar a été particulièrement observé concernant l'influence de l'urbanisation (agriculture) vis à vis de la peste. La saison de la peste dans ce pays s'étale de septembre à mars. Ce phénomène s'explique par la récolte du riz qui se déroule de mai à juillet, ce qui fournit de la nourriture aux rongeurs qui peuvent alors proliférer. En conséquence, la population de puces augmente fortement de septembre à novembre. Cependant en parallèle, la disparition de la nourriture dans les champs conduit les rats à migrer vers les maisons, augmentant alors la probabilité de contact entre les ectoparasites des rongeurs (les puces) contaminés et les hommes (Rahelinirina *et al.*, 2010).

Le changement climatique correspond à une modification statistiquement significative au niveau régional ou global de variable climatique sur une période considérable (des décennies voir plus). Les variables climatiques sont notamment la précipitation, l'humidité, la moyenne et les pics de température et le vent (Khan *et al.*, 2019). Entre 1850 et 2016 la température a augmenté d'environ 1,1°C, avec des températures en 2014-2018 les plus élevées jamais mesurées depuis 1850. A cette hausse de la température s'ajoute celle du niveau moyen des mers et océans (+ 8cm), associé à une diminution des glaces polaires (-2500 gigatonnes en Antarctique), une augmentation de la concentration de CO2 atmosphérique (340 parties par million en 1984 contre 400 en 2017 (chiffre du Commissariat général au développement durable : chiffres clés du climat, 2020). Fait alarmant, les prédictions concernant l'évolution des tendances suscitées ne sont pas à la baisse.

Les variations climatiques peuvent influencer significativement la santé humaine en conduisant à l'émergence d'infections variées ou à l'agrandissement des zones touchées par ces maladies (comme la malaria ou la maladie de Lyme) (Gratz, 1999 ; Lindgren *et al.*, 2000). Ainsi, un changement succinct ou à long terme du climat peut avoir un impact sur de nombreuses maladies (Khan *et al.*, 2019). En effet, les conditions climatiques peuvent affecter la reproduction, la survie, la mortalité et la distribution de vecteurs de maladies. Des données épidémiologiques indiquent l'émergence ou la ré-émergence de maladies après des événements climatiques extrêmes.

Concernant la peste, cette maladie est le résultat d'interaction complexe entre différents éléments comme la densité, le cycle de vie, la dynamique et la répartition géographique qui sont tous influencés par les variations du climat. Ces dernières influencent la dynamique des puces (le vecteur) et des rongeurs (les hôtes) avec des réponses qui varient considérablement selon les espèces (Gubler *et al.*, 2001).

Lorsque la peste réapparaît les conséquences sur les régions touchées peuvent être importantes. En effet, cette maladie conduit à de forte réaction de la part de la population, qui réagissent par peur de la maladie. Un des exemples de ce phénomène a eu lieu en Inde, en 1994, où une épidémie de peste bubonique et pneumonique a causé 56 morts sur les 700 cas suspectés (OMS, 2007). Bien que limitée, la nouvelle de la présence d'une épidémie de peste a conduit à un exode de centaines de milliers de personnes. Ce phénomène a généré la perte de 1,8 milliards de dollars (commerce et tourisme), et a provoqué une vague de panique à travers le monde. Le New York Times explique cette peur disproportionnée par le fait que cette épidémie rappelle des souvenirs culturels de la peste noire du XIV^{ème} siècle (Snowden, 2008).

En raison de la présence de foyer enzootique, des nombreux risques liés à la peste et étant donné les nombreuses conséquences humaines, économiques, politiques, sociétales et sanitaires, il apparaît nécessaire d'étudier les mécanismes génétiques et moléculaires d'infection de la bactérie afin de mieux contrôler la maladie en cas d'épidémie.

La physiopathologie de la peste

Généralité

Le genre *Yersinia* appartient à la famille des Entérobactéries, ce genre comprend 18 espèces dont 3 sont connues pour être des pathogènes humains (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. pestis*) (McNully *et al.*, 2016). Ces bactéries conduisent chez l'homme à des yersiniooses. Les symptômes lors d'une infection à *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* sont semblables et se caractérisent notamment par des diarrhées (Koornhof *et al.*, 1999) suite à l'ingestion d'aliments contaminés (Heroven et Dersch, 2014). En revanche *Y. pestis* est l'agent responsable de la peste qui se manifeste chez l'homme sous 3 formes : bubonique, septicémique et pulmonaire. Si la peste n'est pas traitée à temps, le pronostic vital du patient est engagé avec une mort inéluctable en cas de peste pulmonaire et septicémique (Stenseth *et al.*, 2008; Pollitzer, 1954). Une peste bubonique peut

évoluer en peste septicémique ou pulmonaire secondaire (Pollitzer, 1954) suite à la dissémination de bactéries jusqu'au système respiratoire, rendant la maladie transmissible par aérosol pouvant provoquer des cas de peste pulmonaire primaire. Suite à un dépôt direct ou non des bactéries dans le sang, *Y. pestis* peut provoquer une peste septicémique (Anisimov et Amoako, 2006).

Les différentes formes de peste

La peste bubonique est la forme clinique la plus fréquente de maladie. Les symptômes qui lui sont associés sont fièvres, céphalées, frissons et un gonflement caractéristique d'un ou plusieurs ganglions lymphatiques. Ces symptômes apparaissent 2 à 7 jours après une piqûre de puce ou par contact d'une plaie ouverte avec un animal contaminé (Pollitzer, 1954, Butler, 1983). Depuis le site de piqûre, *Y. pestis* dissémine par la voie lymphatique dans les ganglions drainant le site d'inoculation où la bactérie se réplique activement, ce qui provoque la production d'un ganglion hypertrophié et très douloureux appelé bubon (Pollitzer, 1954, Sebbane *et al.* 2005). Les bubons sont souvent localisés dans les régions inguinales et fémorales mais d'autres zones peuvent être touchées comme les régions axillaires ou cervicales (Butler, 1989). Sans traitement, la peste bubonique est fatale dans 30 à 70% des cas. Cette forme de la maladie peut aboutir à un défaut de l'équilibre hémostatique, ce qui provoque une formation de fibrine et de thrombine, ou dans les cas les plus graves à une coagulation intravasculaire disséminée (DIC) avec une formation de thrombus microvasculaire dans divers organes. La DIC provoque une consommation des facteurs de coagulation et contribue par la suite à une hémorragie (Korhonen *et al.*, 2013).

La peste septicémique apparaît chez des patients dont les cultures de sang sont positives pour *Y. pestis* mais pour lesquels aucune altération ganglionnaire n'est observée (Prentice et Rahalison, 2007). Les patients atteints présentent un état grippal pouvant être accompagné de troubles gastro-intestinaux. La forme primaire de la maladie apparaît lorsque les puces régurgitent les bactéries directement dans le sang, ce qui arrive dans 10 à 30% des cas. Une peste septicémique secondaire peut apparaître des conséquences d'une peste bubonique. A partir du système sanguin, *Y. pestis* infecte de nombreux organes tels que les poumons, la rate et le foie, altérant leurs fonctions (Galy, 2017). La mortalité des patients touchés par cette forme de la maladie est haute, étant de 100% sans traitement (Prentice et Rahalison, 2007). La peste septicémique (primaire ou secondaire) peut aboutir à un déséquilibre hémostatique, ou à choc septique. Une peste septicémique secondaire peut apparaître des suites de peste bubonique.

La peste pulmonaire est rare, mais correspond à la forme la plus dangereuse de la maladie. Les symptômes se caractérisent par de la toux, des expectorations, des douleurs thoraciques, de la dyspnée, une faiblesse et une gêne thoracique (Perry et Fetherson, 1997). La période d'incubation de la peste pulmonaire n'est que de quelques heures à 3 jours (Prentice et Rahalison, 2007). La mortalité des patients est de 100% si les patients ne sont pas traités dans les 48 heures. Cette forme de la maladie est soit transmise par inhalation de gouttelettes formées lors de la toux d'un patient contaminé provoquant alors une peste pulmonaire primaire chez la personne les inhalant (Stenseth *et al*, 2008). Soit une suite de peste bubonique lorsque la bactérie est présente dans le système circulatoire, une extension hématogène de *Y. pestis* peut toucher le poumon aboutissant alors à une peste pulmonaire dite secondaire (Zhou, 2006). La multiplication des contacts humains, des transports aériens associé à une dissémination rapide représente des menaces sérieuses pour l'établissement de foyer endémique.

Le cycle de la peste

La peste est une maladie qui touche l'homme de manière accidentelle. Le cycle de la maladie est effectué selon deux mécanismes : les cycles enzootiques (ou sylvatiques) et les cycles épizootiques (Vallès *et al.*, 2020). Les cycles enzootiques se déroulent dans les foyers naturels de la maladie (population et zone spécifique) entre les rongeurs sauvages et les puces vectrices de la maladie (Figure 3). La maladie est établie dans des foyers enzootiques stables sur tous les continents habités sauf l'Océanie (Figure 4). Ces foyers permettent le maintien de la maladie dans la nature. Les animaux pouvant être infectés sont notamment différentes espèces d'écureuils, de lapins, de souris, de rats et aussi des chiens de prairie (Perry et Fetherson, 1997).

Les cycles épizootiques apparaissent lorsque les puces quittent leurs hôtes sauvages, des rongeurs morts ou mourants qui transmettent alors la maladie à d'autres mammifères dont l'Homme. Cette contamination aux hôtes mammifères peut avoir lieu par ingestion ou contact direct, mais ce ne sont pas les moyens de transmission optimaux (Gage et Kosoy, 2005). Une fois les Hommes contaminés on peut observer des cas de transmission à d'autres êtres humains par le biais de la peste pulmonaire. Des événements épizootiques périodiques ont été observés dans tous les foyers naturels étudiés. Dans l'environnement, un grand nombre de cycle enzootique est observé chez les rongeurs de manière plutôt silencieuse, avec quelques événements épizootiques conduisant à un fort taux de morbidité humaines et d'animaux sauvages. La maladie est caractérisée par des flambées épidémiques dont la fréquence et la durée sont variables, suivie par des années de silence. Comme

par exemple en Libye et au Kirghizistan où la maladie est réapparue après 25 et 30 ans de silence respectivement, montrant le caractère réémergent de la maladie.

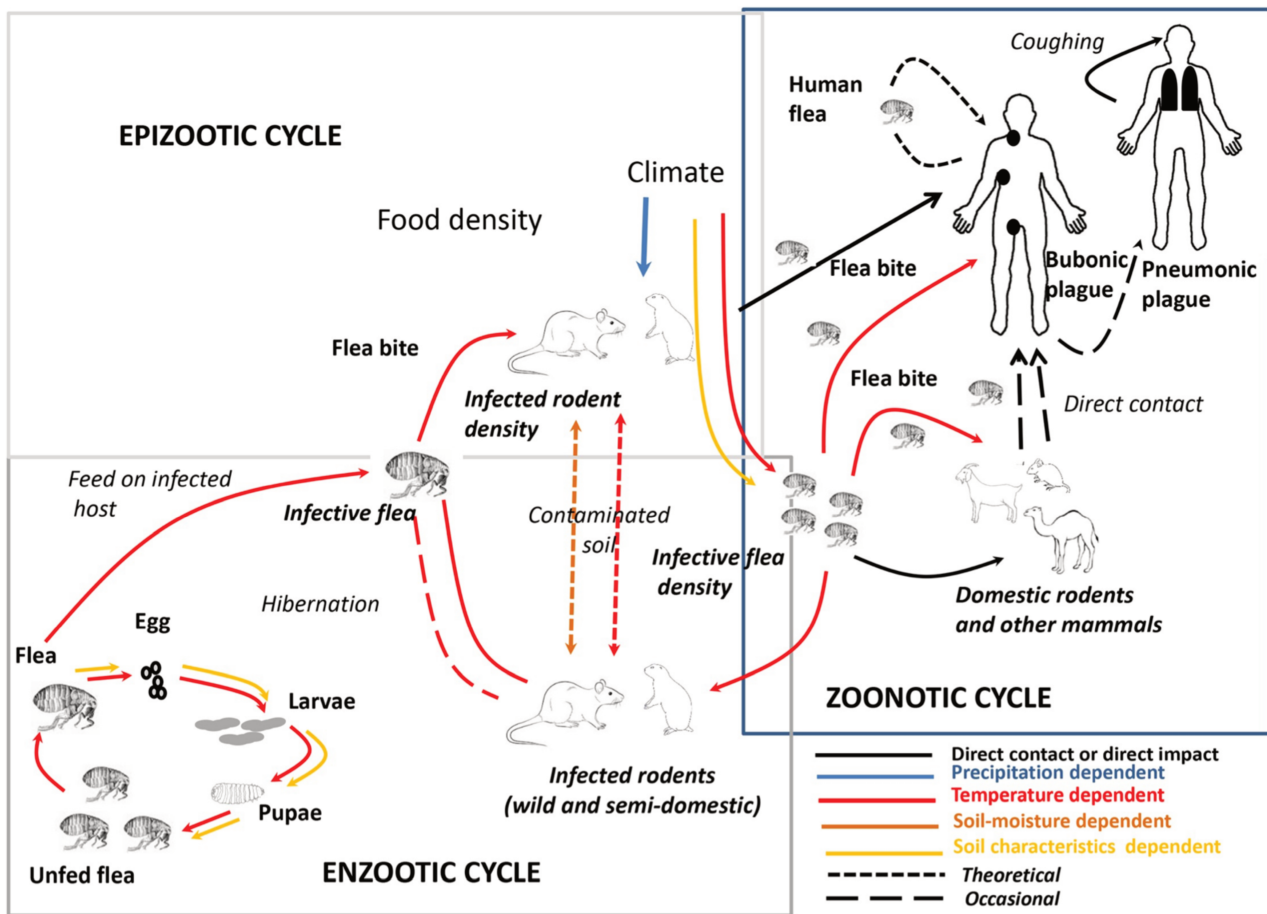


Figure 3 : Cycle de transmission de la peste. Le cycle de la peste est constitué de cycle enzootique et épizootique et peut toucher occasionnellement l'homme créant alors des cas sporadiques ou des épidémies (Vallès *et al*, 2020).

La pérennité de la maladie au cours du temps et sa réapparition après des années de silence ne peuvent pas être expliquée par le seul mécanisme de transmission de la maladie par les rongeurs. C'est pourquoi deux théories ont émergées pour expliquer ces phénomènes. La première serait que des animaux naturellement résistants à la maladie permettraient de maintenir la bactérie dans le milieu naturel (au cours des cycles enzootiques). Environ 200 espèces de mammifères peuvent être infectées par *Y. pestis* mais ne persiste que dans un faible nombre de rongeurs qui sont relativement résistants à la maladie (Perry et Pertherson 1997, Bevins, 2012). En effet, certaines espèces de marmottes (par exemple *Marmota himalayana*) et de gerbilles (notamment *Rhombonyx opinus*) sont résistants à l'infection et sont probablement des réservoirs durables permettant à la bactérie de persister dans le milieu naturel. En revanche les hôtes non résistants et hautement susceptibles tel

que l'Homme, les félinés, les chiens de prairies qui succombent d'infection sévère de *Y. pestis* ne sont pas des hôtes permettant la pérennité de la bactérie dans l'environnement. La deuxième théorie serait que la bactérie perdurerait dans le sol, ajoutant un cycle tellurique à la peste. Des études ont pu montrer que la bactérie pouvait persister au moins 24 jours jusqu'à 40 semaines après son inoculation dans un sol selon les études (Eisen, 2008; Ayyadurai, 2008). Ainsi la présence de *Y. pestis* dans le sol pourrait conduire à la contamination de rongeur creusant le sol et donc initier un nouveau cycle rongeur/rongeur (Drancourt, 2007).



Figure 4: La distribution des foyers naturels de la peste. La carte représente en rouge les pays dont de potentiel foyer naturel existe, ces pays ont été obtenus par analyse des données historiques. (OMS)

La puce : le vecteur de la maladie

Les puces forment l'ordre des siphonaptères qui est composé de 2574 espèces appartenant à 16 familles et 236 genres (Bitam *et al.*, 2010). Les puces sont de petits insectes aplatis latéralement, sans aile et grandement spécialisées. Les puces mâles et femelles sont tous deux des ectoparasites hématophages obligatoires des mammifères et des oiseaux. La plupart des espèces de puces ont pour hôtes les rongeurs, ils n'existent pas de puce spécifique de l'Homme (Whiting *et al.*, 2008) mais certaines espèces peuvent quand même l'affecter comme notamment : *Pulex irritans* (souvent appelés puce de l'homme), *Ctenocephalides felis felis* (puces de chat) et *Ctenocephalides canis* (puces de chien) et *Xenopsylla cheopis* (puce du rat oriental). Elles sont aussi vectrices majeures de pathogènes dans beaucoup de régions du globe.

La puce

Le cycle de vie de la puce débute par un oeuf suivi de plusieurs stades larvaires et un stade nymphal (Figure 5). La durée de ce cycle est différente en fonction de l'espèce considérée et des conditions environnementales. A titre d'exemple, pour *X. cheopis*, l'ensemble du cycle peut prendre de 9 à 15 jours. Après la ponte des puces femelles sur les rongeurs ou dans le nid, les oeufs mettent 1 à 10 jours avant d'éclore, selon la température et l'humidité (Bitam *et al.*, 2010). Les larves passent par trois stades dont la longueur dépend de la disponibilité en nourriture, l'humidité relative et d'autres facteurs. Une fois ces stades larvaires terminés, la larve devient une nymphe qui forme un cocon. Si la nymphe ne perçoit pas le bon stimulus, elle n'éclore pas et peut rester dormante pendant des semaines jusqu'à ce qu'un hôte arrive (phénomène de diapause). Une fois ce stimulus ressenti, la puce adulte ou imago sort du cocon (Figure 5). Les éléments utilisés par les puces pour trouver leurs hôtes sont la température corporelle, le mouvement ou le dioxyde de carbone exhalé (Bitam *et al.*, 2010).

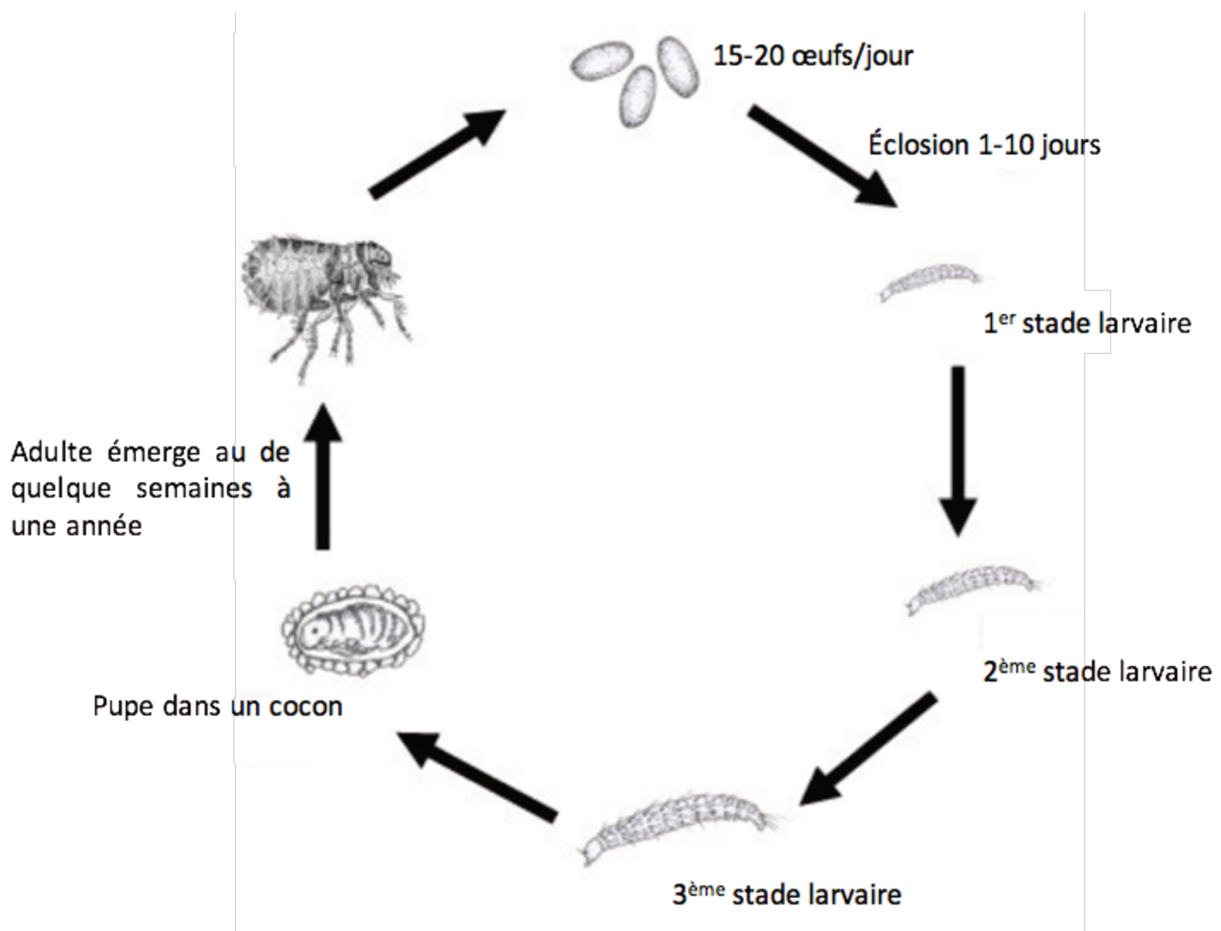


Figure 5 : Cycle de vie de la puce du rat oriental : *Xenopsylla cheopis*. (Modifié à partir de Dobler et Pfeffer, 2011). Après la ponte, les insectes passent par 3 stades larvaires avant de donner une nymphe dans un cocon qui éclore lors qu'il perçoit le stimulus approprié.

Les puces sont généralement présentes directement sur leurs hôtes ou dans leurs nids. Elles ne se nourrissent pas spécifiquement sur une seule espèce d'hôte mais peuvent toucher plus spécifiquement certaines espèces (souvent taxonomiquement proches ou similaires dans leurs écologies). Les puces sont connues comme vectrices de maladies comme le typhus murin (*Rickettsia typhi*), le typhus (*Rickettsia prowazekii*), ou des helminthes comme *Dipylidium caninum* et *Hymenolepis diminuta* parasites des carnivores et des rats respectivement (Bitam *et al.*, 2010). La capacité de transmettre la maladie des puces dépend grandement de l'espèce infectée, du moins dans les conditions de laboratoire.

Certaines espèces de puce comme *C. felis*, *C. canis*, *Ctenophthalmus agyrtes* ou *Leptosylla segnis*, sont considérées comme très mauvais vecteurs de la maladie. En effet, ces puces sont capables d'éliminer la bactérie rapidement, et/ou n'affectent que peu l'homme. Des modèles ont été développés pour déterminer la capacité de transmission des espèces de puces. Wheeler et Douglas (1945) Burroughs (1947) et Kartman (1957)). Ces modèles prennent en compte i) le potentiel d'infection, qui est le pourcentage de puces qui deviennent infectées après un repas sur un hôte septicémique; ii) le potentiel du vecteur qui est le pourcentage de puces infectées qui deviennent infectieuses; iii) le potentiel de transmission qui représente le nombre moyen de transmission effectué par puce; iv) la durée de vie d'une puce infectieuse (bloquée) et v) l'indice de prévalence sur l'hôte qui représente le nombre moyen de puces par espèce par rongeur ou par nid. Ainsi, les puces du rat oriental *X. cheopis*, la puce du rat *Oropsylla montana* et la puce du rat d'Europe *Nosopsyllus fasciatus* ont été identifiées comme les vecteurs les plus efficaces de la maladie, avec des transmissions considérées comme bonne et excellente (Eskey, 1938 ; Burroughs, 1947 ; Lorange *et al.*, 2005). Cependant, bien qu'elles soient les espèces qui transmettent le mieux la maladie, la capacité de transmission de ces espèces sont faibles, notamment comparée à celle d'autres pathogènes véhiculées par les moustiques ou les tiques, ceci pourrait être dû à la récente évolution de la bactérie vers un mode de transmission par les arthropodes. Cette faible capacité de transmission des puces impose probablement une pression de sélection qui favorise l'émergence et la maintenance de clone hypervirulent de *Y. pestis*.

Infection des puces

C'est lors d'un repas sanguin sur un hôte mammifère bactériémique que le bacille de la peste est ingéré par la puce. Suite à son ingestion, *Y. pestis* reste dans la lumière du tractus digestif (Bacot et

Martin, 1914; Bacot, 1915) notamment dans le tube digestif moyen et dans le proventricule (une valve couverte d'épines de chitine dirigées vers l'intérieur, qui s'ouvre de manière rythmique au cours du repas sanguin pour permettre le passage du bol alimentaire depuis l'oesophage vers le tube digestif moyen (Figure 6A) et empêcher sa régurgitation au point de piqûre. La peste peut être transmise par le biais de deux mécanismes : la phase de transmission précoce (EPT) ou la transmission tardive dépendante de la formation de biofilm.

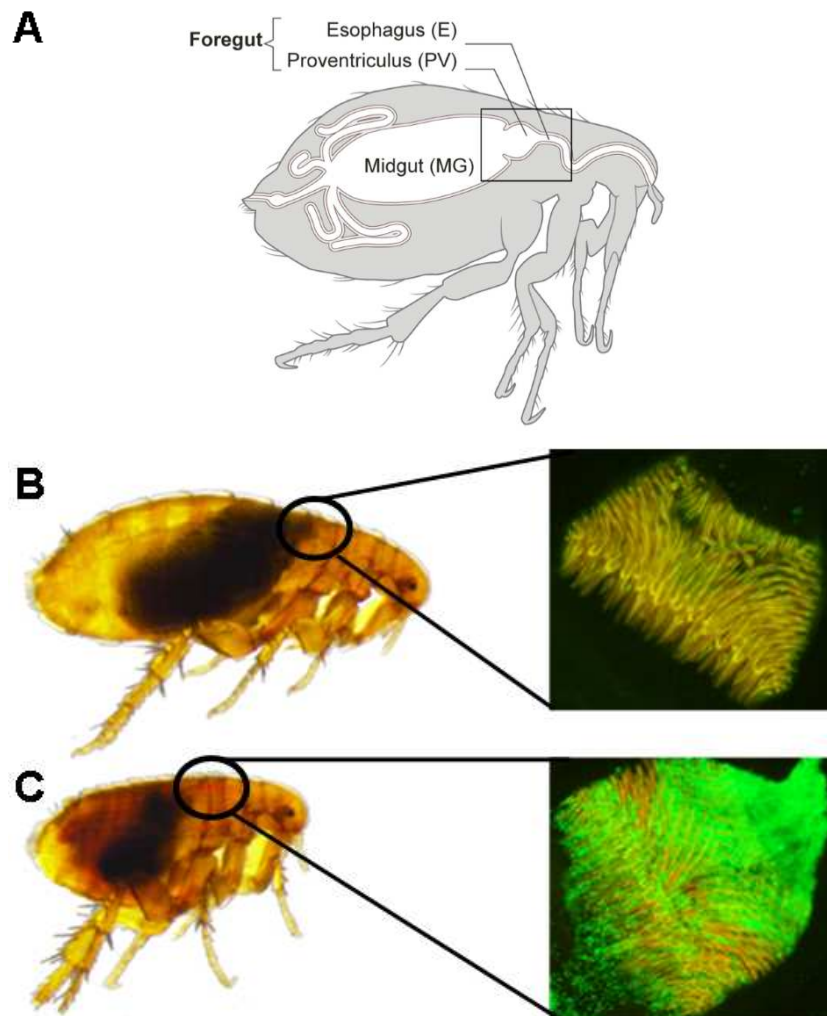


Figure 6. *Y. pestis* obstrue le proventricule de la puce. Photos de la puce du rat *Xenopsylla cheopis* saine (A) et bloquée (B), et de leur proventricule (constitué d'épines de chitine). La puce bloquée se caractérise par une petite taille et la présence de sang frais dans le partie supérieure mais pas inférieure du tube digestif. Contrairement à une puce saine (A), le proventricule (jaune) d'une puce bloquée est obstruée par des myriades de *Y. pestis* (vert) (B). Les photos des insectes et des proventricules ont été prises respectivement à l'aide d'une loupe binoculaire à lumière blanche et d'un microscope à fluorescence avec un filtre B2A. La puce bloquée a été infectée par une souche GFP de *Y. pestis*.

La transmission tardive dépendante de la formation de biofilm

Après le repas sur un hôte contaminé par *Y. pestis*, une masse bactéricide molle et gélatineuse contenant des bactéries remplissant la lumière du proventricule est produite, une heure après l'infection (Figure 7). Les bactéries présentes à l'intérieur de cette masse parviennent à se multiplier et à la consolider en formant du biofilm (Dewitte *et al.*, 2020). Cette masse et les bactéries piégées à l'intérieur sont ensuite poussées vers le tube digestif moyen par le flux produit par un nouveau repas sanguin ou par les pulsations du proventricule de la puce. Cependant toutes les bactéries ne sont pas emmenées par ce flux et certaines restent présentes au niveau du proventricule. Une nouvelle masse peut ensuite se former dans le proventricule à partir de ces bactéries encore présentes (Figure 7). Ce processus de formation de masse, de colonisation et de décolonisation partielle continue jusqu'à ce que la masse soit suffisamment solide pour supporter le flux du sang entrant ou les pulsations du proventricule (Dewitte *et al.*, 2020). Cette masse obstrue alors le tube digestif de l'insecte. La puce est alors qualifiée de bloquée (Bacot and Martin, 1914, Hinnebusch *et al.*, 1996)(Figure 6C). Le blocage de la puce bouche le tube digestif empêchant l'insecte de se nourrir, ce qui l'affame, si bien que ce dernier finit par piquer frénétiquement son hôte dans le but d'assouvir sa faim. C'est au cours de ces multiples tentatives de prises sanguines infructueuses que le sang aspiré est souillé au contact du bouchon bactérien puis, ne pouvant être ingéré, est régurgité dans le derme du mammifère, bouclant ainsi un cycle mammifère-puce-mammifère. La bactérie n'est pas transmise de manière trans-ovarienne et des larves infectées artificiellement se débarrassent de l'infection en 24h. (Perry et Petherson,1997).

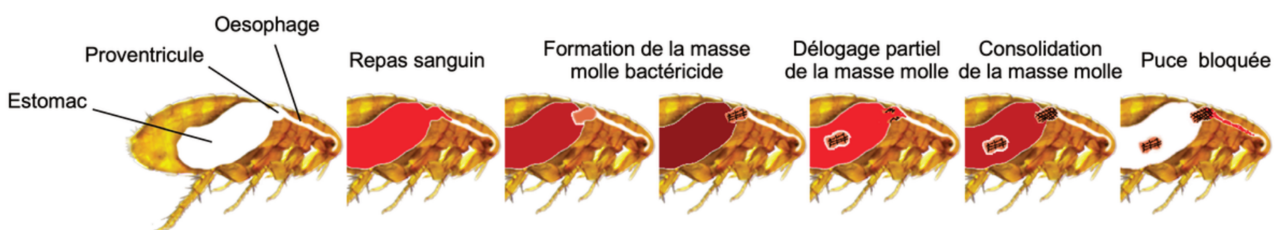


Figure 7 : formation de la masse bactérienne qui conduit au blocage de la puce. (Dewitte *et al.*, 2020)

La phase de transmission précoce

La phase de transmission précoce (EPT) regroupe le phénomène de transmission qui s'écoule pendant une courte période de temps entre le moment où la puce est infectée jusqu'au moment où

elle devient bloquée. Cet événement peut se produire juste après le repas sanguin jusqu'à 4 jours après l'infection (Eisen *et al.*, 2006 ; Eisen *et al.*, 2007). L'efficacité de ce processus de transmission est différente selon les espèces considérées. L'EPT était considérée comme étant seulement mécanique. En effet, la contamination a lieu au niveau du rostre contaminé de l'insecte. Cependant, des recherches montrent que ce phénomène est plus complexe. L'EPT a lieu, lorsque du sang de nouveau ingéré rencontre un amas de bactérie dans le proventricule. Les turbulences hydrodynamiques créées par le flux sanguin entrant sont suffisantes pour créer un reflux de sang, permettant à quelques bactéries d'être régurgitées au point de piqûre (Dewitte *et al.*, 2020).

Ainsi les éléments présents dans le tube digestif de la puce sont des facteurs influençant l'infection par *Y. pestis*.

Condition du tube digestif de la puce

Les puces consomment entre 0,1 à 0,4 μL de sang à chaque repas sanguin (Hinnebusch *et al.*, 2017). Après l'ingestion de ce dernier, la digestion et l'absorption du sang se réalise dans le tube digestif moyen de l'insecte composée d'une seule couche cellulaire épithéliale associée à une membrane basale qui permet une isolation de l'hémolymphe. Contrairement à la plupart des arthropodes hématophages, les puces ont un tube digestif simple non divisé. Le stockage, la digestion et l'absorption du repas sanguin ont lieu à travers toute la longueur du tube digestif. La majorité des cellules qui composent la couche cellulaire sont des cellules épithéliales digestives (Pennington et Wells, 2005). Pendant le repas sanguin, les muscles de la tête de l'insecte agissent comme une pompe péristaltique pour propulser le sang dans l'œsophage. Le repas sanguin passe ensuite par le proventricule, une valve localisée entre l'œsophage et l'intestin qui est composé d'épines de chitine dirigées vers l'arrière. Cette valve s'ouvre et se ferme de manière rythmique en coordination avec les muscles de la tête de l'insecte pour permettre au sang de pénétrer dans l'intestin moyen et pour empêcher le reflux au point de piqûre.

Les glandes salivaires de la puce sécrètent notamment au niveau du point de piqûre une apyrase, un anticoagulant permettant d'empêcher l'hémostase et améliorer le nourrissage de l'insecte. L'apyrase est une enzyme qui inhibe l'agrégation des plaquettes et des neutrophiles (Ribeiro *et al.*, 1990).

La digestion du sang commence rapidement, conduisant à une hémolyse du sang environ 6 heures après nourrissage de l'insecte. La lyse des globules rouges est l'un des phénomènes majeurs de la

digestion car ces derniers comportent la majorité des nutriments présents dans le bol alimentaire. Cette lyse est mécanique, elle est réalisée par un mouvement d'avant en arrière du sang vers les épines du proventricule (Pennington et Wells, 2005). Rapidement, le volume de sang ingéré est fortement diminué par diurèse (80% du volume du sang est de l'eau) afin de soulager la pression exercée sur le tube digestif et limiter le risque de prédation. En effet, après nourrissage le volume du tube digestif de l'insecte peut augmenter de vingt fois par rapport à celui de l'insecte non nourri. Pour poursuivre la digestion des enzymes digestives sont produites par les cellules digestives de la puce. L'épithélium intestinale de l'insecte sécrète des enzymes digestives semblables aux vertébrés comme la trypsine, chymotrypsine, des amino et carbopeptidases, cathepsines, lysozymes, glycosidases et des lipases (Terra et Ferreira, 1994). Ces enzymes sont principalement des protéases (sérine protéase : trypsine et chymotrypsine notamment) étant donné que les protéines sont les nutriments les plus abondants dans le sang. Au cours de la digestion, le sang va s'assombrir. Finalement les puces défèquent une portion de leur repas partiellement digéré qui sert comme ressource nutritive pour leurs larves. Cependant, il faut remarquer que la digestion du sang est différente selon l'espèce de puce et le sang de l'hôte ingéré. En effet, pour la puce *X. cheopis*, la digestion de l'hématine (groupement ferrugineux dans l'hémoglobine) est inférieure à 12 heures quand le sang ingéré est celui de la souris blanche alors qu'il requiert entre 12 à 20 heures pour les hamsters et les hommes, 18 à 25 heures pour le cochon d'Inde et de 20 à 30 heures pour le rat blanc (Vashchenok *et al.*, 1976). Concernant les cations, la concentration de $MgCl_2$ et Ca^{2+} à un jour après nourrissage est de 0,1 nM. Cette concentration augmente légèrement au 6^{ème} jour après le nourrissage pour atteindre 0,3 mM. Les concentrations en Fer sont quant à elles plus élevées grâce à la digestion du sang, une concentration de 3,6 nM et 2 nM ont été mesurées respectivement un jour et 6 jours après le nourrissage (Rebeil *et al.*, 2013).

Actuellement, la composition et les caractéristiques physico-chimiques du contenu du tube digestif de la puce sont méconnues. Seul le pH, l'osmolarité et la concentration en certains ions métalliques ont été rapportées, ainsi que la présence de ROS. Juste après le repas sanguin, l'osmolarité du contenu digestif chute de ~500 mOsM à la valeur de l'osmolarité du sang, soit ~300 mOsM. Douze heures après la fin du repas, la valeur de l'osmolarité retourne à sa valeur basale (environ 500 mOsM) suite notamment à la diurèse qui concentre les ions dans l'intestin. Le pH est quant à lui acide, suite à un repas sanguin, le contenu intestinal devient basique 6 heures après le nourrissage puis retrouve son pH dès 24h. Ces fluctuations reflètent les processus d'absorption et digestion du sang. (Bontemps-Gallo *et al.*, 2019).

Un autre facteur à prendre en considération est la réponse immunitaire mise en place par la puce pour se défendre vis-à-vis d'un pathogène ingurgité. Actuellement, ce mécanisme de défense immunitaire reste peu connu (Brown, 2019). Dans un premier temps, les cellules épithéliales et le péristaltisme du tube digestif agissent comme une barrière physique contre la colonisation des pathogènes. Le génome de la puce n'ayant pas été séquencé, la mouche du fruit (*Drosophila melanogaster*) a été utilisé comme modèle pour étudier les mécanismes immunitaires chez les arthropodes. Chez *Drosophila* des lignes de défenses sont mises en place pour se défendre vis-à-vis des pathogènes, l'activation des peptides antimicrobiens (AMP), des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des espèces réactives du nitrate (RNS) (Lemaitre, 2007). Les peptides antimicrobiens sont souvent des peptides inférieurs à 10 kDa qui reconnaissent les phospholipides membranaires des pathogènes. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des produits naturels du métabolisme de l'oxygène. Ils sont importants dans les mécanismes de défense contre les pathogènes dans les insectes. Ces molécules doivent aussi être présentes chez *X. cheopis* qui présente des gènes avec des séquences similaires à celles d'autres insectes responsables de la production de ROS. En outre, la quantité de peroxyde d'hydrogène (ROS) augmente chez les puces contaminées par *Y. pestis* et l'ingestion d'antioxydant avant l'infection provoque une forte augmentation de la charge bactérienne dans l'insecte (Zhou *et al.*, 2012).

Il est à noter que lors d'une infection à *Y. pestis*, les transcripts des sérines protéases augmentent chez *X. cheopis* (Zhou *et al.*, 2012). On ne connaît pas encore si cette différence de transcription limite l'infection du pathogène, ou si ce dernier a besoin de facteur supplémentaire pour surmonter ces protéases. (Brown, 2019). Le milieu digestif de la puce et les perturbations constantes dues au péristaltisme apparaissent comme un milieu hostile. La flore digestive de la puce apparaît comme limitée (mais pour l'instant peu décrite) et l'influence que celle-ci a sur l'infection de *Y. pestis* est inconnue (Chouikha, 2012).

***Yersinia pestis* agent causal de la peste**

Le séquençage du génome de *Y. pestis* a permis de nouvelles découvertes concernant l'évolution de cette bactérie. L'ancêtre de *Y. pestis* qui était capable de causer une peste bubonique émerge probablement des environs de la Chine il y a 5 700 ans (Rasmussen *et al.*, 2015). Cette souche aurait elle-même émergé d'un ancêtre moins virulent qui a divergé de *Y. pseudotuberculosis* il y a 54 000 ans. *Y. pestis* et *Y. pseudotuberculosis* possèdent 97% d'identité génétique (Chain *et al.*,

2004). Les modifications responsables des différences de physiopathologie entre les deux bactéries nécessaire à l'infection des puces seraient dues à l'acquisition de nouvelles fonctions portées notamment par deux plasmides : pMT1 et pPCP1 codant la toxine murine (Ymt) qui contribue à la survie de la bactérie dans la puce, et la protéase activateur plasminogène Pla. L'acquisition de ces deux plasmides est un événement critique concernant l'évolution de *Y. pestis* (Hinnebusch *et al.*, 2002; Kukkonen and Korhonen, 2004).

Comme *Y. pestis* possèdent différents hôtes (insectes et mammifères), la bactérie doit s'adapter à chacun de ses hôtes afin de se développer de manière optimale. En effet, elle doit être capable chez la puce de résister à la réponse immunitaire, de se développer au sein du tube digestif de l'insecte et de former le biofilm nécessaire pour le blocage et donc la transmission. Alors que dans l'hôte mammifère elle doit être capable de résister au système immunitaire. Pour effectuer cette adaptation de manière rapide, la bactérie perçoit la composition en nutriment pendant l'infection à travers différents mécanismes moléculaires, puis intègre l'information pour pouvoir s'adapter et répondre aux différents stimulus. La bactérie parvient à s'adapter notamment en percevant la température qui a alors un impact sur l'expression des gènes de virulence. En effet, des études du profil de transcription des bactéries à des températures de 26° C (température de la puce) et 37° C (température du mammifère) montrent que 10% des gènes chromosomiques sont influencés par la température, dont la majorité sont des gènes de fonction métabolique (Motin *et al.*, 2003 ; Han *et al.*, 2004). Cependant la régulation des gènes peut aussi se faire par la perception d'autres indices environnementaux comme le pH, la concentration en ions, la disponibilité des nutriments, l'osmolarité et la présence en oxygène. Les gènes impliqués dans l'infection de la puce

Le nombre de gènes connus pour être impliqués dans l'infection des puces est limité. Ces gènes sont divisés en deux catégories : colonisation et transmission. Les premiers permettent de résister aux composés toxiques du sang et à la réponse immunitaire de la puce (ROS, peptides antimicrobiens) et donc de croître dans le tube digestif de l'insecte. Les gènes de transmission sont plutôt impliqués dans la formation du bouchon bactérien qui conduit au blocage de la puce. Les locus identifiés comme requis pour produire une infection optimale par *Y. pestis* dans la puce peuvent se répartir en plusieurs catégories : nécessaire à la formation du biofilm (*hms*, *ompF*), au LOS (*gmhA*) au métabolisme (*ymt*, *rpiA*, *rpiA2*), et à la régulation d'expression génétique (*csrA*, *yfbA*, *oxyR*, *rovM*, *hfq*, *phoP-phoQ*, *ompR-envZ*).

Pour permettre la formation du bouchon bactérien participant à la transmission de la maladie, la bactérie doit former du biofilm dans l'insecte, l'opéron *hmsHFRS* y contribue en grande partie et est essentiel à cette formation de biofilm (Hinnebusch *et al.*, 1996). Ce dernier est responsable de la synthèse et du transport de l'exopolysaccharide (EPS). HmsH et HmsF sont deux protéines membranaires alors que HmsR et HmsS sont dans la membrane interne de *Y. pestis*. HmsH est une protéine thermo-modifiable qui fonctionne comme une porine impliquée dans l'exportation du polymère de β -1,6-N-acétyl-D-glucosamine (EPS). HmsF, une déacétylase, interagit avec HmsH pour former un complexe. HmsR et HmsS sont des glycosyltransférases qui forment ensemble un complexe enzymatique essentiel pour biosynthétiser l'EPS (Hinnebusch *et al.*, 1996). Les 4 protéines décrites ci-dessus sont essentielles à la formation du biofilm.

L'activité des glycosyltransférases Hms, est stimulée par le cyclic-diguanosine-monophosphate (c-di-GMP) (Kirillina *et al.*, 2004 ; Sun *et al.*, 2008; Bobrov *et al.*, 2011) dont la quantité est gouvernée par les produits de l'opéron *hmsCDE* et les gènes *hmsT* et *hmsP* (Figure 8). HmsT et HmsD sont les deux seuls diguanylates cyclases requises pour la formation du c-di-GMP. Cependant HmsT semble jouer un rôle majeur dans la formation de biofilm en condition *in vitro* alors que HmsD semblent plutôt impliquée dans la production du biofilm dans la puce (Sun *et al.*, 2011). La phosphodiesterase HmsP catalyse la dégradation du c-di-GMP. L'opéron *hmsCDE* code également les protéines membranaires HmsE et HmsC qui contrôlent l'activité de la diguanylate cyclase HmsD ; HmsE active cette dernière alors que HmsC l'inhibe en la séquestrant (Figure. 8) (Ren *et al.*, 2014; Bobrov *et al.*, 2015).

En plus du locus *hms*, d'autres facteurs de régulation permettent l'ancrage du biofilm au niveau du proventricule de manière optimale comme le locus *gmhA* et *yrbH*. Le gène *gmhA* code une phosphoheptose-isomérase qui contrôle la synthèse d'heptose essentielle à la synthèse du noyau (core) interne du lipopolysaccharide (LPS) (Liu *et al.* 2016). *yrbH* code une arabinose-5-phosphate isomérase qui catalyse la réaction de conversion du ribulose 5 phosphate en arabinose 5 phosphate (Tan et Darby, 2006). Cette conversion correspond à la première étape de la synthèse de l'acide 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonique (Kdo). Des mutations de ce gène conduisent à un LPS tronqué. Il a été proposé que cette altération conduisait à un mauvais transport de polysaccharide requis pour former le biofilm (Tan et Darby, 2006).

De plus des gènes mis en évidence récemment possèdent différentes fonctions selon le moment de l'infection permettant le blocage dans la puce. Ce sont *rpiA*, *rpiA2* et *rpe*. RpiA et RpiA2 sont des ribose-5-phosphate isomérasés requis pour la résistance à différents éléments toxiques présents dans la puce. Cependant lorsque la bactérie s'est adaptée au tube digestif de l'insecte, les RpiA ne sont plus requis pour cette résistance mais pour produire le biofilm consolidant la masse formée pendant la période précoce de l'infection. Rpe, la ribulose-5-phosphate-3 épimérase, est aussi nécessaire pour le blocage de la puce, en possédant probablement les mêmes fonctions que RpiA (Dewitte *et al.*, 2020).

La formation de biofilm par les bactéries a tendance à se réaliser dans des milieux pauvres en nutriments, ce qui pourrait donc être un stimulus ressenti par la bactérie pour s'adapter, et conduire à l'infection dans la puce (Chouikha *et al.*, 2019). Les systèmes à deux composants sont un des éléments permettant à la bactérie de percevoir tout changement environnemental pour permettre une réponse adéquate et donc de s'adapter. Il se compose généralement d'un capteur transmembranaire et d'un régulateur transcriptionnel spécifique qui régule la plasticité de l'expression génique. Parmi les 23 systèmes à deux composants décrits chez *Y. pestis*, deux d'entre eux sont connus pour être impliqués dans l'infection de la bactérie dans le mammifère ou la puce : les systèmes PhoP-PhoQ et OmpR-EnvZ (Vadyvallo *et al.*, 2015 ; Reboul *et al.*, 2014).

Le stimulus probablement ressenti par le système PhoP-PhoQ serait le pH acide du tube digestif de la puce. PhoP modulerait alors l'adaptation physiologique à ce pH acide et à d'autres stress subis pendant l'infection (Vadyvallo *et al.*, 2015). En plus d'améliorer la transmissibilité, le système PhoP-PhoQ pourrait permettre la préadaptation de la bactérie dans la puce à résister à la rencontre initiale avec le système immunitaire du mammifère.

Dans la puce le système OmpR-EnvZ serait activé par l'appauvrissement du contenu du tube digestif en nutriment (Figure 9). Une fois activé, il déclenche un programme moléculaire impliquant au moins *ompF*, codant une porine nécessaire à la formation du biofilm en permettant la diffusion de particule de taille inférieure à 600 Da à travers la membrane externe (Bontemps-Gallo, 2019). Des analyses transcriptionnelles chez *Y. pestis* ont mis en évidence que 224 gènes étaient régulés par ce système à deux composants dont 16 de manière directe (Gao, 2011).

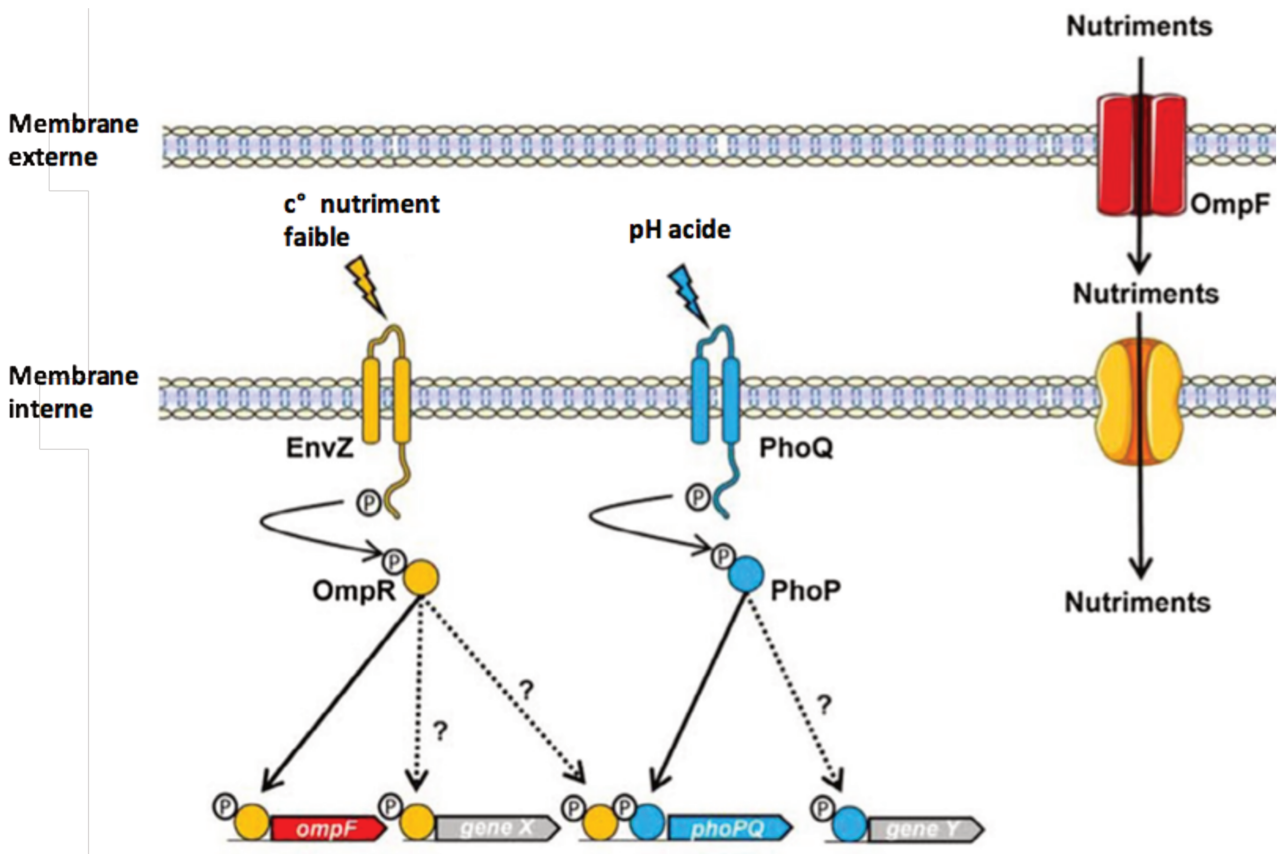


Figure 9 : Fonctionnement des systèmes à deux composants impliqués dans l'infection chez *Y. pestis*. Les senseurs (EnvZ et PhoQ) perçoivent un signal, (concentration en nutriment et le pH) (Bontemps-Gallo *et al.*, 2019) s'auto-phosphorylent puis transfèrent leurs phosphate sur leurs régulateurs respectifs (OmpR et PhoP) qui permettent d'activer un programme moléculaire nécessaire au blocage de la puce. Les gènes X et Y nécessaire pour le blocage de la puce ne sont pas connus.

En plus des systèmes à deux composants pour réguler la formation de biofilm dans la puce, la bactérie utilise aussi des régulateurs. Parmi eux, le récepteur de protéine cAMP (CRP), la protéine de régulation CsrA et le régulateur YfbA ont été décrits. CRP permet de contrôler des facteurs de virulence dans de nombreux pathogènes en contrôlant l'expression de multiples gènes de virulence pour répondre à des changements environnementaux, notamment la disponibilité en carbone, et plus particulièrement quand le milieu contient peu de glucose (Petersen and Young, 2002; Zhan *et al.*, 2008). CRP ne peut s'activer qu'en se liant à des molécules de cAMP. Le complexe cAMP-CRP ainsi formé se lie directement aux régions promotrices des gènes pour en activer ou en réprimer l'activité (Busby and Ebright, 1999). Enfin, la protéine de régulation du stockage de carbone CsrA peut améliorer la régulation réalisée par CRP pour la formation de biofilm *in vitro* (Willias *et al.*, 2015). Concernant YfbA, les facteurs régulés par ce dernier et permettant la formation du biofilm dans la puce sont encore inconnus.

Des études tendent à montrer l'implication d'autres gènes tels que *galU* et *arnB* même si ces recherches n'ont pas été confirmées dans la puce. *galU* codant une glucose-1-phosphate uridylyltransférase et *arnB* codant une UDP-4-amino-4-deoxy-L-arabinose-oxoglutarate aminotransférase sont impliqués dans la résistance aux peptides antimicrobiens en modifiant le LPS avec du 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (Aoyagi, 2015).

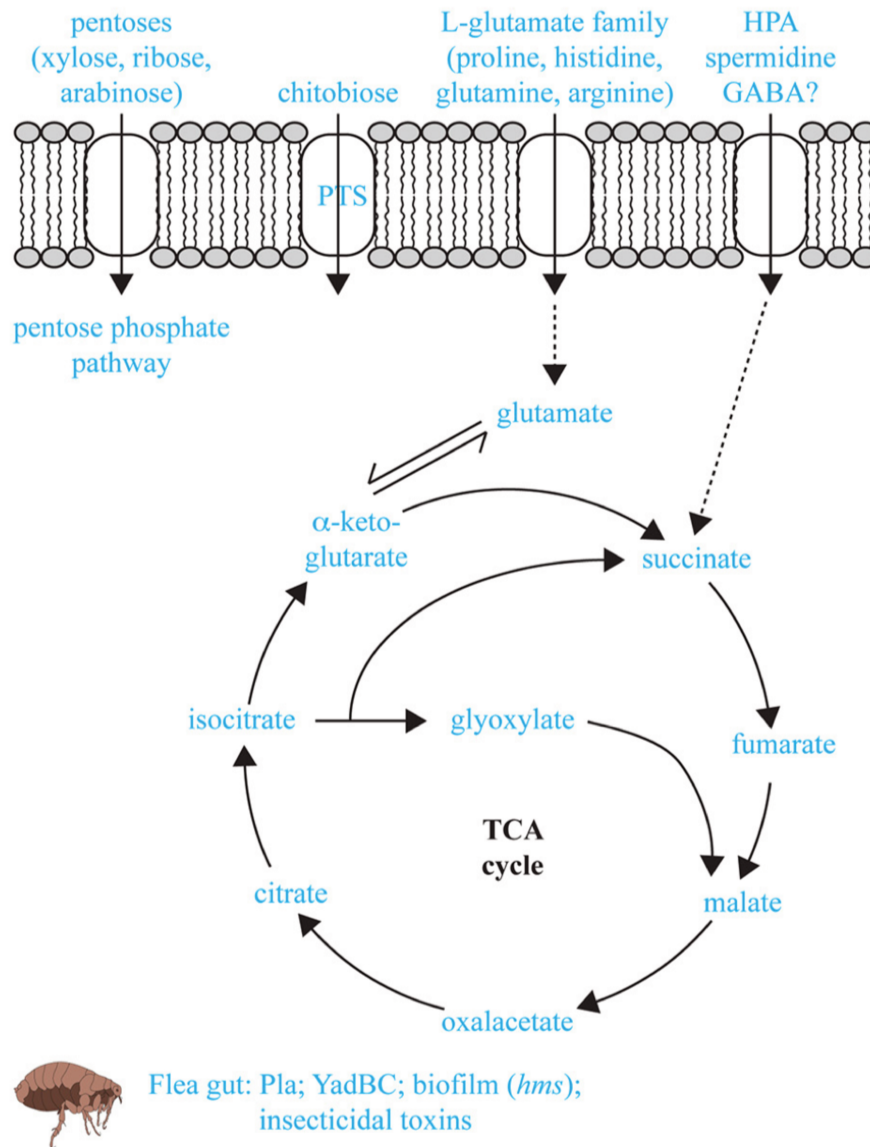


Figure 10 : Voie métabolique et facteur de virulence de *Y. pestis* induit dans la puce. (Heroven et Derch, 2014)

L'étude des gènes impliqués dans l'infection de l'insecte est encore nécessaire pour poursuivre la description des mécanismes utilisés par la bactérie pour transmettre la maladie par les puces. Dans le but d'identifier de nouveaux mécanismes impliqués dans la propagation de la peste par les puces, une étude comparative du transcriptome de *Y. pestis* dans la puce et cultivée *in vitro* a révélé 172

loci surexprimés (Vadyvaloo *et al.*, 2010). L'analyse des gènes régulés a permis de mieux entrevoir les potentiels mécanismes requis par la bactérie pour bloquer l'insecte. Dans la puce, principalement les acides aminés et en particulier ceux avec un groupement L-glutamate (glutamine, histidine, arginine, proline) sont catabolisés par la bactérie. La dégradation de ces acides aminés conduit à une augmentation du flux du carbone des acides aminés à travers le cycle de krebs. Les enzymes qui composent ce cycle sont donc grandement induit dans la puce (Heroven et Derch, 2014) (Figure 10).

Les analyses du métabolisme spécifique de *Y. pestis* pendant l'infection sont importantes pour comprendre les processus de colonisation et de blocage de l'insecte par la bactérie. Cependant, les fonctions métaboliques utilisées par la bactérie dans son hôte sont encore limitées. En outre de nombreux gènes identifiés sont impliqués dans le métabolisme énergétique dont le métabolisme central qui est grandement régulé par les modifications post-traductionnelles. Parmi ces modifications on retrouve notamment la lipoylation.

La lipoylation

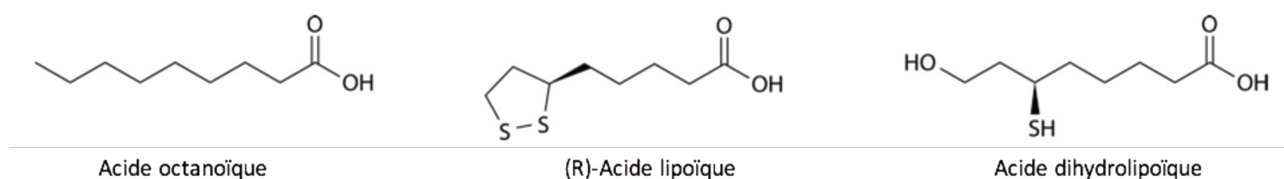


Figure 11 : L'acide lipoïque et les molécules annexes. Le lipoate est un dérivé d'acide octanoïque sur lequel 2 atomes de soufre ont été insérés sur le carbone 6 et 8. Les 2 groupements thiols forment le disulfide appelé acide lipoïque dont l'acide dihydroliipoïque est la forme réduite.

La lipoylation consiste en l'ajout de lipoate sur des enzymes cibles. Le lipoate (acide lipoïque) aussi appelés acide thioctique, acide 6,8-dithiooctanoïque est un cofacteur organosulfuré (Figure 11) hautement conservé essentiel pour la fonction de différentes enzymes clés dont notamment la pyruvate dehydrogenase (PDH), la 2-oxoglutarate dehydrogenase (OGDH), branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase (BCODH), l'acétoine dehydrogenase et le système de clivage de la glycine (GCV) (Cronan, 2016). A part GCV, ces enzymes partagent la même architecture: elles sont composées de plusieurs copies de trois sous-unités catalytiques appelées E1, E2 et E3 (Perham, 2000). GCV, elle en comporte 4 appelées P, H, T et L (Douce *et al.*, 2001). Le lipoate est lié par une liaison amide sur un résidu lysine conservé du domaine lipoylable présent sur les sous-sous-unités

E2 ou la protéine H de GCV (Christensen et Cronan, 2010; Spalding et Prigge, 2010). L'acquisition et l'utilisation du lipote est différente au sein des pathogènes et affectent leur virulence. Les études préliminaires ont montré que le précurseur de l'acide lipote est l'acide octanoïque (Figure 11). Le précurseur octanoïque est quant à lui synthétisé par le système de synthèse des acides gras de type II. Ensuite deux atomes de soufre sont introduits sur le noyau octanoïque avec la perte de deux atomes d'hydrogènes, un en position C-6 et l'autre en position C-8, formant alors le lipote (Cronan, 2016).

Afin de réaliser la lipoylation, deux grandes voies peuvent être mise en place: les voies de lipoylation endogène et exogènes (Figure 12). Les protéines impliquées dans ces deux voies peuvent être différentes selon les espèces étudiées. De plus les deux voies ne sont pas forcément présentes chez chaque espèce. Les mécanismes de lipoylation d'*E. coli*, de *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Plasmodium falciparum* et *Homo sapiens* seront décrites ci-dessous à titre d'exemple.

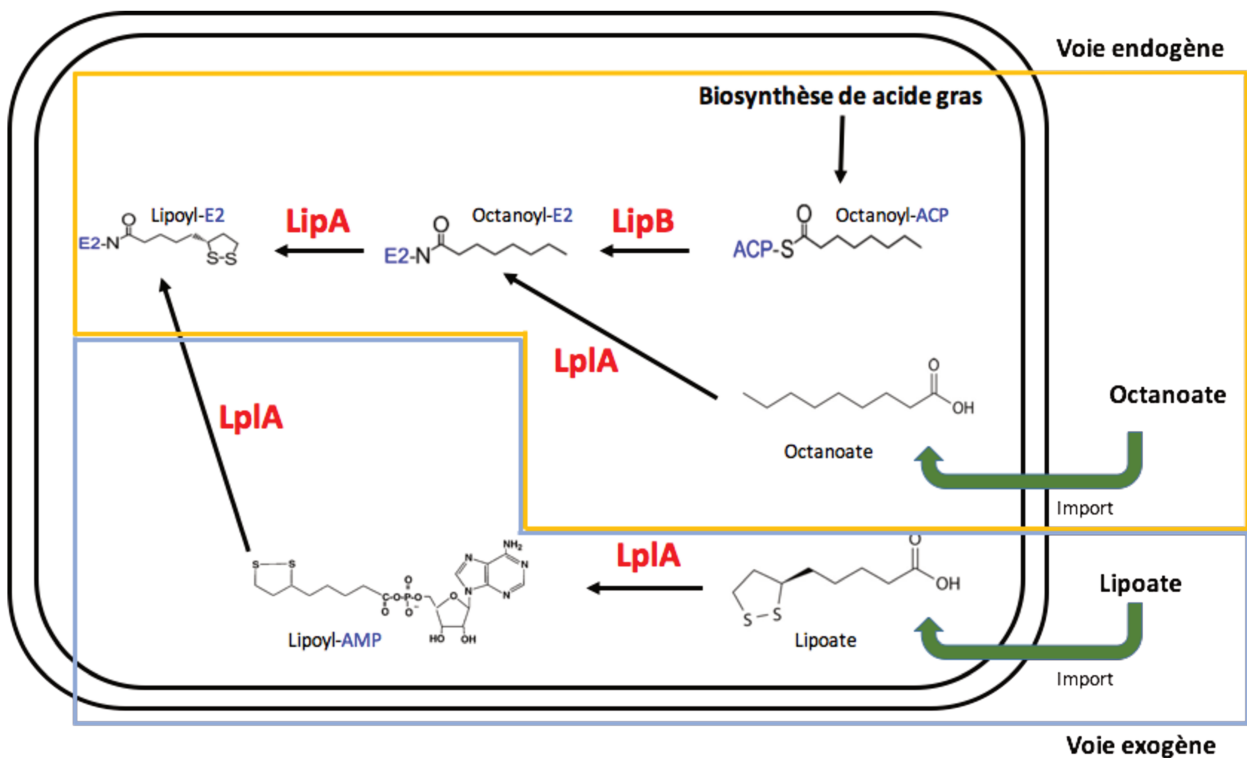


Figure 12 : Les mécanismes de lipoylation. Description des voies de lipoylation endogène et exogène. La voie endogène est réalisée en deux étapes. La première est effectuée par LipB qui utilise l'octanoyl-ACP comme substrat pour octanoyler les sous unités E2 des protéines cibles. Par la suite, LipA insère deux atomes de soufre sur les enzymes octanoylées. La voie exogène est réalisée en deux étapes par la protéine LplA, qui active le lipote libre vers du lipoyl-AMP grâce à de l'ATP. Puis, le lipoyl-AMP est lié par une liaison lipoamide au groupement carbonyle des enzymes cibles en libérant l'AMP.

Escherichia coli

La voie de lipoylation endogène se déroule en deux étapes (Figure 12). La première est catalysée par l'octanoyl transférase LipB (Morris *et al.*, 1995) et la seconde par la lipoate synthase LipA (Herbert et Guest, 1968 ; Reed et Cronan, 1993 ; Hayden *et al.* , 2013). LipB catalyse le transfert d'un groupement octanoyl à partir d'une protéine porteuse d'acyle octanoïque (octanoyl-ACP) sur l'apoprotéine cible. L'octanoyl-ACP est produit à partir de la synthèse des acides gras de type II (Jordan et Cronan, 2003). LipB en est dépendant car il est incapable de se servir efficacement de l'octanoate libre. Après le transfert du groupement octanoyl sur les apoprotéines, 2 atomes de soufre sont insérés par LipA pour former l'anneau dithiolane du lipoate. L'autre mécanisme de lipoylation, la voie exogène implique l'attachement de lipoate exogène sur les sous unités apo-E2 ou la sous unité de la protéine H par une lipoate ligase, LplA (Morris *et al.*, 1995) (Figure 12). Il a été montré que LplA catalyse en 2 étapes une réaction impliquant de l'ATP. Dans la première étape, l'ATP est utilisée pour activer le lipoate libre vers du lipoyl-AMP. Le carbonyle activé du lipoyl-AMP réagit avec le résidu lysine conservé de l'apoprotéine pour former une liaison lipoamide et libérer l'AMP (Figure 12). Il est à noter que LplA est capable de réaliser la première étape de la voie de lipoylation endogène comme LipB (Morris *et al.*, 1995). De plus contrairement à LipB, LplA peut utiliser l'octanoate comme substrat.

D'autres modèles de lipoylation ont pu être décrit à partir d'autre espèces : notamment *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Plasmodium falciparum* et *Homo sapiens*.

Bacillus subtilis

Bacillus subtilis est une bactérie à Gram positive qui a besoin de 4 protéines (LipM, LipL, LipA et LplJ) pour lipoyler les enzymes cibles que sont la pyruvate dehydrogenase, l'oxoglutarate dehydrogenase, la cetoacide à chaîne ramifiée dehydrogenase, l'acétoine dehydrogenase et le système de clivage de la glycine (Rasetto *et al.*, 2019). Contrairement à *E. coli*, le lipoate n'est pas directement synthétisé sur toutes les apoenzymes. La synthèse est tout d'abord initiée sur la protéine H de GCV avant d'être poursuivie sur les autres enzymes. Dans ce modèle, LipM est la première à intervenir. Tout comme LipB, c'est une octanoyl-transférase qui catalyse le transfert d'un noyau octanoyl à partir de l'octanoyl-ACP (Figure 13). Par la suite, l'amido-transférase LipL transfère le noyau octanoyl greffé sur la sous unité H vers les sous unités E2 des apoenzymes. Finalement, comme *E. coli*, la lipoate synthase LipA intervient (Figure 13). Concernant la voie de récupération exogène du lipoate, elle implique la lipoate ligase LplJ qui, comme LplA, catalyse la réaction de

transfert de lipoate en deux étapes. Mais, contrairement à ce qui a été décrit que chez *E. coli*, cette lipoate ligase requière une protéine supplémentaire, LipL (Figure 13). La fonction exacte de LipL dans la voie exogène n'est pas encore connue. Différentes hypothèses ont été émises, notamment que LipL par son activité amido-transférase permettrait le dernier transfert du groupement lipoyl sur les sous-unités E2 (Rasetto *et al.*, 2019).

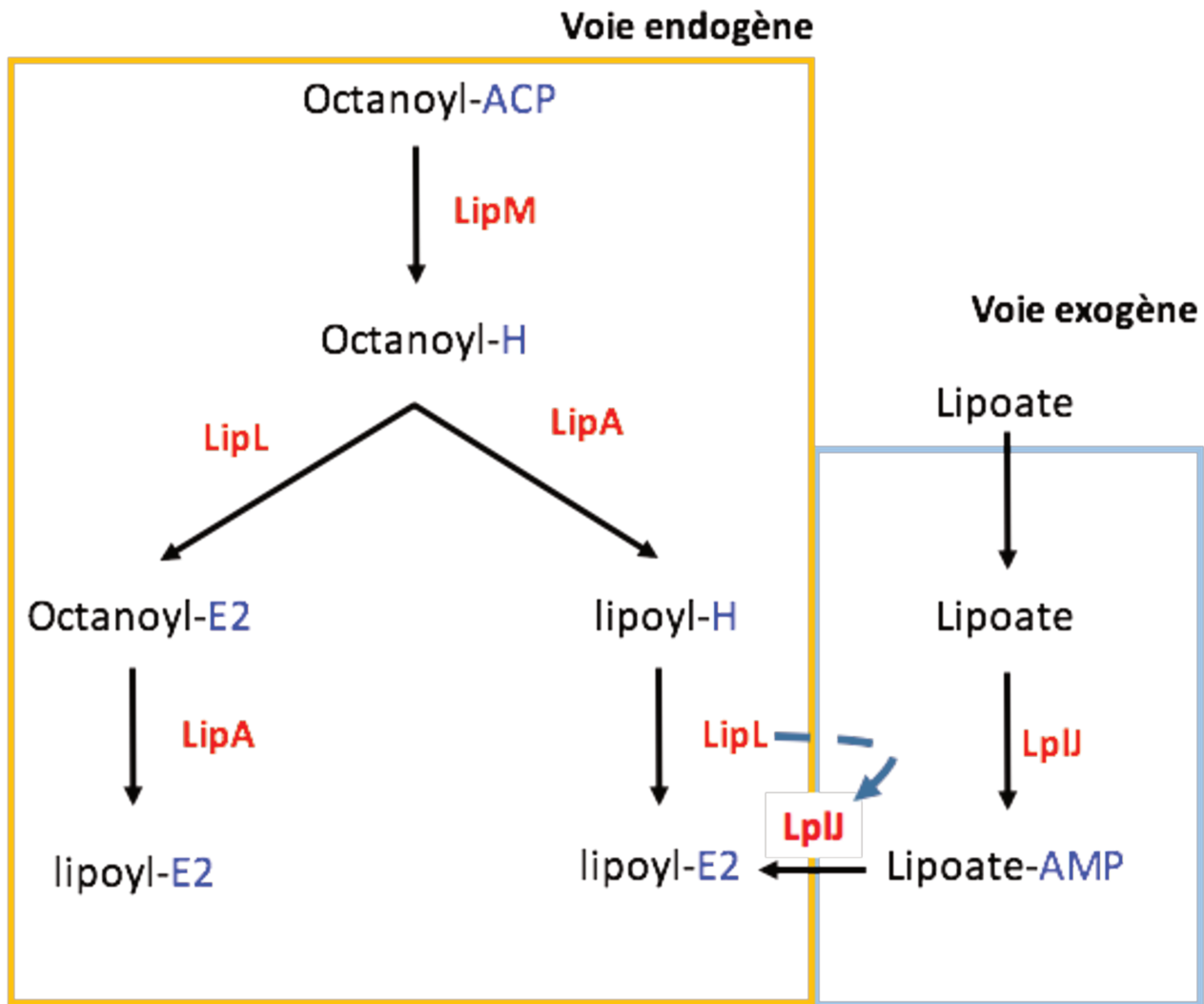


Figure 13 : Les mécanismes de lipoylation chez *B. subtilis*. Description des voies de lipoylation endogène et exogène. LipM, LipL et LipA permettent la lipoylation endogène des enzymes. Alors que LplJ permet la lipoylation exogène.

Saccharomyces cerevisiae

S. cerevisiae ne lipoyle ses enzymes que par biosynthèse. Cette dernière implique les enzymes Lip2, Lip5, Lip3 (étant les homologues de LipB, LipA et LplA de *E. coli*) ainsi que de Gcv3 (l'homologue de GcvH chez *E. coli*) (Schonauer *et al.*, 2009). Comme LipB chez *E. coli*, Lip2 est responsable du transfert du noyau octanoyl-ACP. En revanche, ce transfert ne se fait que sur Gcv 3

(homologue de GcvH) (Figure 14). Ensuite, Lip3 transfère, grâce à sa fonction amino-transférase, l'octanoate sur les enzymes cibles depuis Gcv3. Enfin, Lip5 termine la synthèse du lipoate comme LipA chez *E. coli* (Figure 14). Un autre modèle de lipoylation a été proposé. Il est fondé sur l'observation que Lip3 possède une fonction octanoyl-CoA:protéine transférase en plus de son activité amino-transférase (Schonauer *et al.*, 2009). Dans ce modèle, de l'octanoyl-ACP s'accumule lorsque toutes les enzymes Gcv sont lipoylées. Cette accumulation permet alors le transfert par l'Acyl-ACP:CoA transférase du noyau octanoyl de l'ACP vers le CoA. L'octanoyl-CoA ainsi formé est alors transféré aux sous-unités des enzymes grâce à Lip3. Lip5 peut alors ajouter les deux atomes de soufre sur les noyaux octanoïques pour produire le lipoate (Figure 14).

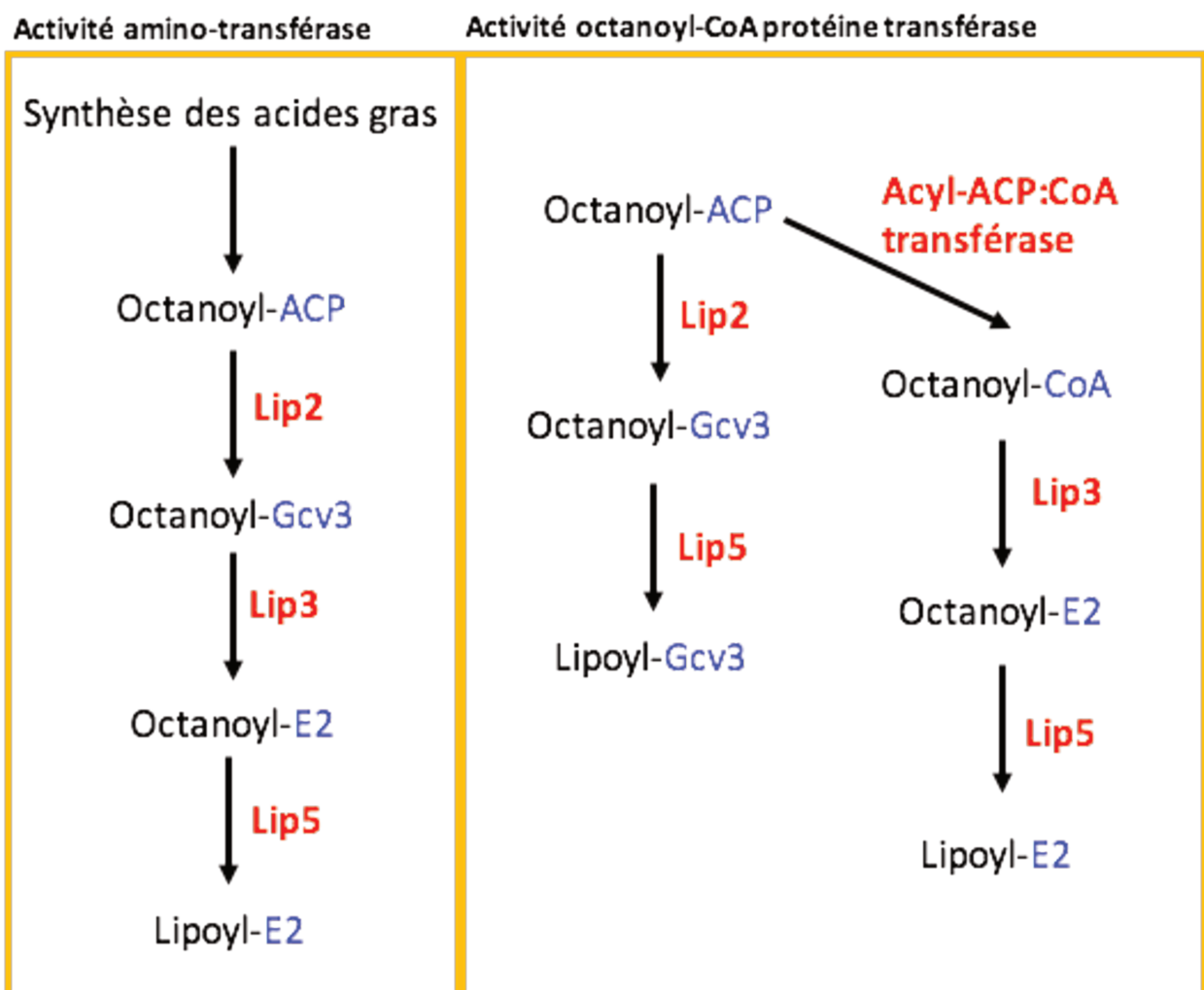


Figure 14 : Les mécanismes de lipoylation chez *Saccharomyces cerevisiae*. Description de la voie endogène de lipoylation avec les protéines Lip2, Lip3, Lip5. Selon l'activité amidotransférase ou octanoyl-CoA protéine transférase de Lip3.

Plasmodium falciparum

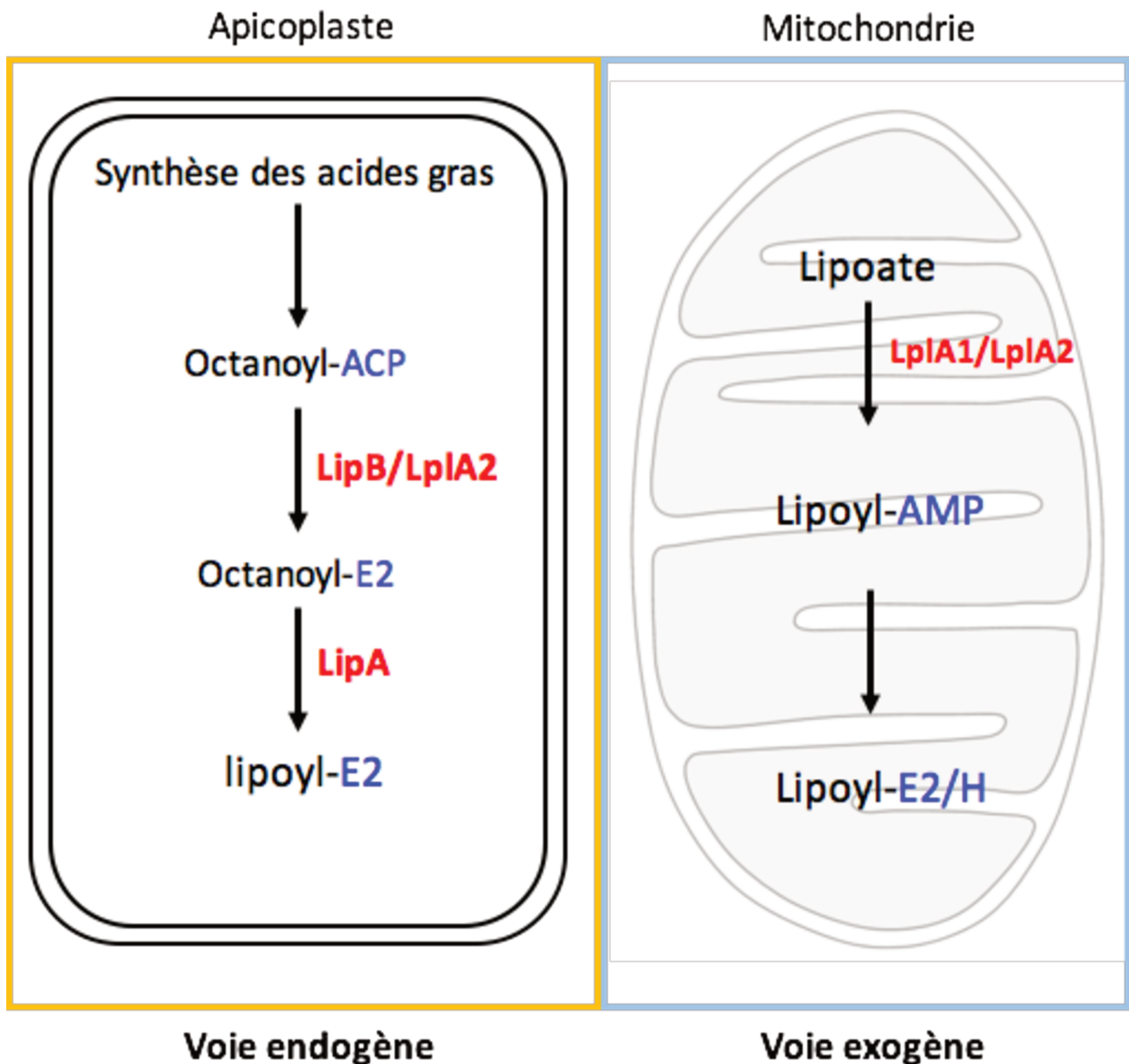


Figure 15 : Les mécanismes de lipoylation chez *Plasmodium falciparum*. Descriptions des voies endogène (apicoplaste) et exogène (mitochondries) de lipoylation. LipB, LpIA2 et LipA sont impliquées dans la voie endogène alors que LpIA1 et LpIA2 sont impliquées dans la voie exogène.

Chez *Plasmodium falciparum*, les deux voies de lipoylation sont présentes, mais localisées dans des compartiments différents. La voie endogène dont le mécanisme est identique à *E. coli* (mais n'agit que sur PDH) est réalisée dans les apicoplastes alors que la voie exogène est menée dans les mitochondries (Figure 15). La mitochondrie est essentielle pour la biosynthèse des pyrimidines et fournit des précurseurs de l'hème mais c'est aussi un élément clé de la synthèse des acides gras de type II. Alors que les apicoplastes permettent la synthèse d'isoprénolide de la voie non mevalonate, rendant ces organelles essentielles pour la survie du parasite.

La voie exogène est composée de deux protéines ligases (LplA1 et LplA2) (Figure 15). Cependant LplA1 peut aussi être présente dans les apicoplastes et possède une activité octanoate ligase comme LipB (Cronan, 2016).

Homo sapiens

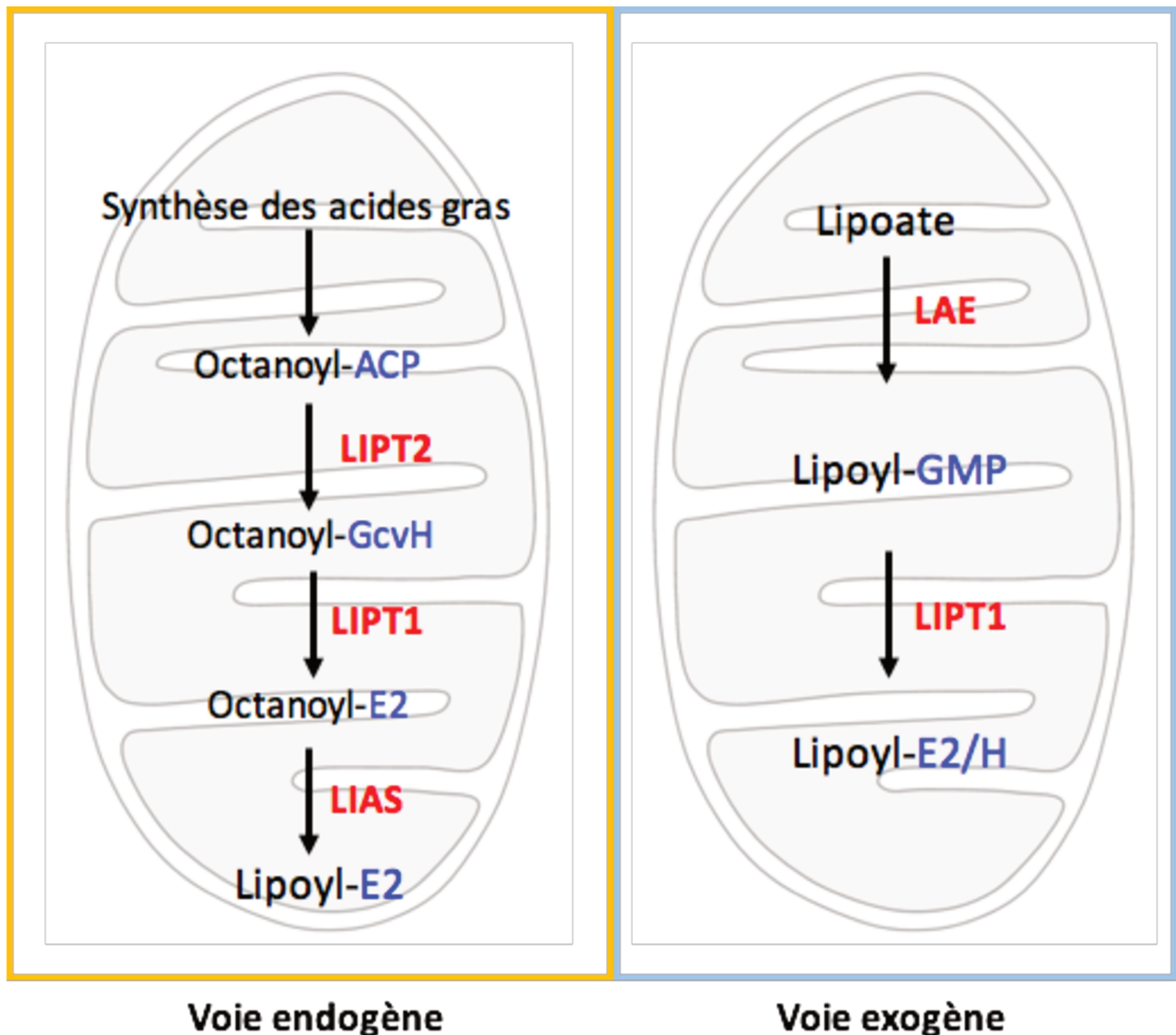


Figure 16 : Les mécanismes de lipoylation chez *Homo sapiens*. Description de la voie endogène de lipoylation avec les protéines LIPT2, LIPT1 et LIAS. Alors que la voie exogène implique les protéines LAE et LIPT1.

Chez l'Homme, la synthèse de lipoate n'a lieu que dans les mitochondries. Comme LipB de *E. coli*, LIPT2 est responsable du transfert du noyau octanoyl-ACP en revanche ce transfert ne se fait que sur la protéine H de la GCV (Soreze *et al.*, 2013 ; Mayr *et al.*, 2014). LIPT1 fixe alors ce noyau octanoyl sur la sous-unité E2. Les atomes de soufre sont ensuite fixés sur le noyau par la protéine

LIAS comme pour LipA (Figure 16) (Mayr *et al.*, 2014). Concernant la voie de lipoylation exogène, le lipoate est activé après une liaison à du GTP par une protéine activatrice de lipoate (LAE ou LIPT1), enfin le lipoate activé peut être lié aux sous-unité E2 des enzymes cibles (Fujiwara, 2001 (Figure 16).

En plus du rôle dans le métabolisme, le lipoate et le dihydrolipoate ont des importantes fonctions dans le métabolisme redox. Le lipoate est unique dans sa fonction anti-oxydante en étant actif sous sa forme réduite (dihydrolipoate) (Figure 11) et oxydée (lipoate). Le lipoate et le dihydrolipoate forment un couple redox qui rend inactif des radicaux libres tels que les radicaux hydroxyle, peroxyde, superoxide, et les espèces singulets d'oxygènes (Spalding et Prigge, 2010).

Les réactions de la lipoylation

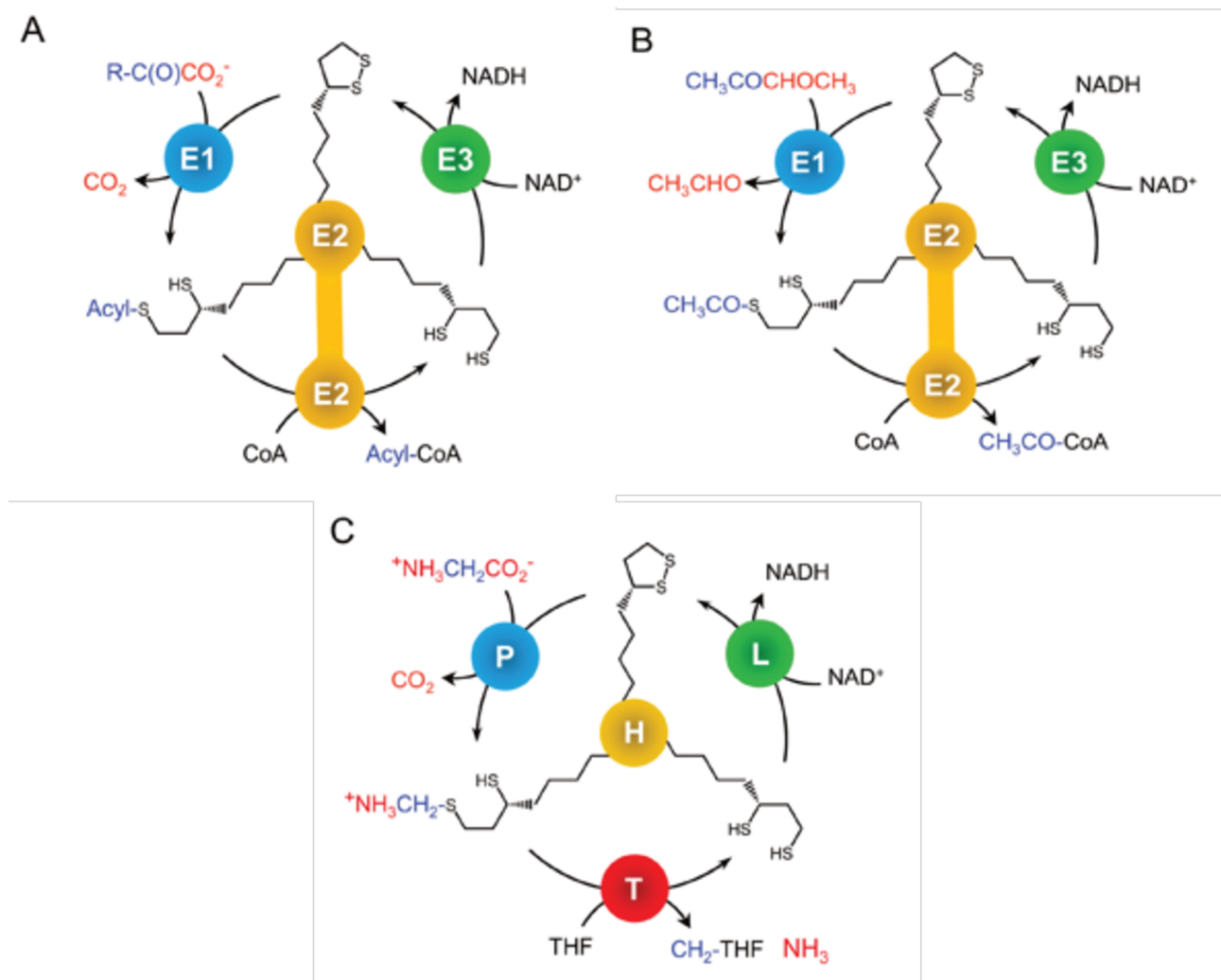


Figure 17 : Réactions de lipoylation des complexes. (A) Complexes cétoacide déhydrogénase (pour les enzymes pyruvate déhydrogénase, oxoglutarate déhydrogénase et branched-chain 2-oxoacid déhydrogénase. (B) Acétoine déhydrogénase. (C) Système de clivage de la glycine. (Spalding et Prigge, 2010)

Dans les cinq complexes lipoylés, le lipoate agit comme électrophile qui se lie à des intermédiaires à travers des liaisons thioester ou thioether et comme bras oscillant qui canalise la liaison avec le substrat et entre les différents sites actifs des sous-unités (Spalding et Prigge, 2010).

Cétoacide déshydrogénase

Les enzymes pyruvate déshydrogénase, l'oxoglutarate déshydrogénase et branched-chain 2-oxoacid déshydrogénase sont regroupés sous le terme générique de complexe alpha cétoacide déshydrogénase. Ces 3 enzymes catalysent la décarboxylation des cétoacides pour produire des acyl coenzyme A, du NADH et du CO₂ par des mécanismes similaires (Figure 17A).

La réaction pour produire du acyl-CoA commence par une décarboxylation du substrat (un cétoacide) par la sous unité E1 dépendante de thiamine pyrophosphate (TPP). Le carbone acide du TPP attaque le carbone 2 du substrat, formant un intermédiaire acyl-TPP. Le groupe acyl est ensuite transféré au cofacteur lipoylé sur la sous unité E2. Cette dernière possède, en plus d'héberger le domaine lipoylé, une activité catalytique transférant le groupe acyle sur la coenzyme A. Finalement pour régénérer la forme électrophile du lipoamide (forme fonctionnelle du lipoate) du cofacteur, la sous unité E3 appelée dihydrolipoyl dehydrogenase oxyde le dihydrolipoamide vers le lipoamide en utilisant du NAD (Perham, 1991) (Figure 17A). La sous unité E3 est souvent partagée entre les différents complexes protéiques nécessitant le lipoate comme co-facteur contrairement aux sous unités E2 et E1. Par exemple, la sous unité E3 (*lpdA*) chez *Y. pestis*, comme chez *E. coli*, est partagée entre la PDH et l'OGDH (Spencer et Guest, 1985).

L'acétoine déshydrogénase

L'acétoine déshydrogénase, fortement homologue à la pyruvate déshydrogénase, catalyse sa réaction selon les mêmes mécanismes que ceux précédemment décrits (Xiao et Xu, 2007). Néanmoins, la formation d'acyl-CoA de l'acétoine (3-hydroxy-2-butanone) plutôt que le cétoacide. Dans ce cas de figure, le TPP lié à la sous unité E1 attaque le carbone de l'acétoine ce qui conduit à la libération d'acétaldéhyde et l'acétylation du lipoamide (Figure 17B). La sous-unité E2 transfère alors le groupement acétyl au CoA, et le lipoamide est régénéré par la sous unité E3. Cette réaction enzymatique conduit à la libération d'acétaldéhyde plutôt que de CO₂ et produit de l'acétyl-CoA (Figure 17B).

Le système de clivage de la glycine

Le système de clivage de la glycine catalyse la décarboxylation réversible de la glycine pour produire du CO₂, du NADH, de l'ammoniaque et un groupement méthylène lié au tétrahydrofolate (THF), et ceci pour former un donneur de carbone, le 5,10-CH₂-THF. Les sous unités de la GCV sont composées de la protéine P (pyridoxal protéine contenant du phosphate), la protéine H (protéine porteuse d'hydrogène), la protéine T (protéine contenant du tétrahydrofolate) et la protéine L (lipoamide déhydrogénase), le lipoate étant lié de manière covalente à la protéine H (Figure 17C) (Douce *et al.*, 2001). La protéine P est l'analogue de la sous unité E1 des complexes cétoaldéhyde déhydrogénase et elle catalyse la décarboxylation de la glycine. Cette réaction ne dépend pas du TPP mais du cofacteur pyridoxal phosphate. Après la décarboxylation oxydative de la glycine par la protéine P, le méthylèneamine est attaché de manière covalente au dihydrolipoamide sur la protéine H. Contrairement aux sous unités E2, la protéine H n'a pas d'activité catalytique mais agit comme une protéine d'échafaudage pour diminuer l'instabilité de l'intermédiaire pendant le transfert vers la protéine T (Guilhaudis *et al.*, 1999). Celle-ci catalyse la libération d'ammoniaque à partir du méthyleamine et le transfert du groupement méthylène vers le THF, formant du 5,10-CH₂-THF (Figure 17C). Enfin, la protéine L, qui est l'analogue le sous unité E3, catalyse l'oxydation à 2 électrons du dihydrolipoamide pour régénérer le lipoamide et convertir le NAD en NADH (Cronan *et al.*, 2005) (Figure 17C).

La fonction des enzymes lipoylées

La pyruvate dehydrogenase (PDH)

La PDH catalyse la décarboxylation oxydative du pyruvate pour former l'acétyl coenzyme A (acétyl-CoA), essentielle à de nombreuses réactions métaboliques clés comme celles du cycle de Krebs (Figure 18), de la synthèse des acides gras, des voies d'élongation des acides gras et de la voie mévalonate de la biosynthèse des isoprénoïdes. Chez *E. coli*, la PDH est active pendant une croissance en milieu aérobique ou en excès de pyruvate. En revanche, elle est réprimée pendant la fermentation (Spalding et Prigge, 2010). Sa perte peut être suppléée par l'ajout d'acétate dans le milieu de croissance (Vise et Lascelles, 1967). Enfin, il faut noter que la PDH est une enzyme allostérique inhibée par ses produits (NADH, acétyl-CoA) et un ratio ATP/ADP élevée (Cronan, 2005).

L'oxoglutarate déshydrogénase (OGDH)

L'OGDH convertit le cétooglutarate en succinyl-CoA en réalisant une réaction semblable à la PDH. Le succinyl-CoA est consommé par la succinyl-CoA synthétase du cycle de Krebs (Figure 18), voire utilisé pour la synthèse d'acides aminés tels que la méthionine et la lysine. Ainsi, son absence implique l'ajout de succinate ou de la lysine et de la méthionine pour que la bactérie puisse se répliquer (Herbert et Guest, 1968). L'OGDH est activée par des intermédiaires métaboliques comme un ratio AMP/ATP élevée (Mooney *et al.*, 2002). Chez *E. coli* l'expression de l'OGDH est augmentée pendant la croissance aérobie et réprimée pendant la fermentation (Spalding et Prigge, 2010).

La cétoacide à chaîne ramifié déshydrogénase (BCDH)

La BCDH participe à la dégradation des chaînes ramifiées d'acides aminés (valine, leucine et isoleucine) pour générer des molécules de CoA à chaînes ramifiées qui peuvent être converties par la suite en intermédiaires du cycle de Krebs ou utilisées pour la synthèse d'acides gras. Pendant cette dégradation, les acides aminés sont désaminés pour donner leurs cétoacides correspondant par l'amino-transaminase à chaînes ramifiées (BCAT). Ces produits sont alors utilisés comme substrats pour la BCDH et sont décarboxylés et conjugués au CoA pour générer du 3-méthyl-butanoyl-CoA, du isobutyryl-CoA et du 2-méthyl-butanoyl-CoA. Chez de nombreuses bactéries à Gram positif, les courtes molécules produites par le BCDH sont principalement utilisées pour générer des acides gras à chaînes ramifiées qui peuvent jouer un rôle dans l'adaptation à la température en modulant la fluidité des membranes (Suutari et Laakso, 1994 ; Zhang et Rock, 2008). Chez les procaryotes, la BCDH peut être induite par l'accumulation des cétoacides à chaînes ramifiées (Marvin *et al.*, 2001).

L'acétoine déshydrogénase (AoDH)

L'AoDH est fortement ressemblante au complexe alpha cétoacide déshydrogénase, et aurait un ancêtre commun avec la PDH (Kruger *et al.*, 1994). Elle est utilisée par de nombreuses bactéries dépourvu de la PDH (des firmicutes aux protéobactéries) pour réaliser la conversion du pyruvate en acétyl-CoA (Spalding et Prigge, 2010). Chez ces bactéries, le substrat de l'enzyme, l'acétoine (3-hydroxy-2-butanone), est formée à partir du pyruvate dans une réaction en deux étapes (Renna *et al.*, 1993).

Le système de clivage de la glycine (GCV)

GCV catalyse la décarboxylation réversible de la glycine pour générer du NADH, du CO₂, du NH₃, et 5,10-CH₂-THF qui sont requis pour la biosynthèse de certains acides aminés et nucléotides (Douce *et al.*, 2001). La GCV chez certains organismes permet l'utilisation de la glycine comme source de carbone et de nitrogène. Quand la GCV favorise la biosynthèse de glycine, cette dernière peut être utilisée pour la traduction protéique, tout comme comme substrat de l'acide aminolevulinique synthase afin de synthétiser de l'hème (Heinemann *et al.*, 2008). L'expression de GCV chez *E. coli* est régulée par un mécanisme complexe qui nécessite une activation par la glycine et est réprimée par des produits de la purine (Staufer et Staufer, 2005).

Il est à souligner que toutes les enzymes lipoylées ne sont pas nécessairement présentes chez tous les organismes. Par exemple, les Gammaprotéobactéries, dont fait partie *Y. pestis*, ne produisent que la PDH, l'OGDH et la GCV (Spalding et Prigge, 2010).

Bien qu'elle ait été mise en évidence dans la pathogénèse de nombreuse maladie, l'implication de la lipoylation et de ces enzymes cibles dans l'infection par *Y. pestis* de la puce n'est pas définie. De plus, les connaissances sur le métabolisme et autres mécanismes moléculaires utilisés par *Y. pestis* pour infecter la puce sont incomplètes. Bien que de valeur, les conclusions de l'étude transcriptomique réalisée pour comparer le transcriptome de bactérie dans le tube digestif de la puce à celle de bactérie cultivée *in vitro* (Vadyvallo *et al.*, 2010), restent à vérifier ; elles ne donnent que des indices sur les rôles biologiques présumés des gènes surexprimés *in vivo* qui doivent être confirmés par des approches expérimentales traditionnelles. Ainsi, il faudrait construire et cribler une banque de mutants (chacun dépourvus d'un des loci surexprimés *in vivo*) dans le modèle de la puce afin de recenser les gènes vraiment requis dans l'infection de l'insecte. Mais, un tel criblage serait très fastidieux, couteux et long à mettre en place avec la méthodologie actuelle. En effet, l'étude du blocage de la puce implique l'observation sous loupe binoculaire d'une cohorte d'au moins 100 puces deux fois par semaine sur une période de 4 semaines. A cela s'ajoute la nécessité d'étaler individuellement le broyat de 20 puces sur gélose pour vérifier les charges bactériennes ingérées. Par ailleurs, l'étude de la colonisation du tube digestif impose aussi l'étalement, au minimum, de 40 broyats de puces supplémentaires (puces collectées à 1 et 4 semaines post-infection). De plus, les expériences sont dépendantes du bon vouloir de l'insecte à prendre un repas

sanguin satisfaisant pour pouvoir analyser et comparer les résultats obtenus. Enfin, soulignons qu'au temps requis s'ajoute un coût relativement élevé (consommables). La méthodologie actuelle ne permet donc pas de réaliser des études à hauts débits, et donc ne pourrait être utilisée pour le criblage dans le modèle puce de la banque de mutants de *Y. pestis* dépourvu des 172 loci surexprimés *in vivo*. Dès lors, il apparaît impératif de développer une nouvelle approche, et si possible peu onéreuse pour comprendre rapidement les mécanismes de transmission de la peste par les puces.

Une méthodologie fondée sur l'utilisation de rapporteurs biologiques produisant un signal facilement détectable, voire mesurable, apparaît opportune pour élucider les mécanismes impliqués dans la production d'une infection transmissible de *Y. pestis* par les puces. Parmi les rapporteurs biologiques, les protéines fluorescentes et les luciférases, qui émettent de la lumière respectivement après excitation par un laser ou en présence de substrat, sont d'intérêt. En effet, toutes deux permettent de suivre et de quantifier les bactéries tout au long du processus infectieux se déroulant dans un seul animal, réduisant le nombre d'animaux à utiliser et permettant de s'affranchir de dénombrement bactérien (Leevy *et al.*, 2007). Cependant, des travaux menés au laboratoire montrent que l'auto-fluorescence de la puce sur un très large spectre et (surtout) l'énergie dégagée par les microscopes à fluorescence, qui cuit l'insecte, rendent caduque l'utilisation de protéines fluorescentes comme rapporteur biologique (données non publiées). Les luciférases apparaissent donc comme l'alternative aux protéines fluorescentes pour étudier l'infection de la puce par *Y. pestis*.

La bioluminescence

La bioluminescence dans le règne animal.

La bioluminescence est un phénomène naturel d'émission de lumière qui résulte d'une réaction d'oxydation catalysée par la luciférase. La bioluminescence est présente dans presque tous les royaumes du vivant, en passant par les bactéries, les protistes, les calmars, les poissons... La capacité d'émettre de la lumière a été observée chez 10 000 espèces terrestres ou aquatiques appartenant à 800 genres différents (Haddock *et al.*, 2010). Dans la majorité des cas, la lumière est produite par l'organisme lui-même et non par un symbiote. Au vu de la grande diversité, la gamme spectrale d'émission de lumière pour les organismes bioluminescents s'étend de 400 à 700nm, donc

des lumières allant du bleu au rouge (Brodli *et al.*, 2018). La bioluminescence possède de nombreuses fonctions biologiques qui peuvent être la défense, le camouflage, l'attraction de proie et de communication intra-spécifique.



Figure 19 : Exemple de défense de la crevette éjectant un nuage bioluminescent devant un prédateur (Phil Hart).

Dans le cas de la défense, un flash lumineux émis à courte distance peut surprendre les prédateurs, conduisant à hésiter d'attaquer, voire leur fuite. Le flash peut aussi empêcher le prédateur de suivre la fuite de l'animal bioluminescent en formant comme un écran entre eux (Brodli *et al.*, 2018). (Figure 19).

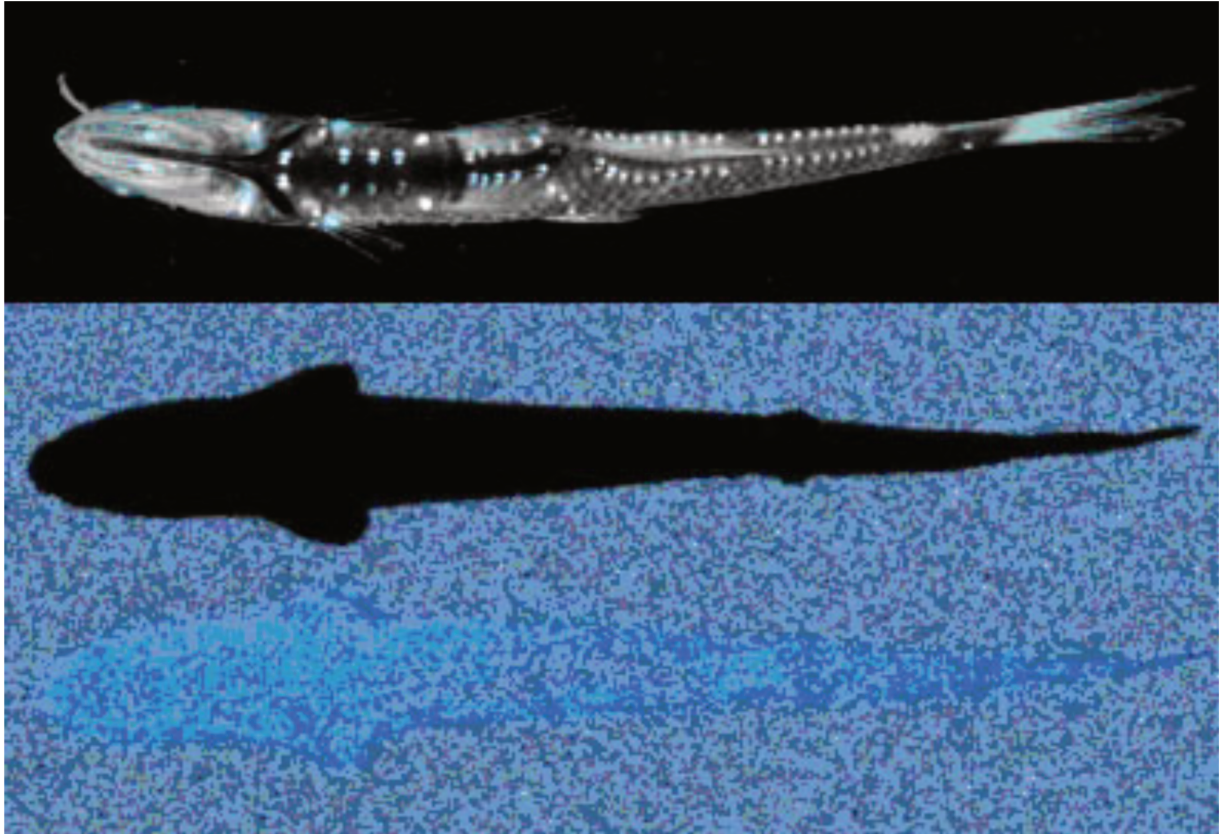


Figure 20 : Exemple de contre-illumination du squatelet féroce (un requin). Partie du haut : vue du poisson sur la partie ventrale. Partie du milieu : représentation schématique de la vue d'en dessous (vu par un prédateur). Partie du bas : représentation de la vue d'en dessous grâce à la production de bioluminescence. Le requin produit de la bioluminescence pour faire correspondre la luminosité qui provient du soleil à la sienne.

Dans le cas du camouflage, la forme la plus étudiée est le « contre-éclairage ». Cette forme de camouflage utilise des photophores ventraux pour faire correspondre la luminosité de l'abdomen de l'animal à la faible lumière provenant de la surface, faisant ainsi disparaître une ombre potentielle. (Haddock *et al.*, 2010). En effet, les prédateurs marins possèdent le plus souvent des yeux dirigés vers le haut et ce mécanisme de camouflage permet de rester inaperçu (Haddock *et al.*, 2010). (Figure 20).

Dans le cas de l'attraction, la lumière émise est utilisée pour former un appât attirant des proies ; la lumière émise pouvant servir à étourdir ou confondre la proie (Haddock *et al.*, 2010). Un exemple connu est celle de la baudroie qui agit « une lanterne » lumineuse pour attirer sa proie (Figure 21). Enfin, dans le cas de communication intra-spécifique, la bioluminescence jouerait également un rôle direct dans la communication. C'est notamment le cas de *Vibrio fischeri* qui utilise la



Figure 21: Exemple de prédation de la baudroie.

bioluminescence dans le mécanisme de quorum sensing (Dunlap, 2009). Mais, ce genre de communication est aussi bien décrit sur les milieux terrestres pour attirer des partenaires à des visées de reproduction comme cela est le cas des lucioles (Figure 22). Fait intéressant, différents patrons lumineux constitueraient un code qui permettrait aux individus de communiquer entre eux notamment pour la reproduction.



Figure 22: Exemple de la communication intra-spécifique de la luciole.

La bioluminescence chez les bactéries

Chez les bactéries l'émission de lumière est fondée sur un système à deux parties comprenant une enzyme (la luciférase) qui catalyse la réaction de bioluminescence, et une petite molécule qui émet la lumière pendant la réaction (appelé la luciférine). La bioluminescence chez les bactéries est présente dans 6 genres différents, *Aliivibrio*, *Vibrio*, *Shewanella*, *Photobacterium*, *Alteromonas* et *Photorhabdus*, dans 25 espèces. (Dunlap, 2014).



Figure 23 : Exemple de gènes codant la bioluminescence pour différentes bactéries. Les séquences et l'ordre des gènes des bactéries les plus divergentes (*Vibrio harveyi*, *Aliivibrio fischeri*, *Photobacterium mandapamensis*, *Photobacterium leiognathi* et *Photorhabdus luminescens*) ont été choisies pour représenter la diversité. La flèche au-dessus de luxR indique que le cadre ouvert de lecture est dans la direction opposée. (Brodl, 2018)

Toutes les bactéries bioluminescentes possèdent les mêmes gènes codant l'émission de lumière. Ils sont organisés en opéron dont l'ordre est conservé dans de nombreuses souches bactériennes (Figure 23). Le noyau est constitué des gènes *luxCDABE* où *luxA* et *luxB* codent les sous-unités alpha et bêta de la luciférase bactérienne et les autres gènes les enzymes synthétisant le substrat de la luciférase. Plus particulièrement, LuxA serait impliquée dans le site actif de la réaction alors que LuxB serait requise pour maintenir la conformation de la sous unité catalytique LuxA (Dunlap, 2009). Quant à *luxC*, *luxD* et *luxE*, ils codent les polypeptides r, s et t du complexe reductase des acides gras qui synthétise et recycle un des substrats de la luciférase, un aldéhyde à chaîne aliphatique de 8 à 14 atomes de carbone (Dunlap, 2014). Il est à noter que l'autre substrat de la réaction, la flavine mononucleotide réduite (FMNH₂) est synthétisée par la riboflavine kinase, une enzyme non spécifique des bactéries bioluminescentes. D'autres gènes en plus de ce noyau peuvent être présents chez certaines espèces bactériennes au sein du noyau (cas de *luxF*, *ribEHA*, *luxG* et *luxI*) ou ou même sur un opéron séparé (cas de *luxR*). LuxF possède des fonctions et une influence sur la bioluminescence encore incertaine. LuxF se lierait à un dérivé de flavine ce qui permettrait d'augmenter l'intensité de lumière émise par la bactérie (Brodl, 2020). Les gènes *ribEBHA* sont impliqués dans la biosynthèse de la riboflavine. En particulier, *ribE* code une riboflavine synthétase. Le gène *ribB* quant à lui code une 4-dihydroxyl-2-butanone 4-phosphate (DHBP) synthétase, alors

que *ribH* une lumazine synthétase et *ribA* une GTP cyclohydrolase II. L'ensemble de ces gènes permettent de former de la riboflavine à partir de lumazine (Sung et Lee, 2004). Le FMN va alors être utilisé par LuxG, une flavine reductase pour régénérer du FMNH₂.

La bioluminescence chez les bactéries peut être régulée en réponse à la densité cellulaire (par induction ou la répression de gène). Cela est appelé la régulation par quorum sensing. LuxI-LuxR sont impliqués dans cette régulation. LuxI est une protéine qui produit un auto-inducteur (la *N*-3-oxohexanoyl-L-homoserine (3-oxo-C6)), du 5'-methylthioadenosine et de l'apo-ACP à partir de S-adenosylmethionine (SAM) et une protéine porteuse d'hexanoyl-acyl (ACP). L'auto-inducteur produit diffuse à travers les membranes jusqu'à obtenir un équilibre de concentration entre l'extérieur et l'intérieur de la bactérie, ce phénomène permet la communication entre les cellules bactériennes. Le 3-oxo-C6 se lie et active alors le régulateur LuxR, ce qui induit la transcription de l'opéron *luxCDABE*. LuxR active aussi *luxI*, créant alors une boucle d'auto-induction qui amplifie la production de bioluminescence (Miyashiro et Ruby, 2012).

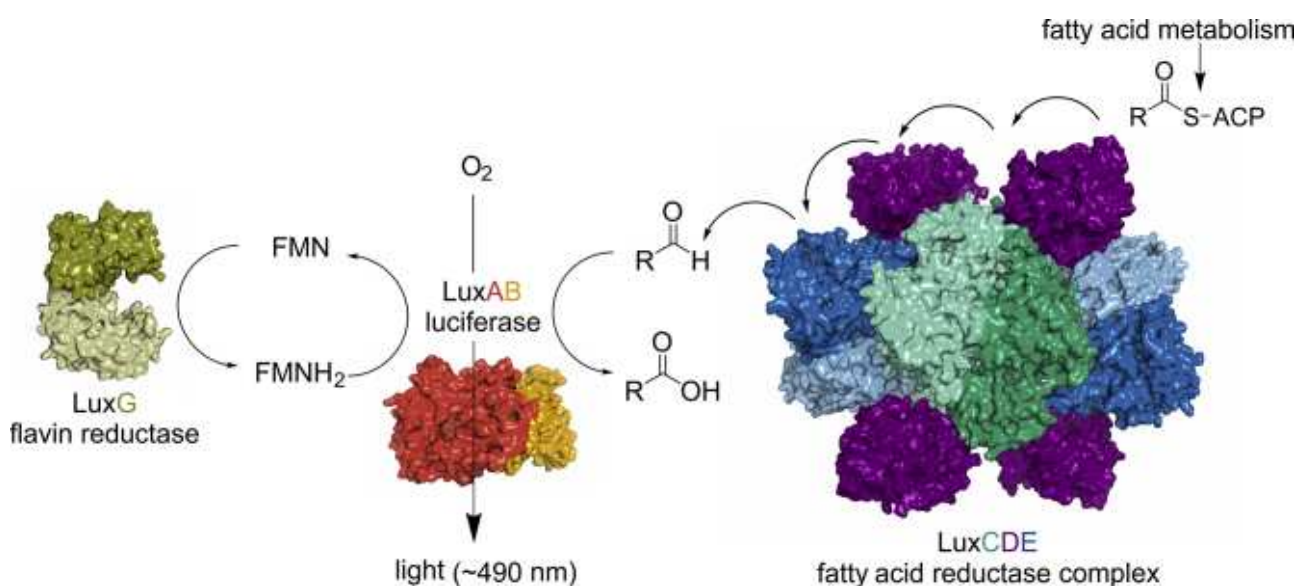
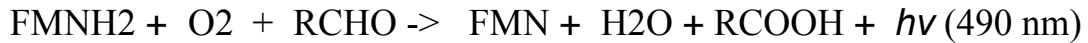


Figure 24 : Protéines nécessaires à l'émission de lumière chez les bactéries. La bioluminescence bactérienne est réalisée par la luciférase hétérodimérique (LuxA: rouge / luxB: orange), celle ci permet l'oxydation d'aldéhydes gras à longue chaîne en acide correspondant accompagné d'une émission de lumière. La FMN réduite requise est fournie par LuxG (partie gauche) et l'aldéhyde gras est synthétisé à travers le complexe multifonctionnel composé de LuxCDE (vert, violet et bleu à droite) (Brodl, 2018).

Mécanismes de bioluminescence

LuxAB catalyse l'oxydation du FMNH₂ et d'une longue chaîne d'acide gras aliphatique (RCHO) avec de l'oxygène en produisant une lumière bleu-vert. Le FMNH₂ est oxydé en FMN pendant en suivant la réaction suivante (Brodl, 2018) :



Pendant la réaction, la liaison au FMNH₂ par la luciférase est suivi d'une interaction avec de l'oxygène pour former de la flavine-4a-hydroperoxide. L'association de ce dernier avec un aldéhyde forme un intermédiaire très stable dont la décroissance lente conduit à l'oxydation du FMNH₂ et du substrat aldéhyde, l'émission de lumière et la production d'une molécule d'eau. La réaction est hautement spécifique pour le FMNH₂, et le substrat aldéhyde est probablement *in vivo* du tétradécanal (Ulitzur et Hastings, 1979). Le FMNH₂ est fourni par l'activité de la flavine réductase (NADH:FMN oxydo-réductase) qui se sert du NADH généré par le métabolisme cellulaire comme la glycolyse ou le cycle de Krebs. Le transfert réducteur du FMNH₂ vers la luciférase se produit par diffusion libre. La synthèse de l'aldéhyde à longue chaîne est catalysée par les 3 polypeptides du complexe réductase des acides gras. Le polypeptide r étant une protéine acyl réductase NADPH dépendant (54 kDa), le polypeptide t une acyl transférase (33 kDa) et le polypeptide s une synthétase dépendant d'ATP (42 kDa). Son activité est essentielle pour la production de lumière en absence d'ajout d'aldéhyde exogène (Dunlap, 2014).

La bioluminescence est apparue comme pouvant être utilisée comme bio-rapporteur car le signal lumineux émit par ces rapporteurs est facilement détectable et mesurable. Par conséquent, elle est utilisée pour étudier de nombreux domaines comme en santé environnementale, étudier la contamination de nourriture et des processus biologiques dont les interactions hôtes/pathogènes au sein de l'hôte.

Les limites et avantages de l'utilisation de la bioluminescence

La bioluminescence possède de nombreux avantages. En effet, les tests et l'obtention des résultats sont souvent plus rapide que bien d'autres méthodologies utilisées actuellement. Ce gain de temps s'accompagne souvent d'un coup moins élevé pour les expérimentations à effectuer. La méthodologie utilisée est plus simple et ne requiert pas d'apprentissage et de connaissances particulières. L'utilisation de la bioluminescence est une méthodologie sensible qui permet la

détection de très peu de cellules en utilisant un appareil de mesure de la luminescence. De plus dans des conditions *in vivo* cette technique est non invasive. Ainsi, aucune lyse cellulaire ou euthanasie ne sont requises pour effectuer les mesures ce qui permet de répondre plus facilement aux objectifs de la règle des 3 R (Russell et Burch, 1959) : en particulier concernant la réduction et le raffinement des mesures.

Cependant, l'utilisation de la bioluminescence présente quelques désavantages. L'utilisation de la bioluminescence nécessite l'ajout des substrats par l'expérimentateur avant la mesure de l'émission de lumière. Ce qui conduit à l'extinction de la lumière émise lorsque tous les substrats ont été consommés, ce qui peut nuire aux mesures. En effet, pour produire la bioluminescence, il faut la présence des substrats en quantité suffisante, ce qui représente un facteur limitant concernant la durée de l'acquisition des données.

Mais, des méthodes permettent de pallier à ces problèmes. En effet, il est possible d'utiliser tout l'opéron *luxCDABE*, réalisant la synthèse de bioluminescence mais aussi de tous les substrats de la réaction permettant ainsi de s'affranchir des limites imposées par la quantité de substrat présente, ou à ajouter pour réaliser l'expérience. Même s'il est possible de s'affranchir de la limitation du substrat, certains composés présents dans les échantillons peuvent absorber la quantité de lumière émise ou inversement des substances luminescentes provoquent l'augmentation de l'intensité de lumière mesurée. De plus chez les mycobactéries, il a été montré que le produit de *luxD* pouvait être toxique pour ces espèces, ce qui limite l'utilisation de l'opéron *luxCDABE* dans ce modèle (Andreu *et al.*, 2010). Tout cela montre que la bioluminescence ne peut être utilisée chez toutes les espèces, et que les effets néfastes d'un rapporteur bioluminescent doivent être évalués avant de mener toutes mesures.

Utilisation de la bioluminescence chez *Y. pestis*

Les techniques conventionnelles d'étude de *Y. pestis in vitro* et *in vivo* (puce et souris) sont complexes et ne permettent pas la mise en place de méthode à haut débit. C'est pourquoi l'utilisation de la bioluminescence s'est avérée potentiellement intéressante, surtout que des rapporteurs bioluminescents ont été utilisés chez *Y. pestis* (Nham, 2012 ; Zhou 2018; Derbise, 2019). En effet, des fusions transcriptionnelles de l'opéron *luxCDABE* avec des promoteurs constitutifs insérées en copie unique sur le chromosome de *Y. pestis* ont été développées. Cette

approche permet de s'affranchir du risque d'avoir un nombre de copie plasmidique différente dans les bactéries (et donc une émission de lumière différente) mais aussi d'éliminer le risque de perte de ces plasmides en condition *in vivo*. De plus, il est à souligner que le besoin constant de substrat (FMNH₂), d'aldéhyde et d'oxygène pour produire la lumière, ne permet qu'aux bactéries vivantes d'être bioluminescentes. Parmi les promoteurs testés pour contrôler l'opéron *luxCDABE*, celui de l'opéron *cysZK* a permis de produire un rapporteur pour lequel une très bonne corrélation existe entre la charge bactérienne et la quantité de lumière émise. Par ailleurs, ce biorapporteur est très sensible car il permet de détecter au moins 100 et 1000 bactéries respectivement *in vitro* et *in vivo*. Ce rapporteur a permis de suivre la survie de *Y. pestis* dans différentes conditions *in vitro* (résistance à des inhibiteurs antimicrobiens, survie intracellulaire) ainsi que le suivi de l'infection chez les rongeurs.

Concernant la résistance à des inhibiteurs antimicrobiens, différentes molécules ont pu être testées comme, un désinfectant chimique (MicroChem-Plus), des antibiotiques comme la carbénicilline et la gentamicine mais encore des peptides antimicrobiens (Sun *et al.*, 2012). En plus de cela, la survie intracellulaire de *Y. pestis* dans les macrophages a pu être testée (Sun *et al.*, 2012). Ces tests ont clairement pu montrer que la survie de *Y. pestis* dans différentes conditions *in vitro* pouvait être suivi de manière simple et rapide, permettant alors le criblage de nombreux gènes ou nombreuses conditions en simultanée.

Pour la régulation génique, des tests ont été effectués sur différents promoteurs régulés par la température dans un contexte de croissance *in vitro* mais aussi dans le modèle murin (peste bubonique) (Derbise, 2019). Ces tests ont permis de quantifier l'expression génique en temps réels de la bactérie.

Enfin, la bioluminescence a aussi permis de suivre la dissémination *Y. pestis* dans le modèle murin pendant un épisode de peste bubonique après injection de bactérie (Nham, 2012 ; Zhou 2018). Pour cela une souche virulente de *Y. pestis* (CO92) a été transformée avec un plasmide à faible nombre de copie contenant l'opéron *luxCDABE*. Il a été montré que la virulence de la souche bioluminescente et de la souche non bioluminescente de *Y. pestis* était comparable. Permettant ainsi l'utilisation de la souche émettant de la lumière afin de suivre la dissémination de la bactérie pendant l'infection chez la puce. L'émission de lumière par *Y. pestis* a permis de délimiter les organes infectés, avec une bonne corrélation avec la charge bactérienne (dépend des organes

contaminés par la bactérie). Mais surtout de suivre la progression de *Y. pestis* au cours du processus infectieux sans avoir à euthanasier l'animal (Nham, 2012)

Objectifs

La peste reste une menace majeure (bioterrorisme, résistance aux antibiotiques...). Il apparaît donc nécessaire d'étudier les mécanismes de transmission de la peste pour endiguer au mieux la maladie en cas d'épidémie. Nos connaissances sur les mécanismes moléculaires qui conduisent à la transmission de la peste par les puces sont assez limitées. Il apparaît nécessaire de poursuivre l'étude de ces mécanismes. Il faudrait donc effectuer l'étude du rôle de chacun des gènes dans l'infection chez l'insecte et notamment réaliser le criblage de la banque des 172 mutants de gènes sur-exprimés dans la puce. Cependant, les études réalisées sur les puces sont fastidieuses, couteuses et longues. Ce projet propose donc de (1) mettre en place une méthodologie fondée sur la bioluminescence pour étudier l'infection des puces par *Y. pestis*, (2) utiliser la méthodologie développer pour cribler des banques de mutants afin de recenser des gènes de *Y. pestis* impliqués dans l'infection de la puce, et (3) d'étudier le rôle dans l'infection d'un ou plusieurs gènes sélectionnés par le criblage.

Dans cette étude nous avons pu mettre en évidence que 1) la bioluminescence permettait de suivre l'infection au cours du temps 2) la corrélation UFC/URL est plutôt bonne juste après l'infection et devient faible aux jours suivants ne permettant pas de dénombrer les bactéries à partir de la lumière émise par celles-ci 3) la bioluminescence ne permet d'identifier des puces bloquées. De plus la bioluminescence nous a permis de mettre en évidence l'implication potentiel de 12 nouveaux gènes dans l'infection de la puce, en particulier des gènes *y2878* et *y1173* (un gène impliqué dans la lipoylation). La lipoylation des enzymes métaboliques, par le biais de la biosynthèse et la voie exogène du lipoate, augmente le taux de transmission de *Y. pestis* par les puces. Fait intéressant, la lipoate/octanoate ligase LplA améliore la première étape de la biosynthèse de lipoate pendant la colonisation du proventricule de la puce mais pas pendant la colonisation du tube digestif de l'insecte. Enfin, *Y. pestis* utilise principalement le lipoate fourni par la protéolyse digestive (vraisemblablement sous forme de peptides lipoylés) plutôt que par le lipoate libre dans le sang, qui est rapidement épuisé par le vecteur. Ainsi, les facteurs spatiaux et temporels dictent les stratégies de lipoylation de la bactérie lors d'une infection, et le réapprovisionnement en lipoate par protéolyse digestive dans le vecteur pourrait constituer un talon d'Achille qui est exploité par des agents pathogènes.

Résultats

La Bioluminescence

La bioluminescence un outil pour suivre l'infection

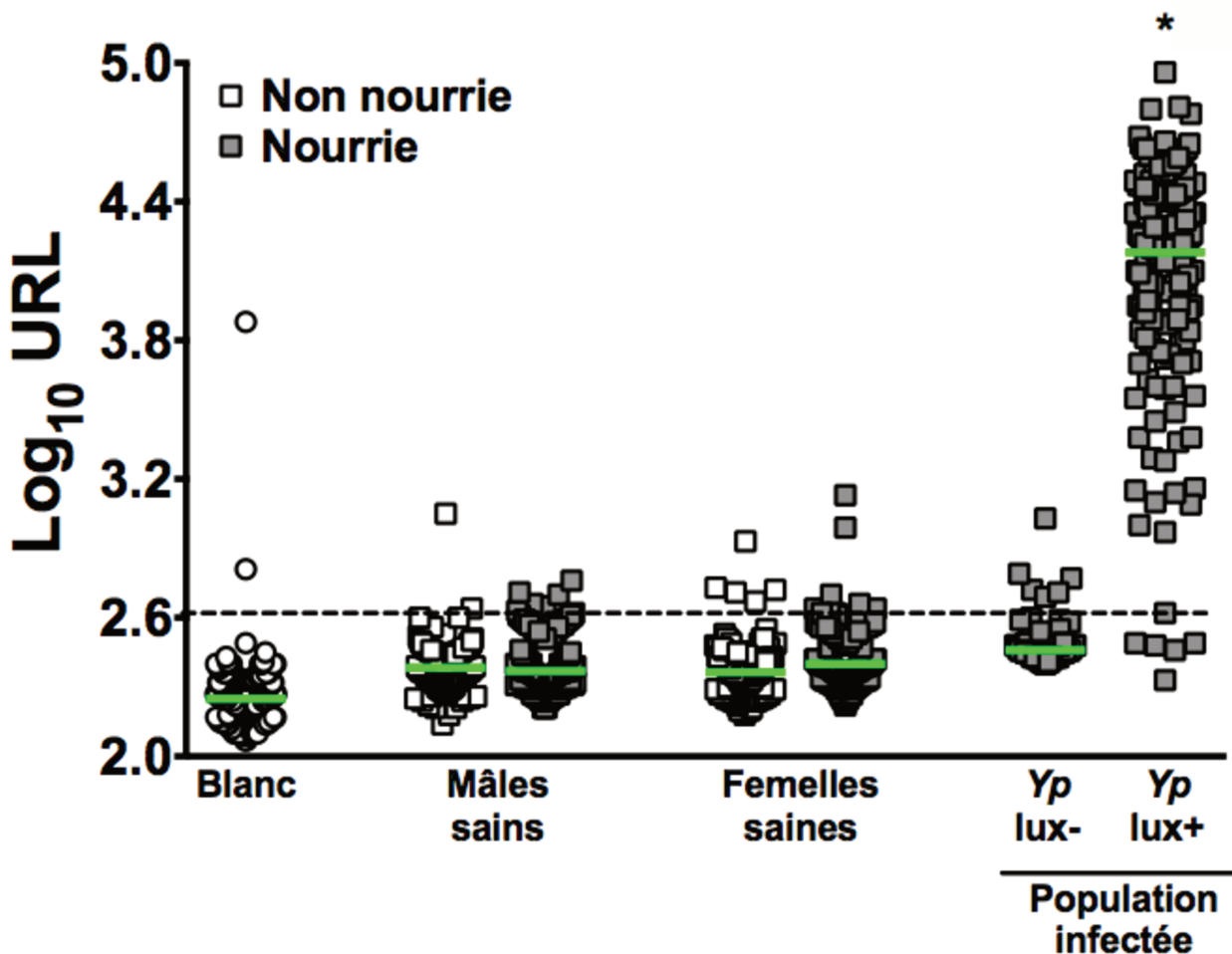


Figure 25 : La bioluminescence permet d'identifier des puces infectées par une souche de *Y. pestis lux+*. La figure représente la lumière émise en log₁₀ URL (unité relative de lumière) d'un puit d'une plaque 96 puits (ronds blancs) soit vide, ou contenant une puce mâle ou femelle non nourrie (carrés blancs) ou nourrie (carrés gris). Ainsi que de la luminescence émise par une population composée de 50% de puces mâles et 50% de puces femelles infectées avec une souche de *Y. pestis* (lux+) ou non bioluminescente (lux-). Chaque symbole représente une valeur obtenue pour un puit. La médiane des valeurs est représentée (barre horizontale verte). Les puces infectées avec la souche bioluminescente de *Y. pestis* sont significativement plus lumineuses que les autres puces et le bruit de fond $P < 0.05$, selon un test Anova à 1 facteur.

La bioluminescence permet de suivre l'infection dans la puce au cours du temps de manière non-invasive. Pour déterminer si la bioluminescence est un outil utile pour suivre l'infection dans l'insecte, des cohortes de puces ont été nourries avec du sang infecté ou non avec une souche bioluminescente : lux+ (portant l'opéron *luxCDABE*) ou non : lux- de *Y. pestis*. Dans un premier temps la luminescence émise par des puces mâles et femelles non nourries ou nourries avec du sang

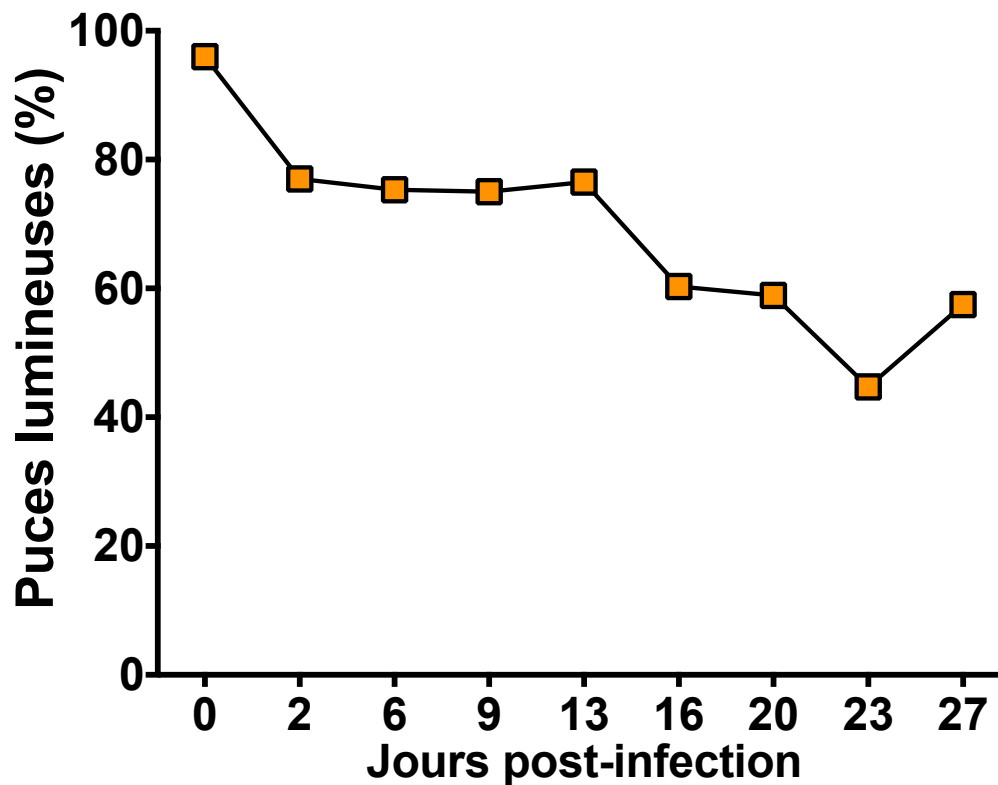


Figure 26: La bioluminescence permet de suivre l'infection dans la puce jusque 27 jours post-infection. La luminescence émise par une population composée de 50% de puces mâles et 50% de puces femelles infectées par une souche de *Y. pestis* lux+ a été mesurée juste après nourrissage et à différents temps post-infection (J2, J6, J9, J13, J16, J21, J23, J27).

non contaminé a été mesurée. Dans un second temps, la luminescence émise par une population de puces infectées (50% mâles et 50% femelles) par une souche de *Y. pestis* (bioluminescente ou non) a été mesurée. Dans tous les cas les mesures ont été effectuées immédiatement après le repas sanguin. Les résultats montrent que lorsque les puces ne sont pas nourries ou nourries avec du sang non contaminé, une très faible luminescence est émise et ce quelque soit le sexe (Figure 25), avec des valeurs légèrement supérieures au blanc (puits vides), avec une médiane de 2,37-2,4 log₁₀ URL (unité relative de lumière) vs 2,25 log₁₀ URL respectivement). D'autre part, concernant les puces infectées avec *Y. pestis*, la luminescence émise est faible lorsqu'il s'agit de la souche lux- (médiane à 2,46 log₁₀ URL), avec des valeurs comparables à celles de puces nourries avec du sang non contaminé, et une luminescence mesurée largement supérieure à celle du blanc ou des insectes des autres conditions lorsque les puces sont infectées avec la souche lux+ (médiane à 4,18 log₁₀ URL). Grâce à l'ensemble des résultats, il a été possible de déterminer une valeur seuil de 2,6 log₁₀ URL (valeur supérieure au médiane des puces infectées par la souche lux-) au-dessus de laquelle une

puce est considérée comme infectée par *Y. pestis* (Figure 25). En effet, cette valeur permet de limiter au maximum les faux positifs tout en gardant le taux de faux négatifs plutôt faible.

Par la suite, la mesure de la luminescence émise par des puces infectées avec la souche lux+ de *Y. pestis* a été suivie à différents temps post-infection. Les résultats montrent une diminution du nombre de puces lumineuses au cours du temps. Cependant, plus de 50% de celles-ci restent positives (avec une luminescence supérieure à 2,6 log₁₀ URL) jusqu'à 27 jours après infection (Figure 26). Ces résultats montrent que la bioluminescence permet de suivre l'infection par *Y. pestis* dans son vecteur, la puce, jusque 27 jours après l'infection.

La bioluminescence est le reflet de l'activité métabolique des bactéries

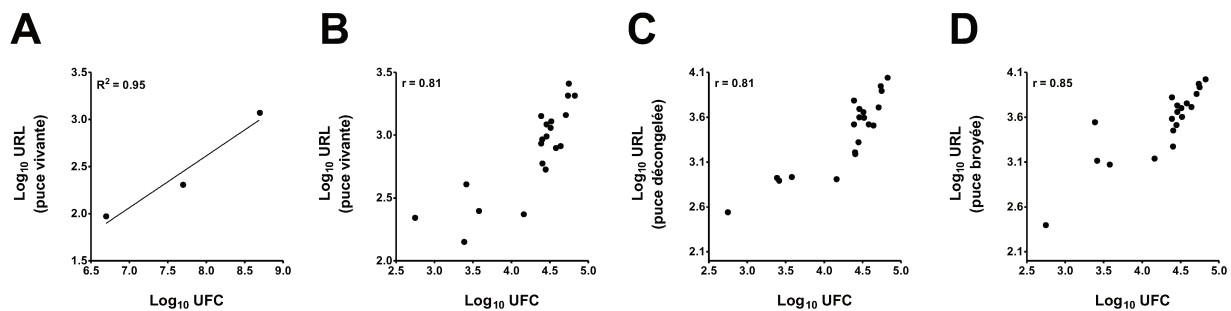


Figure 27 : La corrélation entre la charge bactérienne et la lumière émise est bonne juste après l'infection. Des cohortes de puces ont été infectées avec du sang contaminé par 5×10^6 , 5×10^7 (A) et 5×10^8 (A - D) *Y. pestis* bioluminescente. (A) La luminescence émise par une population composée de 50% de puces mâles et 50% de puces femelles a été mesurée. La médiane des valeurs obtenues (log₁₀ URL) a été donnée en fonction de la charge bactérienne (log₁₀ UFC) présente dans le repas sanguin. (B - D) Des cohortes de puces ont été infectées avec 5×10^8 *Y. pestis* bioluminescente, 20 puces femelles ont alors été collectées vivantes (B), congelées (C) ou broyées (D) afin de mesurer la luminescence émise par les puces et ensuite dénombrer sur gélose la quantité de bactérie présente dans le tube digestif de l'insecte. La corrélation entre la quantité de lumière émise par les puces (vivantes, décongelées et broyées) et la charge bactérienne mesurée dans les insectes est significativement élevée ($0.85 > r > 0.81$ avec $p < 0.05$ dans un test de corrélation de Spearman [la distribution des valeurs étant non gaussienne dans un test de normalité d'Agostino 1 Pearson omnibus]).

La quantité de bactéries bioluminescentes ingérées lors de l'infection est quantifiable dans des puces vivantes, mortes par congélation et des puces broyées. Il a été montré qu'il existait une très forte corrélation entre la lumière émise par des bactéries en culture *in vitro*, ou *in vivo* dans des rongeurs et la quantité de bactéries réellement présentes (Sun *et al.*, 2012). Afin de vérifier s'il

existe une telle corrélation dans l'insecte, des puces infectées par des bactéries bioluminescentes ont été collectées après le repas sanguin. La luminescence émise par ces puces a été mesurée puis la quantité de bactérie réellement ingérée a été quantifiée par dénombrement sur gélose. La même expérience a été réalisée à partir de puces congelées juste après leurs infections afin de déterminer si la congélation avait un effet sur la luminescence et la charge bactérienne. Et également à partir de puces broyées afin de déterminer si la libération du contenu digestif de la puce pouvait améliorer la corrélation. Dans un premier temps, les résultats montrent que la corrélation entre la quantité de lumière émise par la population après infection et la charge de bactéries présentes dans le repas sanguin est excellente (R^2 : 0,95, Figure 27A). La corrélation entre la luminescence émise de puces vivantes, congelées ou broyées est quant à elle élevée avec un r respectif de 0,81; 0,81 et 0,85 (Figure 27B, C et D). Ce qui montre qu'il existe une bonne corrélation entre la quantité de lumière émise (donc la quantité de bactérie théorique ingérée) et la quantité de bactérie réellement ingérée au moment de l'infection.

La couleur du bol alimentaire de la puce influence la corrélation entre la quantité de bactéries ingérées et la luminescence émise dans le tube digestif de l'insecte. La corrélation observée entre la quantité de bactérie ingérée et la luminescence émise est imparfaite ($r=0,81$ comparée $R>0,96$ dans l'article de Sun *et al.*). Or lors de nos expériences, nous avons pu observer des différences de couleur du bol alimentaire des puces collectées. En effet, deux couleurs de bol alimentaire ont pu être observées (Figure 28A et B). Des tubes digestifs rouges et d'autres noirs avec des différences entre les sexes. Les puces femelles possédaient un bol alimentaire d'un dégradé de rouge ou noir (Figure 28B), leur proportion était variable en fonction des expérimentations, alors que les mâles possédaient à 99% un bol alimentaire rouge vif (Figure 28A). Ainsi la couleur du tube digestif pourrait avoir un effet sur la corrélation entre la quantité de bactéries ingérées et la lumière émise par ces bactéries. Afin de vérifier cette théorie, la luminescence émise par des puces mâles rouges, de puces femelles noires et rouges ont été comparées.

La luminescence émise par des puces infectées avec du sang contaminé par une souche bioluminescente a été mesurée immédiatement après infection et la charge bactérienne a été quantifiée par dénombrement sur gélose. Les données montrent que les puces mâles (rouges) sont plus lumineuses que les puces femelles quelles que soient leurs couleurs (Figure 28C). Les puces femelles rouges sont quant à elles plus lumineuses que les noires. Au vu de ces résultats nous

devrions en théorie observer une plus grande quantité de bactéries dans les puces les plus lumineuses.

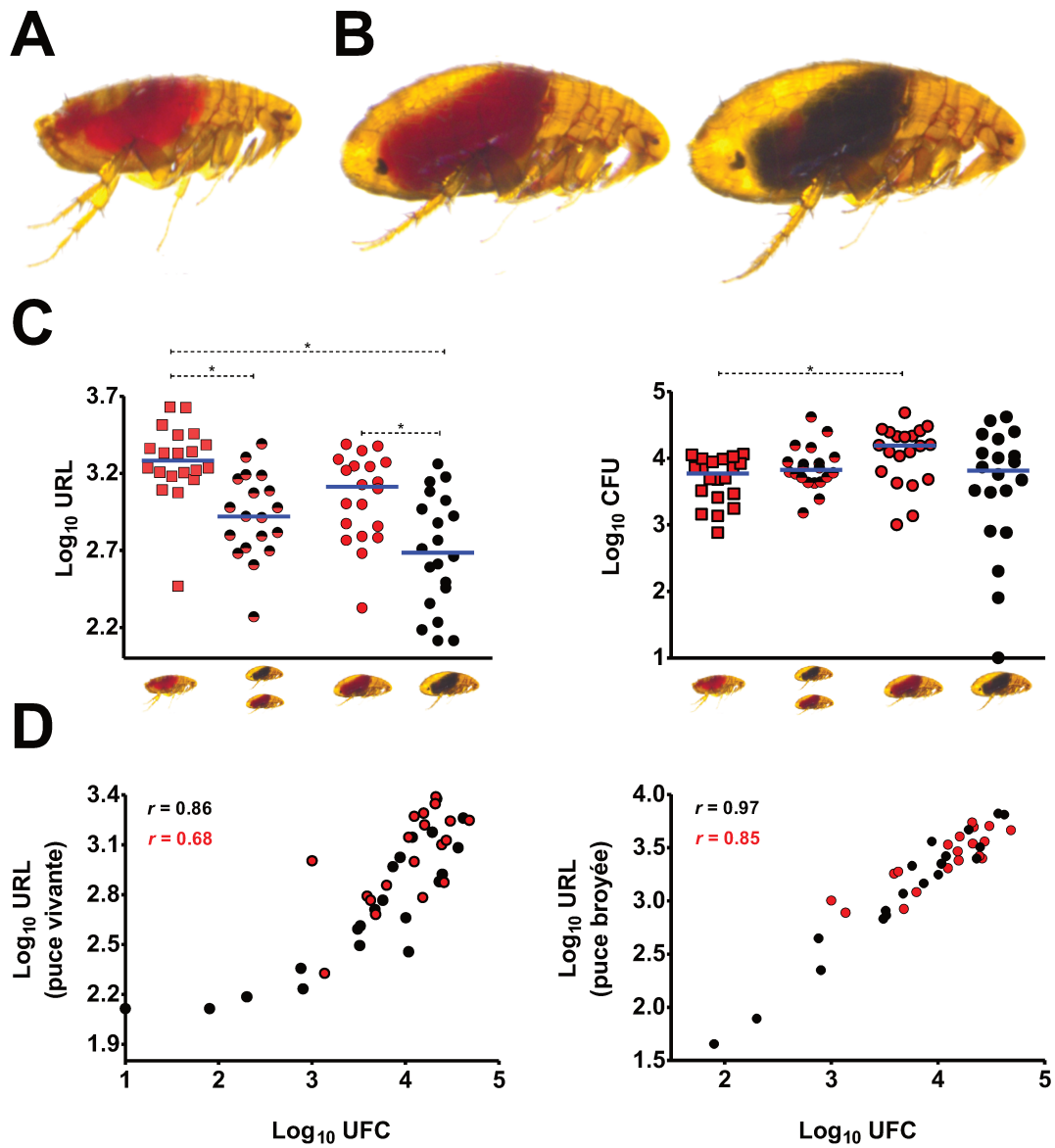


Figure 28. La couleur du bol alimentaire influence la qualité de la corrélation entre la charge bactérienne ingérée et la lumière émise par les bactéries dans le tube digestif de la puce. Photos de puces mâles (A) et femelles (B) après un repas sanguin. Les puces mâles sont en proportion plus de 99% rouges alors que la proportion de puces femelles noires ou rouges est modifiée selon le jour du nourrissage. (C) Lumière émise (en \log_{10} URL) par des puces selon leur sexe et la couleur de leur tube digestif après un repas sanguin contaminé par une souche bioluminescente de *Y. pestis*. Ainsi que la quantité de bactéries ingérées par ces puces en \log_{10} UFC ($n=19-20$). Chaque symbole représente la valeur obtenue pour un seul insecte. Les barres bleues représentent la médiane des valeurs. *, $P<0.05$ dans un test de Kruskal-Wallis avec la comparaison multiple de Dunn. (D) La lumière émise en \log_{10} URL en fonction de la quantité de bactérie en \log_{10} UFC est représentée, pour des puces vivantes ou broyées en fonction de leur couleur : rouges (rond rouge) ou noires (rond noir). Chaque cercle indique les valeurs obtenues pour un individu ; $n=20$ puces par groupe. Les coefficients de corrélation de Spearman r sont données pour chacun des groupes ; coefficient rouge et noir pour la cohorte de puces au tube digestif respectivement rouge et noir.

Donc un plus grand nombre de bactéries chez les puces mâles, puis les puces femelles rouges suivi par les puces femelles noires. Cependant, les puces mâles n'ont pas ingéré une plus grande quantité de bactéries que les femelles. En effet, les puces ayant ingérées les plus grandes quantités bactériennes sont les puces femelles rouges, puis les femelles noires et enfin les puces mâles rouges (Figure 28C). Cela ne correspond pas à ce qui est observée avec la luminescence. Les femelles noires auraient ingéré moins de bactérie, probablement à cause de la présence d'un bol alimentaire résultant du nourrissage précédant, ne permettant pas un nourrissage aussi conséquent que pour leurs homologues ayant tout digérées. Ainsi si la puce n'a digéré que partiellement le bol alimentaire précédant, celui-ci rendrait le sang plus foncé voir noir et la charge bactérienne ingérée serait plus faible. Alors que dans le cas où la puce aurait digéré intégralement le dernier bol alimentaire, le sang présent dans le tube digestif serait rouge et la charge bactérienne ingérée serait plus élevée. La charge bactérienne plus faible pour les puces mâles s'explique simplement par leurs tailles plus petites et donc un volume ingéré plus réduit. En revanche la corrélation entre la quantité de bactéries et la lumière émise par celle-ci (dans le cas des puces vivantes ou broyées) est plus faible pour les puces rouges que pour les puces noires (Figure 28D). La raison de cette différence de corrélation n'est pas évidente. Hormis le fait que les puces rouges sélectionnées suite au nourrissage peuvent avoir des nuances de couleurs différentes. Donc probablement une absorption de la lumière émise différente selon la nuance de ce rouge. Ce qui pourrait conduire à un défaut de corrélation quand on regroupe les résultats de l'ensemble de la population. En revanche, concernant les puces noires, l'absorption de cette lumière émise, serait la même pour toutes les puces et donc permettre une meilleure corrélation. Cette différence de couleur permet d'expliquer le défaut de corrélation observé entre la quantité de bactérie ingérée et la luminescence émise suite au repas de sang contaminé.

La lumière émise par les bactéries pendant l'infection est le reflet de l'état métabolique de *Y. pestis* dans l'insecte et non de la véritable charge bactérienne présente. La question qui réside était de savoir si la lumière émise par les bactéries permettait de quantifier la charge bactérienne réelle présente dans la puce tout au long de l'infection. Pour cela, la lumière émise par des puces infectées avec une souche bioluminescente de *Y. pestis* a été mesurée à différents temps après infection et la quantité de bactérie a été quantifiée par étalement (Figure 29). Les résultats montrent pour les puces vivantes, une forte diminution de la corrélation et ce dès J2 ($r=0,3639$), puis la corrélation se maintient jusque J13 ($r=0,3554$) et augmente un peu à J27 ($r=0,6388$) (Figure 29A). En revanche les résultats pour les puces broyées sont différents. En effet la corrélation est plutôt

bonne à J2 ($r=0,812$), ne diminue qu'à J9 ($r=0,5822$), encore plus à J13 ($r=0,3163$) et augmente de nouveau à J27 ($r=0,5704$) (Figure 29B). Ces différences de corrélation peuvent s'expliquer par la différence de métabolisme de la bactérie au sein de son hôte.

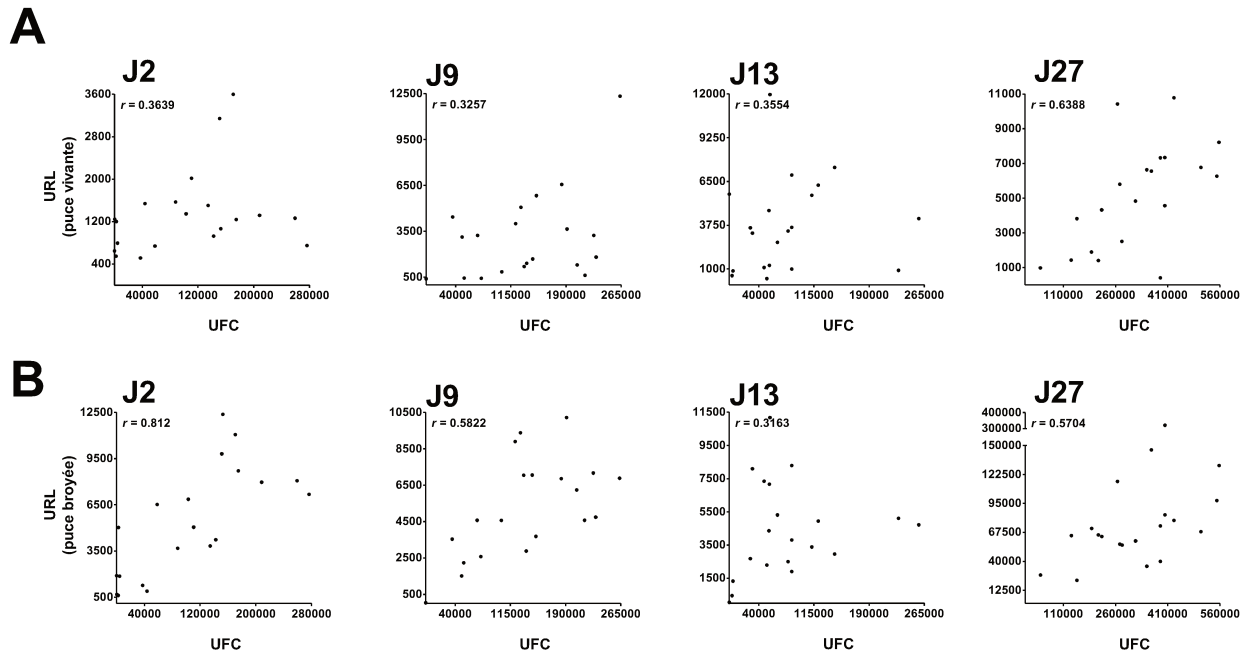


Figure 29. La luminescence émise par les bactéries présentes dans le tube digestif est un reflet de l'activité métabolique de *Y. pestis*. Des cohortes de puces ont été infectées avec une souche bioluminescente de *Y. pestis*, 20 puces femelles ont alors été collectées vivantes (A), ou broyées (B) afin de mesurer la luminescence émise par les puces et ensuite dénombrer sur gélose la quantité de bactérie présente dans le tube digestif de l'insecte. Chaque symbole représente la valeur obtenue pour un seul insecte. Les coefficients de corrélation de Speaman r sont donnés.

En effet, lors du broyage des puces des nutriments essentiels à la bactérie peuvent être libérés et permettre un changement métabolique de *Y. pestis* selon son état au moment de cette libération. Après le broyage, un certain temps (de quelques minutes) se déroule avant la mesure de luminescence. Ce temps est assez important pour que les bactéries en phase stationnaire, changent de métabolisme et deviennent plus actives. En revanche ce temps est trop faible pour que les bactéries en dormance redeviennent actives. Les résultats observés tendent à montrer que les bactéries sont en grande majorité active juste après l'infection (pas de différence entre la corrélation des puces vivantes et broyées, avec une bonne corrélation). En revanche à J2 et à J9, le métabolisme change avec une population de bactérie hétérogène en phase stationnaire. En effet, la corrélation augmente de manière importante pour les puces broyées (Figure 29), ce qui montre que les bactéries sont de nouveau devenues actives grâce à la libération de nutriments lors de ce nourrissage. Ces

observations sont consistantes avec les recherches précédentes qui montrent que lors de la colonisation de la puce, *Y. pestis* forme un biofilm qui, chez d'autres bactéries est décrit comme étant composé d'une population bactérienne métaboliquement hétérogène, voire en partie inactive (Costerton *et al.*, 1994).

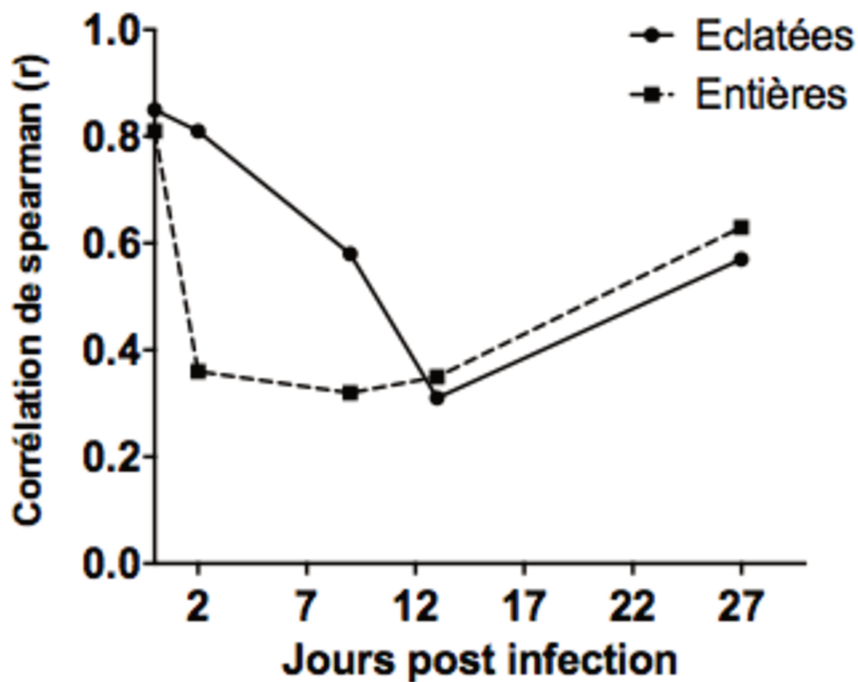


Figure 30 : La différence de corrélation entre la quantité de bactérie et la luminescence émise dans les puces entières et éclatées montre l'état du métabolisme *Y. pestis* au cours de l'infection. Une cohorte de puce a été infectée par une souche bioluminescente de *Y. pestis*. Au cours du temps la luminescence émise par les puces a été mesurée (à partir de puces entières puis éclatées) et la charge bactérienne a été quantifiée par dénombrement bactérien. Les coefficients de corrélation de Spearman r sont représentés en fonction du temps.

Les jours suivants (J13 et J27) la population serait plutôt en dormance, la corrélation entre les puces vivantes et les puces broyées étant identique (Figure 30). Ceci montre que malgré la libération de nutriment, les bactéries n'ont pas le temps nécessaire pour devenir de nouveau active et aurait donc un métabolisme plutôt en dormance. Ainsi les résultats montrent que la bioluminescence ne peut pas être utilisée pour dénombrier les bactéries de manière précise dans la puce. Malgré ce constat, des tests ont été effectués pour savoir si la bioluminescence pouvait permettre de diagnostiquer le blocage.

La bioluminescence ne permet pas de diagnostiquer le blocage.

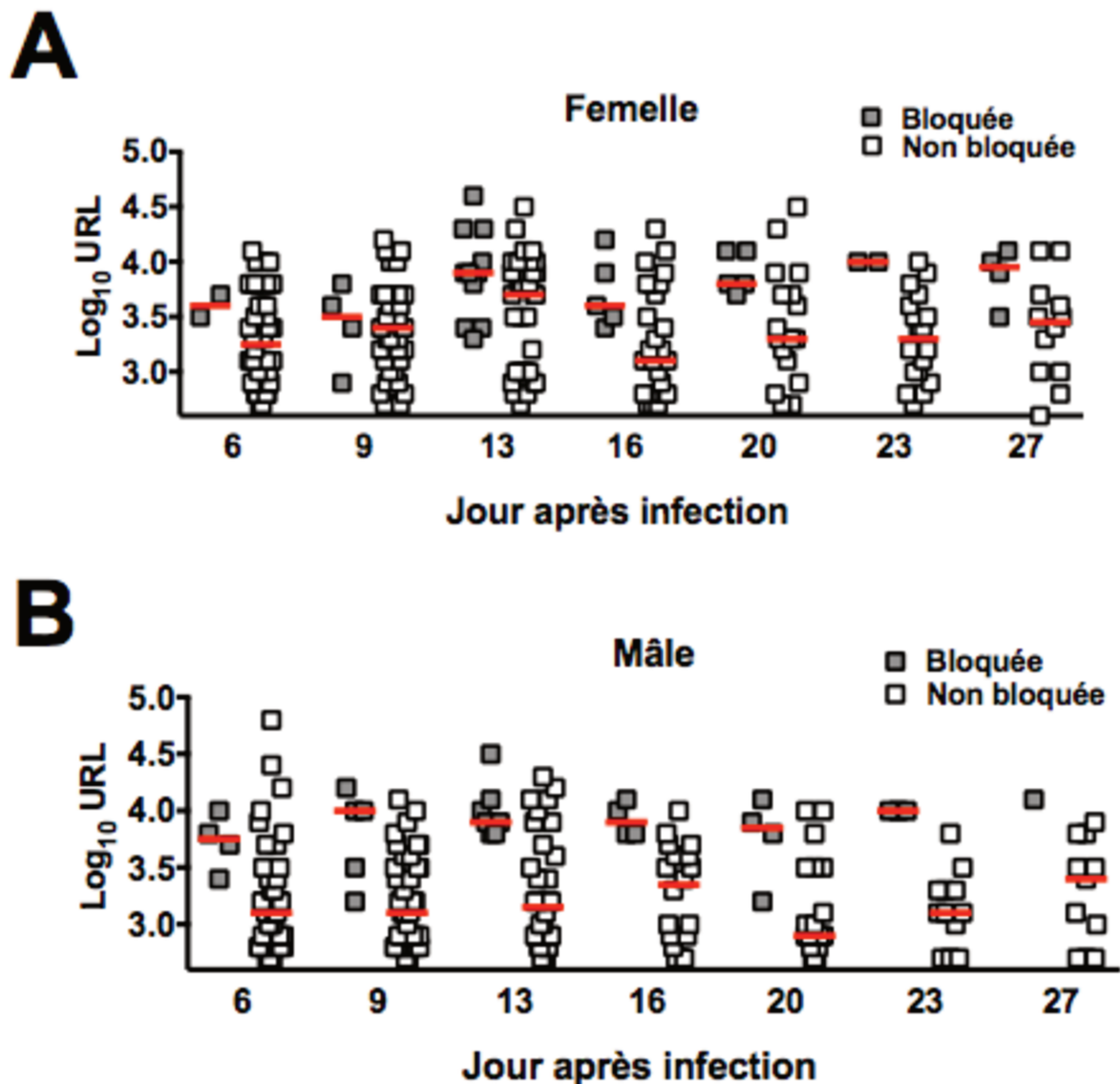


Figure 31. La luminescence ne permet pas de différencier les puces bloquées des non bloquées. Une cohorte de puces a été infectée avec une souche bioluminescente de *Y. pestis*, puis les puces ont été diagnostiquées pour le blocage après le repas sanguin. La luminescence des puces a alors été mesurée. Les résultats sont présentés en log₁₀ URL, pour les femelles (A) et les mâles (B) bloquées (carré gris) et non bloquées (carré blanc). La barre rouge représente la médiane des résultats. Indépendamment du sexe et du jour du diagnostic, la quantité de lumière rejetée par les puces bloquées n'est pas significativement différente des puces infectées non bloquées ($P > 0.05$ dans un test Anova à 1 facteur).

La luminescence émise par les puces bloquées est très forte, mais pas suffisante pour les discriminer de puces non bloquées. Partant du constat qu'il existe une certaine corrélation (bien qu'imparfaite) entre la quantité de bactérie et la lumière émise. Et qu'il est considéré que les puces bloquées possèdent une plus grande charge bactérienne que les puces non bloquées.

La bioluminescence a été utilisée pour déterminer si elle permettait de discriminer les puces bloquées des autres puces. Pour cela des puces ont été infectées avec une souche bioluminescente de *Y. pestis*. Puis ces puces ont été observées afin d'identifier les puces bloquées après un repas sanguin (à J6, J9, J13, J16, J20, J23 et J27) et pouvoir mesurer la lumière émise par ces puces, juste après le diagnostic, et les comparer à la luminescence des puces infectées mais non bloquées. Les résultats montrent que quelque soit le jour ou le sexe de l'individu, les puces bloquées sont en médiane plus lumineuses que les puces non bloquées (Figure 31 A et B). Mais pas suffisamment plus lumineuse afin de discriminer une puce bloquée d'une puce non bloquée.

Ce résultat montre que la bioluminescence ne permet pas de diagnostiquer le blocage. Bien que la bioluminescence ne permette pas de quantifier de manière précise la charge bactérienne présente dans la puce et qu'elle n'identifie pas les puces bloquées de manière évidente. Cette méthode permet de suivre l'infection pendant 27 jours avec un suivi du métabolisme de la bactérie dans la puce. Sachant que certaines conditions physico-chimiques pouvaient avoir un effet sur le développement de *Y. pestis* dans l'insecte. Il a été décidé de tester la bioluminescence vis à vis de ces conditions.

Mise à l'épreuve de la bioluminescence dans l'étude de l'infection dans la puce

En condition « physique »

La bioluminescence permet de mettre en évidence des différences de colonisation ou de physiologie de *Y. pestis* dans la puce selon le sexe ou lorsque des conditions physico-chimiques sont modifiées (température, fréquence de nourrissage). Afin de tester la bioluminescence de manière pratique, cet outil a été utilisé pour savoir s'il était possible d'identifier des différences de colonisation ou de métabolisme pour *Y. pestis* dans la puce en changeant des propriétés physico-chimiques. C'est pourquoi 4 conditions ont été testées : 1) le sexe de l'individu 2) la couleur du bol alimentaire de puces femelles juste après le repas sanguin 3) la fréquence de nourrissage 4) la température d'incubation des puces. Ces 4 conditions auraient un effet sur la quantité de lumière émise par les bactéries. On observe un fort effet du sexe, de la fréquence de nourrissage et de la température (Figure 32). Mais un effet plus faible de la couleur du bol alimentaire et observable que dans les temps tardifs (J20 à J27). En effet les puces femelles, les

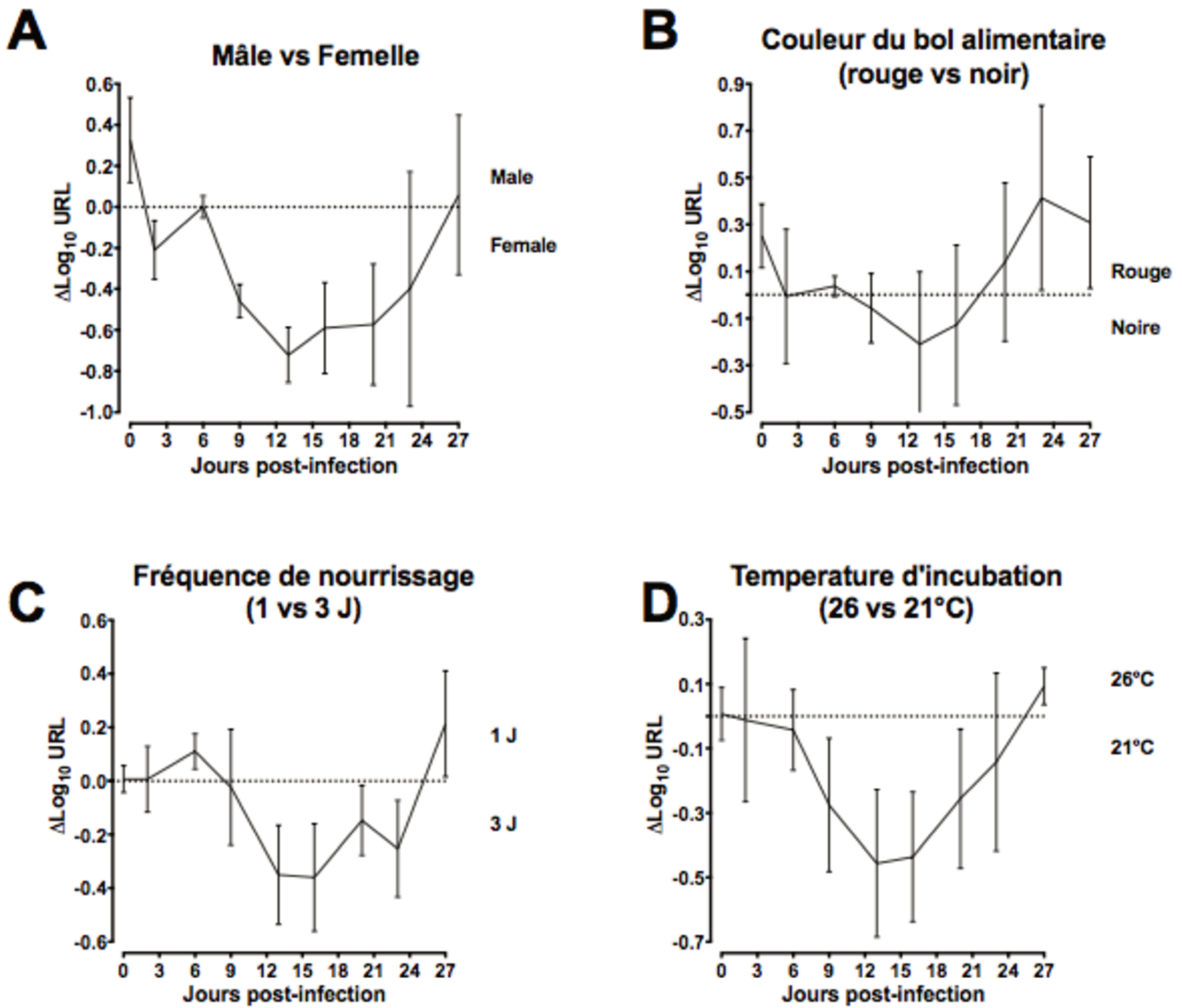


Figure 32 : La luminescence permet de mettre en évidence des différences de colonisation ou de métabolisme dans l'infection par *Y. pestis* dans la puce. Des cohortes de puces ont été infectées avec une souche bioluminescente de *Y. pestis*. Les puces ont été collectées et séparées selon leur sexe et la couleur de leur tube digestif (pour les conditions mâles/femelles et rouges noires) (A-B). 50% de puces mâles et 50% de puces femelles ont été collectées et nourries une fois par jour ou une fois tous les 3 jours (C), ou placées à une température de 26°C ou 21°C (température usuelle) (D). La luminescence de chacune des conditions a été mesurée tout au long de l'infection. La différence en \log_{10} URL de la première condition moins la deuxième est présentée (A: \log_{10} URL mâle - \log_{10} URL femelle). Les résultats représentent la moyenne des médianes et les déviations standards de trois manipulations indépendantes.

puces nourries tous les 3 jours et incubé à 21°C sont plus fortement lumineuses tout au long de l'infection (en particulier entre J9 et J21 post-infection). Ce sont des résultats attendus, concernant la fréquence de nourrissage, plus la puce à l'occasion de se nourrir, plus le biofilm formé au niveau

du proventricule peut être érodé par le passage du sang et permettre son évincement. Les bactéries peuvent alors être éliminées par le biais des fèces de la puce. Donc plus la fréquence de nourrissage est importante, plus la charge bactérienne attendue est faible. La température d'incubation est quant à elle connue pour influencer le taux de blocage, avec une diminution pour les températures plus élevées (Hinnebusch *et al.*, 1998; Schotthoefler *et al.*, 2011). Ce qui est aussi comparable avec nos résultats de bioluminescence.

Après avoir étudié les capacités réelles de l'utilisation de la bioluminescence dans le modèle d'infection de la puce. Il fallait déterminer si la bioluminescence permettait d'identifier des gènes impliqués dans le développement de la bactérie dans l'insecte. Aussi bien des gènes de colonisation requis pour que la bactérie se multiplie dans la puce que des gènes de transmission impliqués dans la formation du biofilm.

En condition « génétique »

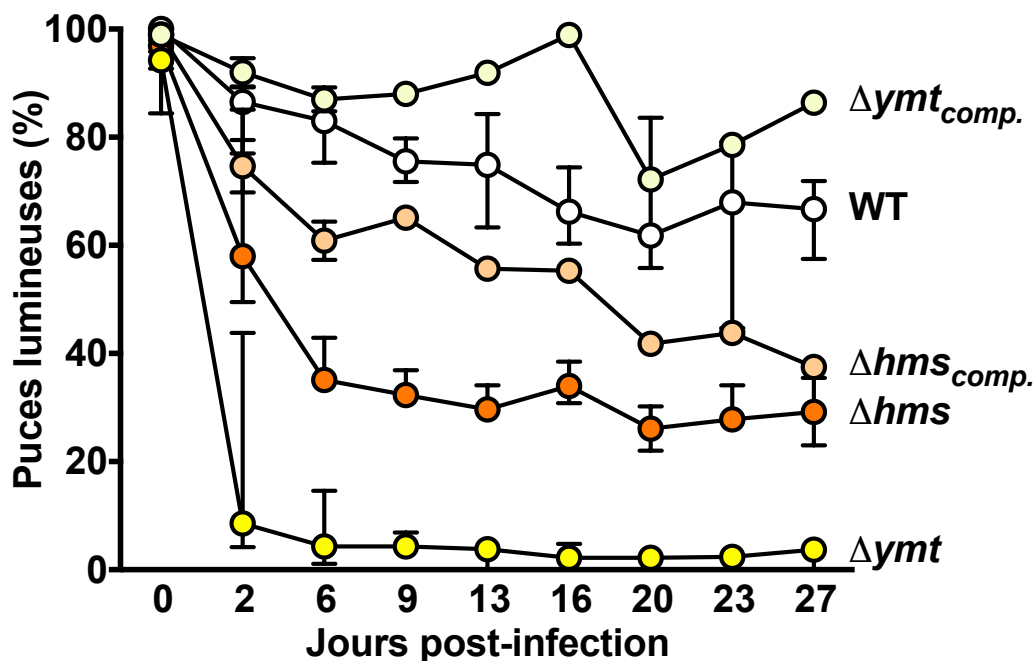


Figure 33 : La bioluminescence est un outil qui permet d'identifier des gènes impliqués dans l'infection au sein de la puce. Des cohortes de puces ont été infectées par une souche bioluminescente de *Y. pestis* sauvage (cercles blancs), un mutant Δhms_{HFRS} (cercles oranges), un mutant Δhms_{HFRS} complémenté par un plasmide portant l'opéron *hmsHFRS* sous le contrôle de son promoteur (cercles saumons), un mutant Δymt (cercles jaunes) et un mutant Δymt complémenté par un plasmide portant le locus *ymt* sous le contrôle de son promoteur (cercles jaunes clairs). La figure présente les pourcentages de puces vivantes qui émettent de la lumière (signal positif) à différents jours après infection.

La bioluminescence permet d'identifier rapidement, de manière non invasive, plus éthique et moins coûteuse des mutants de *Y. pestis* possédant des défauts de colonisation et/ou de blocage de la puce. Afin de déterminer si la bioluminescence permettait d'identifier des mutants possédant un défaut de développement dans la puce (colonisation ou transmission), des cohortes de puces ont été infectées avec des souches bioluminescentes sauvage, $\Delta hmsHFRS$ un gène de transmission (Hinnebusch *et al.*, 2002), Δymt un gène de colonisation essentiel (Hinnebusch *et al.*, 1996) et de leurs compléments respectifs. La lumière émise par les puces a alors été mesurée tout au long de l'infection (J0, J2, J6, J9, J13, J16, J20, J23, J27). Les résultats montrent que le pourcentage de puces lumineuses chute brutalement dès J2 pour les souches Δymt et $\Delta hmsHFRS$ comparé à la souche sauvage ou à leurs compléments (Figure 33). En effet le pourcentage de puces lumineuses pour la souche Δymt diminue dès J2 à 8%. Et devient quasiment nulle à J6 jusqu'à J27 post-infection (4,3% à J6, 3,7% à J27). Tandis que les puces infectées par la souche $\Delta hmsHFRS$ restent lumineuses à 58% à J2, ce taux continue à diminuer à 35% à J6 et se maintient jusqu'à J27. Ces résultats sont bien différents de ceux de la souche sauvage (de référence) qui garde un pourcentage de puces lumineuses d'au moins 70% tout au long de l'infection (jusqu'à 27 jours après l'infection). Il est à noter que la différence entre la souche sauvage et les souches mutantes est visible précocement au cours de l'infection, dès J2 et de manière certaine à J9. Les données obtenues avec la bioluminescence sont en accord avec les résultats de la littérature. En effet il a été montré que la souche sauvage de *Y. pestis* était retrouvée dans 70% des puces survivantes 4 semaines après un repas sanguin contaminé. De même le mutant Δymt possédant un défaut de résistance à un composé toxique du sang, est éliminé dès les premiers jours après infection. Alors que le mutant $\Delta hmsHFRS$ déficient dans la formation de biofilm dans la puce est retrouvé que dans 50% des insectes et avec une charge bactérienne plus faible que la souche sauvage 27 jours après infection. (Hinnebusch *et al.*, 1996; Hinnebusch *et al.*, 2002).

En effet l'ensemble des résultats obtenus en bioluminescence et la concordance avec ceux de la littérature montre que la bioluminescence peut être utilisée comme outil pour étudier l'implication de gènes dans le développement dans la puce. L'utilisation de la bioluminescence permet de discriminer en seulement 9 jours des mutants affectés dans la colonisation et/ou le blocage. Et de manière moins coûteuse et plus éthique (diminution du nombre d'animaux utilisés comparé à la méthode usuelle).

En conclusion la bioluminescence ne permet pas 1) de quantifier la charge bactérienne au cours du temps (problème de métabolisme) 2) de diagnostiquer le blocage. Cependant cet outil permet 1) de suivre l'infection de *Y. pestis* dans la puce tout au long de l'infection 2) d'étudier l'impact de facteur physico-chimique sur l'infection 3) d'étudier le rôle de gène dans le développement de l'infection. C'est pourquoi la bioluminescence a été utilisée pour tester une banque de mutant afin de découvrir de nouveau gène essentiel dans le développement de l'infection dans l'insecte.

Criblage de la banque de mutants

Méthodes de sélection des gènes potentiellement intéressants

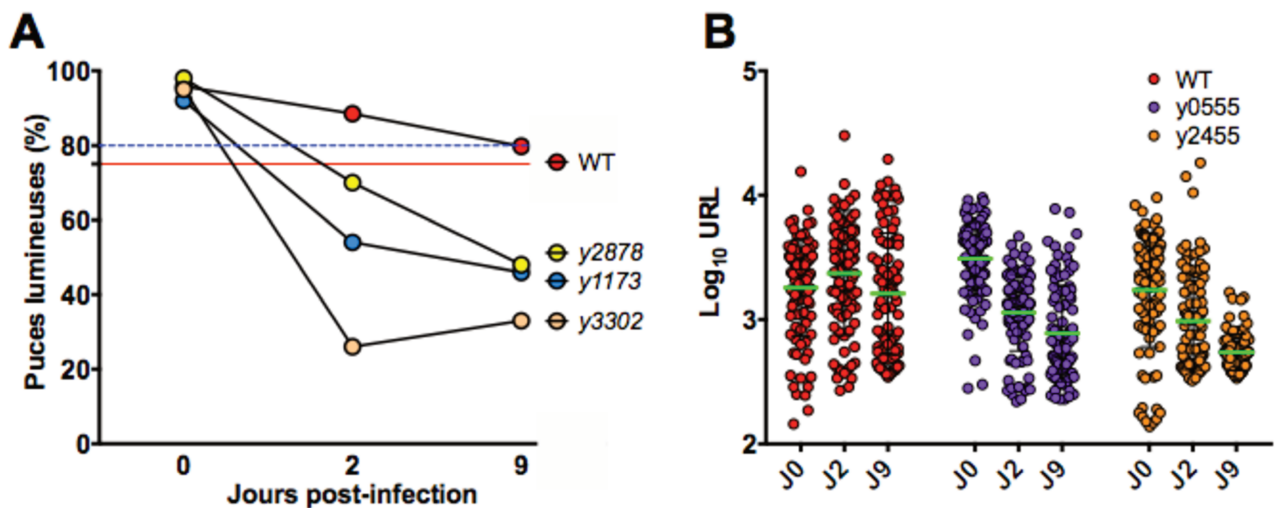


Figure 34 : Etude comparative des résultats du criblage de la banque de mutants. (A) La figure représente le pourcentage de puces lumineuses des souches sauvage (WT), $\Delta y2878$ (cercle jaune), $\Delta y1173$ (cercle bleu), $\Delta y3302$ (cercle saumon). Les lignes pointillée bleu (80%) et continue rouge (75%) représentent les limites choisies à J2 et J9 respectivement en comparant l'ensemble des données obtenues pour la souche sauvage. (B) La figure représente la lumière émise en \log_{10} URL mesurée pour les souches sauvage, $\Delta y0555$ et $\Delta y2455$ en fonction du temps (J0, J2 et J9). Chaque point représente la valeur émise par une puce. Le trait vert représente la médiane des valeurs. Les mutants sont présentés à titre d'exemple.

Le criblage de la banque de mutant a permis de mettre en évidence des gènes pouvant posséder un rôle dans l'infection chez les puces. Fort du constat que la bioluminescence permettait d'identifier des mutants impliqués dans l'infection par *Y. pestis* dans la puce, une banque de 172 mutants chacun dépourvus d'un locus connu pour être sur-exprimé dans la puce (Vadyvaloo *et al.*, 2010) a été testée avec cette méthodologie. Grâce à notre méthodologie il est possible de tester 12 souches (la souche sauvage et 11 mutants) et 24 souches par semaines.

L'ensemble des données obtenu suite au criblage de la banque de mutants a alors été analysé en utilisant 2 méthodes différentes. Les souches correspondantes aux critères sélectionnés ont alors été de nouveau testés en bioluminescence pour confirmer les résultats obtenus. 1) Le pourcentage de puces lumineuses a été calculée pour chaque souche mutante et sauvage au J0, J2 et J9 post-infection. En réunissant l'ensemble des résultats des souches mutantes, une limite de 80% à J2 et 75% à J9 a été choisi, ainsi toutes les souches mutantes dont les résultats étaient inférieurs ont été re-testées (Figure 34A). 2) Les résultats ont été aussi analysés en observant la répartition d'émission de lumière en comparant à celle des puces infectées avec la souche sauvage (Figure 34B). Les souches dont le comportement différait de manière évidente ont été testées à nouveau. Cependant ce dernier point étant subjectif une 3ème méthode de sélection a été mise en place. Pour cela la distribution d'émission de lumière des mutants sélectionnés par les 2 méthodes précédentes a été comparés à celle de la souche sauvage. Le graphique montre de manière évidente une différence de distribution. En effet les mutants sélectionnés possèdent une grande proportion de puces au niveau de faible émission de lumière (exemple: $\Delta y3302$ 60% des puces à 2, 5 \log_{10} URL) ce qui n'est pas le cas pour la souche qui possède une distribution plus étalée.

Afin de confirmer notre sélection, un ensemble de 53 mutants ont été re-testés en bioluminescence. Parmi ces souches, 14 ont été sélectionnées comme pouvant être d'intérêt dans la puce (pourcentage de puces lumineuses faibles et/ou distribution d'émission de lumière différente de la souche sauvage) (table 1).

Mutant lacking ^a			Putative resistance to	Relevant references ^c	Criterion of selection ^d
Locus tag ^b	Gene name	Protein function			
y1282	<i>yfiD</i>	Autonomous glycol radical cofactor	Oxidative stress	[1]	79% - 67%
y2455	<i>putA</i>	Proline dehydrogenase / Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase		[2]	Signal range
y0555-y0560*	<i>terZABCDE*</i>	Putative tellurium resistance proteins		[3]	86% - 73%
y0602-y0605	<i>y0602 dsbD cutA dcuA</i>	Uncharacterized; Thiol:disulfide interchange protein; Divalent-cation tolerance protein; C4-dicarboxylate transport		[4]	Signal range
y0236	<i>lpxP</i>	Lipid A biosynthesis palmitoleoyltransferase	Antimicrobial peptide	[5]	76% - 70%
y3302	<i>rpiA</i>	Ribose-5-phosphate isomerase A		[6]	26% - 36%
y2892-y2894	<i>rpiA2 xylB gadD1</i>	Ribose-5-phosphate isomerase A; Xylulose kinase; NAD-dependent succinate-semialdehyde dehydrogenase		[6]	71% - 74%
y1076-y1077	<i>wbyJ wbyI*</i>	Mannosyltransferase-like protein; Glycosyltransferase-like protein		[7]	88% - 68%
y3525	<i>glnE</i>	Bifunctional glutamine synthetase adenyltransferase/adenyl-removing enzyme	Osmotic stress	[8]	Signal range
y1173	<i>lipB</i>	Octanoyltransferase		-	62% - 61%
y1629	<i>rovM</i>	LysR-family transcriptional regulatory protein		[9]	Signal range
y2878	y2878	Uncharacterized protein		-	53% - 57%
y2882-y2880*	<i>psaABC*</i>	pH6 antigen; Chaperone protein; Outer membrane usher protein		[10]	79% - 81%
y3249-3250	y3249-3250	PadR family transcriptional regulator; Uncharacterized protein		-	74% - 76%

TABLE 1 : LISTE DES MUTANTS D'INTÉRÊTS.

Etude des gènes potentiellement intéressants

Parmi ces 14 mutants, 3 ont été reconnus récemment comme impliqué dans l'infection chez la puce. Comme *rovM* dont le rôle a été mis en évidence par une méthode de co-infection avec la souche

sauvage (Vadyvaloo *et al.*, 2015). De plus, deux autres mutants sélectionnés sont dépourvus des locus *psaABC* et *y0555-y0560* tous les deux activés dans la puce par le système à deux composants *PhoP-PhoQ* important pour le blocage de la puce (Vadyvaloo *et al.*, 2015). D'un point de vue biologique, la majorité des mutants sont dépourvus d'un gène (chez *Y. pestis* ou d'autres bactéries) requis de manière *in vitro* pour la résistance, au stress oxydatif, aux peptides antimicrobiens et au stress osmotique (table 1). Ces 3 éléments sont connus pour avoir lieu dans le tube digestif de la puce au cours de l'infection par *Y. pestis*.

En conclusion le criblage de la banque de mutant valide aussi notre méthodologie. En effet, les résultats sont cohérents avec la littérature. Elle a même permis de mettre en évidence un gène avec un rôle mineur (*rovM*). La majorité des gènes identifiés sont impliqués dans la résistance aux stress. Ce qui montre que *Y. pestis* doit résister à de nombreux stress (peptides antimicrobiens, stress osmotique, stress oxydatif) dans la puce afin de développer une infection durable et permettre la transmission de la maladie. Ainsi la bioluminescence a permis de mettre en évidence de potentiel candidat d'étude pour améliorer la compréhension des mécanismes d'infection de *Y. pestis* dans la puce (gène de transmission et/ou de colonisation).

Pour déterminer si les gènes identifiés sont réellement impliqués dans le développement de la bactérie dans le tube digestif de la puce, la capacité à bloquer les puces a été suivie pour les souches sélectionnées selon la méthode usuelle d'étude de l'infection chez l'insecte.

Les données concernant le blocage des mutants sélectionnés montrent que certains mutants sont affectés dans leurs capacités à bloquer l'insecte. En effet, les mutants $\Delta y0555$, $\Delta y2878$, $\Delta y1173$ possèdent tous trois un défaut comparé à la souche sauvage, avec des taux de blocage respectifs de 5%, 18% et 22% vs 33%. De plus, trois autres mutants $\Delta y1076$, $\Delta y3249$ et $\Delta y0602$ possèdent un taux de blocage plus élevé que la souche sauvage (46%, 46%, 56% vs 33%) (Figure 35). Concernant les autres gènes, leurs implications ne peuvent être mis en évidence au travers de cette expérience. Cependant la bioluminescence a permis de souligner le rôle mineur *rovM* (*y1629*) qui a été mis en évidence par la méthode de co-infection. Il pourrait être intéressant de réaliser des études de co-infection pour les mutants $\Delta y2455$, $\Delta y3525$, $\Delta y2894$, $\Delta y1282$ et $\Delta y2880$. Ces résultats montrent que la bioluminescence a permis d'identifier des gènes affectés dans leurs capacités à bloquer la puce.

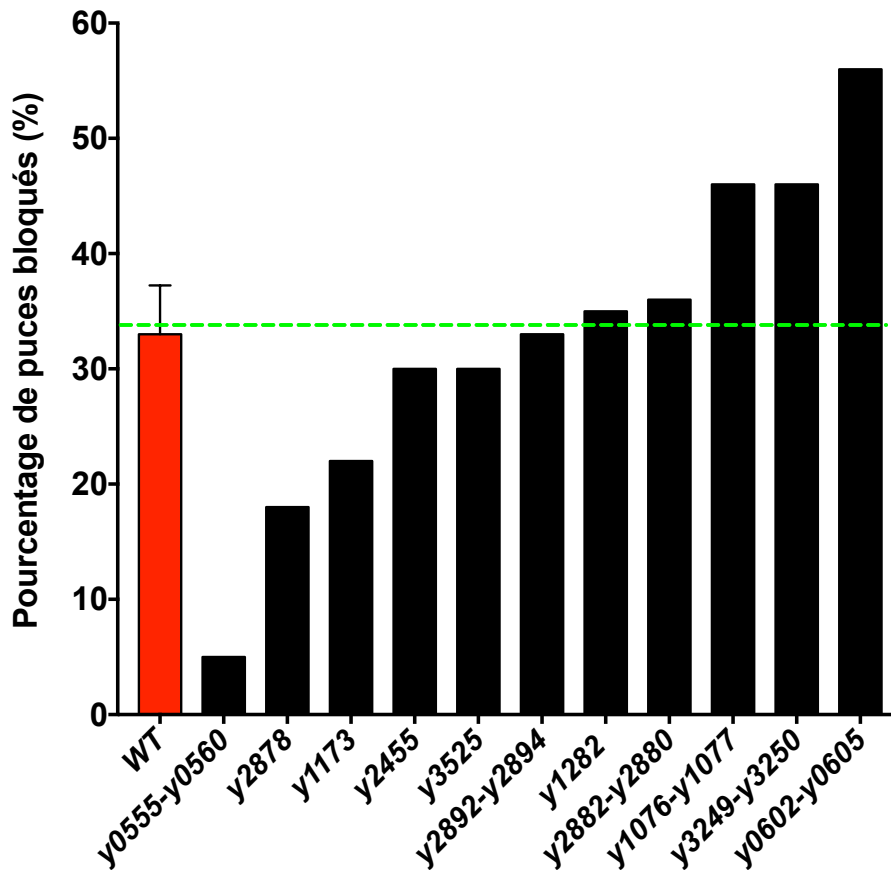


Figure 35 : De nombreux gènes sélectionnés au cours du criblage de la banque de mutants sont affectés dans leurs capacités à bloquer la puce. Le nombre de puces bloquées a été suivi pendant 27 jours. Le diagnostic de blocage a été effectué après nourrissage par observation à la loupe binoculaire. Les résultats sont présentés en pourcentage de puces bloquées sur l'ensemble des 27 jours post-infection.

Pour la suite de l'étude nous allons nous concentrer principalement sur les gènes *y2878* et *y1173* qui montrent tous les deux un plus faible pourcentage de puces bloquées.

Etude de l'implication du gène *y2878* dans la puce

Etude en bioluminescence

Le criblage de la banque de mutant a permis de mettre en évidence le rôle potentiel de *y2878*. En effet, les résultats de bioluminescence montrent un comportement différent comparé à la souche sauvage. Les résultats montrent un plus faible pourcentage de puces lumineuses pour le mutant $\Delta y2878$ (Figure 36A) à J2 et J9 comparé à la souche sauvage ou à la souche complétée. Ce qui montre que l'apport du gène permet un rétablissement du phénotype comme la souche sauvage. La complémentation permet donc de mettre en évidence que le phénotype observé pour le mutant est dû à la mutation du gène cible et non à une éventuelle mutation secondaire. Lorsque l'on regarde la

distribution d'émission de lumière on peut voir que la médiane est légèrement plus faible dans le cas de la souche $\Delta y2878$ (Figure 36B). Ces deux points montrent un comportement différent en bioluminescence pour le mutant $\Delta y2878$ dans la puce. Et donc un possible rôle de ce gène dans l'infection chez l'insecte. Cependant même si la bioluminescence permet d'identifier rapidement des mutants défectueux dans la puce, elle ne permet pas d'identifier le défaut observé (blocage ou colonisation). En effet, il est nécessaire de vérifier ces résultats avec les méthodes usuelles car une mutation pourrait réduire l'activité luciférase de la bactérie sans avoir réellement d'impact sur le développement de la bactérie dans la puce. En outre, la bioluminescence pouvant être un fardeau métabolique, en l'associant avec une autre mutation elle pourrait exacerber le phénotype observé (accentuer ou faire apparaître un défaut). C'est pourquoi il est nécessaire de réaliser les méthodes usuelles d'étude pour confirmer les résultats.

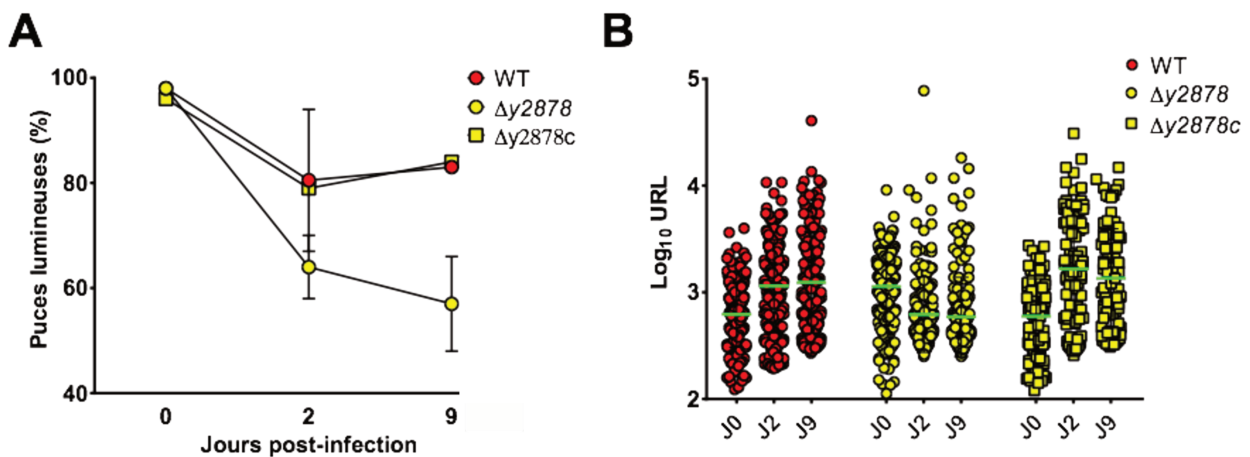


Figure 36 : Le mutant $y2878$ serait requis dans l'infection chez la puce. (A) La figure représente le pourcentage de puces lumineuses à différents temps post infection (J0, J2 et J9) pour les souches sauvage (ronds rouges), $\Delta y2878$ (ronds jaunes) et $\Delta y2878c$ (carrés jaunes) lux⁺. (B) La figure représente la lumière émise par les puces infectées par les souches sauvage (ronds rouges), $\Delta y2878$ (ronds jaunes) et $\Delta y2878c$ (carrés jaunes) lux⁺. Chaque point représente la valeur émise par une puce. Le trait vert représente la médiane des valeurs. Les figures (A et B) représentent la distribution d'émission de lumière des puces infectées à J2 (A) et J9 (B) (% de puce en fonction de l'intensité de la lumière émise) pour les souches sauvage (WT: rouge), et $\Delta y2878$ (jaune).

Capacité de $y2878$ à coloniser la puce

Le gène $y2878$ est impliqué dans le blocage de la puce. Afin de poursuivre l'étude du gène $y2878$, les expériences de blocage et de colonisation ont été réalisées avec des souches non bioluminescentes. Tout d'abord, les résultats de blocage montrent que le mutant $\Delta y2878$ bloque

moins (18%) les puces que la souche de référence (WT : 41% : avec des résultats significativement différents) (Figure 37A). Lorsque l'on apporte la copie sauvage du gène *y2878* sous son propre promoteur au mutant dépourvu de ce gène, le taux de blocage devient de nouveau similaire à la souche de référence. Ces résultats montrent que le gène *y2878* permet à la bactérie de bloquer la puce de manière optimale.

Le défaut de blocage observé peut être dû à un défaut de croissance de la bactérie dans le tube digestif de la puce. Pour vérifier cela, les bactéries présentes dans les puces ont été dénombrées à différents jours post-infection.

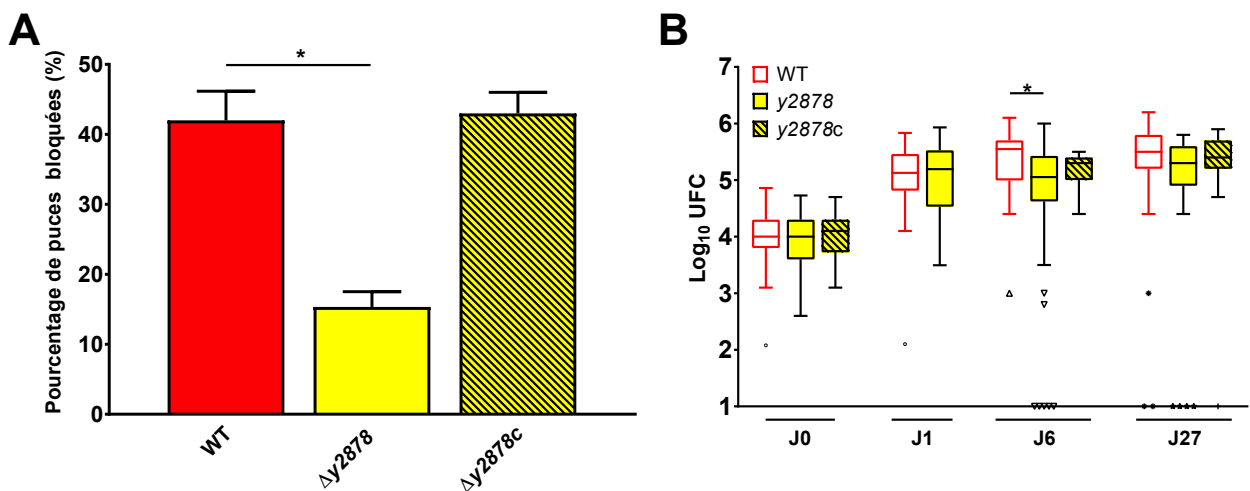


Figure 37 : Le gène *y2878* est un gène requis pour le blocage des puces. Des cohortes de puces ont été infectées avec la souche sauvage (WT), $\Delta y2878$ et $\Delta y2878$ complétée par un plasmide portant le gène *y2878* sous le contrôle de son propre promoteur. (A) Le blocage des puces a alors été observé suite à leur repas sanguin (J6, J9, J13, J16, J20, J23 et J27) pendant une période de 27 jours. Les résultats sont présentés en pourcentage de puces bloquées par souches pendant les 27 jours. (B) La charge bactérienne a été quantifiée par dénombrement sur gélose à J0, J1, J6, J27. Les résultats sont présentés en \log_{10} UFC pour chaque souche à différents jours après l'infection. Les résultats sont significativement différents selon un test Anova à 1 facteur $P < 0,01$ (A) $P < 0,0001$ (B).

Les résultats montrent que la quantité de bactéries ingérées par les puces est identique quelque soit la souche utilisée. Ceci nous permet donc de suivre l'évolution de la charge bactérienne au cours du temps. Les souches $\Delta y2878$ et WT possèdent la même charge bactérienne à J1 alors que la charge bactérienne à J6 de la souche *y2878* est plus faible que la souche sauvage. Cette différence n'est plus observable à J27, ou avec la souche complétée à J6 ou J27 (Figure 37B). Le problème de charge bactérienne de la souche mutante n'est probablement pas dû à un défaut de croissance dans l'insecte mais résulte de son incapacité à bloquer l'insecte de manière optimale. En effet, les

résultats à J1 sont identiques à la souche sauvage, ce qui montre que le mutant est capable de croître. Cependant, le défaut de blocage à J6 peut conduire à une meilleure élimination des bactéries par les fèces par la puce ce qui diminuerait la charge bactérienne dans l'insecte.

Afin de comprendre le défaut de blocage dans la puce, des études de formation de biofilm *in vitro* (nécessaire au blocage) ont été réalisées. Ces résultats montrent que la formation de biofilm de la souche $\Delta y2878$ est comparable dans du BHI à celle de la souche sauvage (Figure 38). Fait intéressant, la souche complétée produit plus de biofilm que la souche sauvage, suggérant que la sur-expression du gène $y2878$ exacerberait la production de biofilm. Les résultats *in vitro* de formation de biofilm ne permettent pas d'expliquer clairement le défaut de blocage pour la souche $\Delta y2878$. En effet, les résultats pourraient suggérer que le gène $y2878$ pourrait favoriser la formation de biofilm, mais qu'en son absence dans un milieu riche le défaut ne soit pas visible. Alors qu'en cas de sur-expression du gène, sa fonction soit mis en évidence par la sur-production de biofilm. Le défaut de blocage peut aussi être dû à une différence de colonisation du proventricule (lieu de formation du biofilm). Ainsi, pour étudier la colonisation de celui-ci des études utilisant la fluorescence ont été réalisées.

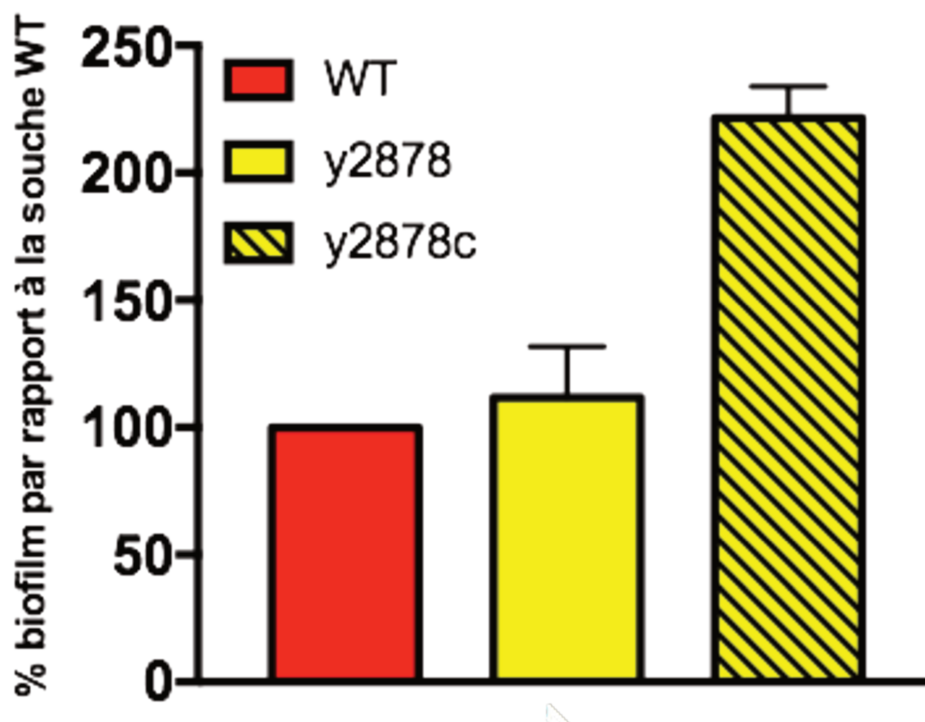


Figure 38: $y2878$ n'est pas requis pour la formation du biofilm *in vitro*. La formation du biofilm des souches WT (rouge), $\Delta y2878$ (jaune) et $\Delta y2878c$ (hachurée jaune) a été quantifiée après 48h de culture à 21° avec agitation dans du BHI. La quantité de biofilm formée est rapportée en pourcentage par rapport à la production de la souche sauvage.

Le gène *y2878* est impliqué dans la colonisation du proventricule de l'insecte.

Des puces infectées par les souches WT, $\Delta y2878$ et $\Delta y2878c$ portant un plasmide permettant l'expression stable et constitutive de la *gfp* (green fluorescence protein) ont été disséquées à différents temps après infection. Les images prises au microscope à fluorescence (Figure 39A) semblent montrer que la quantité de bactéries présentes dans le proventricule pour le mutant $\Delta y2878$ est plus faible que pour la souche sauvage. L'analyse des images de 40 proventricules par souches et par jours, met en évidence que la surface colonisée du proventricule est similaire pour toutes les souches aux différents jours post-infection (pas de résultat significativement différent) (Figure 39B). En revanche l'intensité moyenne de fluorescence, une estimation de la densité bactérienne, est différente pour le mutant $\Delta y2878$ (Figure 39C). En effet, l'intensité à J6 est plus faible de manière significative pour le mutant $\Delta y2878$ par rapport à la souche sauvage. Cette différence n'est plus observable à J13 ou avec la souche $\Delta y2878c$ quel que soit le jour de l'infection. Ces résultats montrent un défaut de colonisation du proventricule qui peut donc expliquer le défaut de blocage observé pour le mutant $\Delta y2878$.

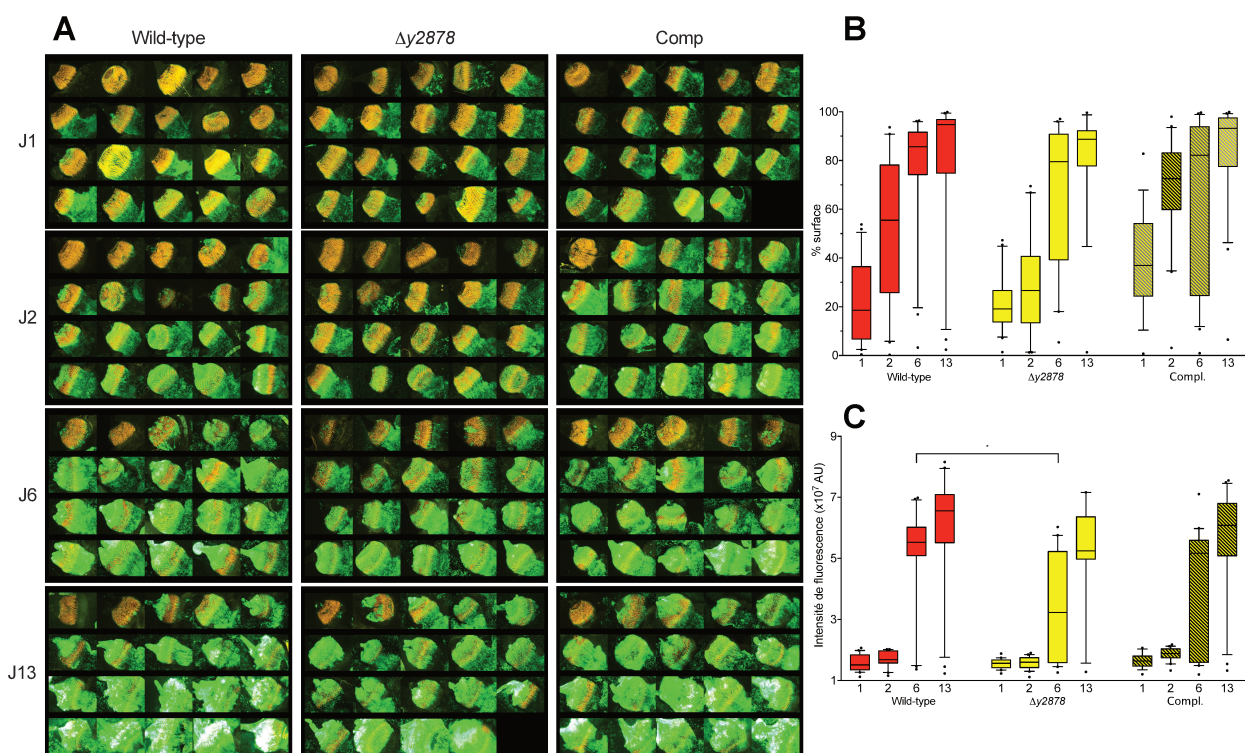


Figure 39 : *y2878* est requis pour coloniser de manière optimale le proventricule. (A) Images de proventricule (en orange) représentatives de l'infection avec des souches *gfp* (vert) WT, $\Delta y2878$ et $\Delta y2878c$ complémentés à différents jours (J1, J2, J6 et J13). (B) Les résultats de la surface de colonisation des différentes souches sont représentés en box-and-whiskers en fonction des jours. (C) Les résultats représentent la fluorescence corrigée totale des cellules de *Y. pestis* sauvage, $\Delta y2878$ et $y2878c$ collectées à différents jours post infection.

Nos résultats préliminaires portant sur le rôle de *y2878* indiquent que ce gène serait soit 1) impliqué dans la colonisation du proventricule qui est nécessaire pour un blocage optimal de la puce. 2) Soit impliqué dans la formation d'un biofilm compact, sa suppression conduirait à la formation d'un biofilm moins dense en bactérie (et donc moins compact). La fonction de ce gène et son homologie avec d'autres gènes de fonction connue ne nous permettent pas de conclure.

Etude de l'implication du gène *y1173* dans la puce

Etude en bioluminescence

Le gène *y1173* semble impliqué dans l'infection chez la puce. Comme pour le gène *y2878* les expériences de bioluminescence ont été réalisées une deuxième fois pour confirmer les résultats. Les résultats en bioluminescence montrent un comportement différent pour la souche $\Delta y1173$. En effet, le pourcentage de puces lumineuses diminue fortement dès J2 post infection (50% vs 81% et 77% pour la souche sauvage et $\Delta y1173c$ respectivement) et qui reste faible à J9 (52% vs 83% et 78%) (Figure 40A). Lorsque l'on regarde l'intensité de lumière émise par les puces infectées par la souche *y1173*, bien qu'il possède une médiane légèrement plus basse, aucune différence significativement différente n'est observée (Figure 40B). Le comportement de la souche $\Delta y1173$ en bioluminescence est donc différent de la souche sauvage, ce qui souligne le rôle potentiel du gène *y1173* dans l'infection. C'est pourquoi les méthodes usuelles de suivi d'infection ont été réalisées pour confirmer les résultats de bioluminescence.

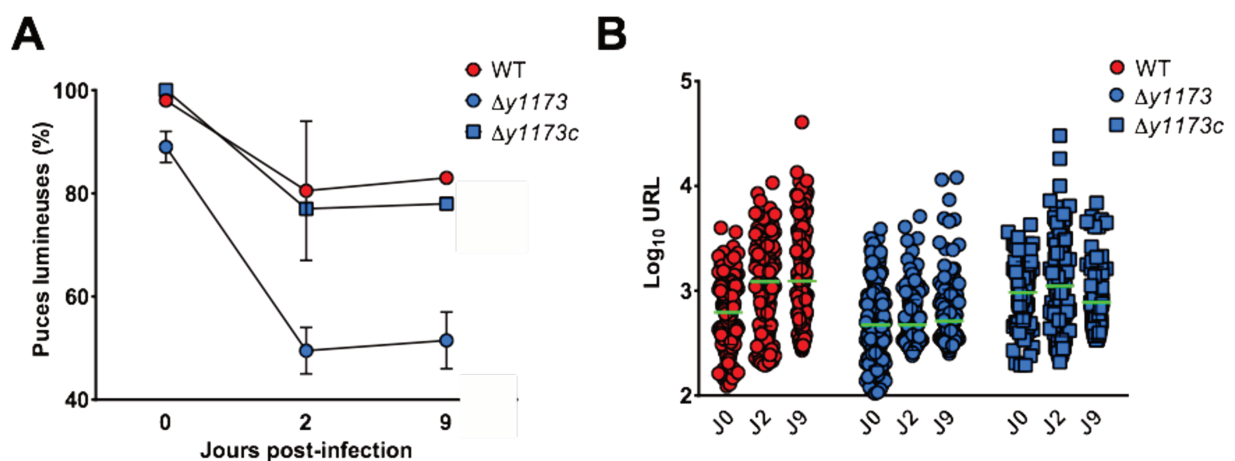


Figure 40 : Le mutant *y1173* serait requis dans l'infection chez la puce. (A) La figure représente le pourcentage de puces lumineuses à différents temps post infection (J0, J2 et J9) pour les souches sauvages (ronds rouges), $\Delta y1173$ (ronds bleus) et $\Delta y1173c$ (carrés bleus) lux+. (B) La figure représente la lumière émise par les puces infectées par les souches sauvage (ronds rouges), $\Delta y1173$ (ronds bleus) et $\Delta y1173c$ (carrés bleus) lux+. Chaque point représente la valeur émise par une puce. Le trait vert représente la médiane des valeurs.

Capacité de *y1173* à coloniser la puce

Le gène *y1173* est impliqué dans la colonisation dans la puce. Des cohortes de puces ont été infectées par la souche sauvage, le mutant $\Delta y1173$ et le mutant $\Delta y1173c$ dans un fond génétique non bioluminescent. Le blocage et la charge bactérienne ont alors été suivis pendant l'infection. Les résultats montrent que le mutant $\Delta y1173$ bloque moins les puces que la souche sauvage (24% vs 40%) (Figure 41A). De plus l'apport du gène *y1173* sous le contrôle de son propre promoteur sur un plasmide conduit à un rétablissement du phénotype comme la souche sauvage. Ainsi les résultats permettent de conclure que le gène *y1173* est nécessaire pour conduire à un blocage optimal de la puce. Afin de déterminer si le défaut de blocage est dû à un problème de colonisation du tube digestif de la puce, la quantité de bactéries dans la puce a été quantifiée à différents jours post-infection. Les charges bactériennes des différentes souches à J0 sont équivalentes, ce qui permet de comparer la quantité de bactéries aux différents jours (Figure 41B). Les résultats montrent des quantités de bactéries beaucoup plus faibles à J6 pour la souche $\Delta y1173$ comparées à la souche sauvage ou à la souche complémente. En revanche ce défaut n'est plus observable après 27 jours d'infection.

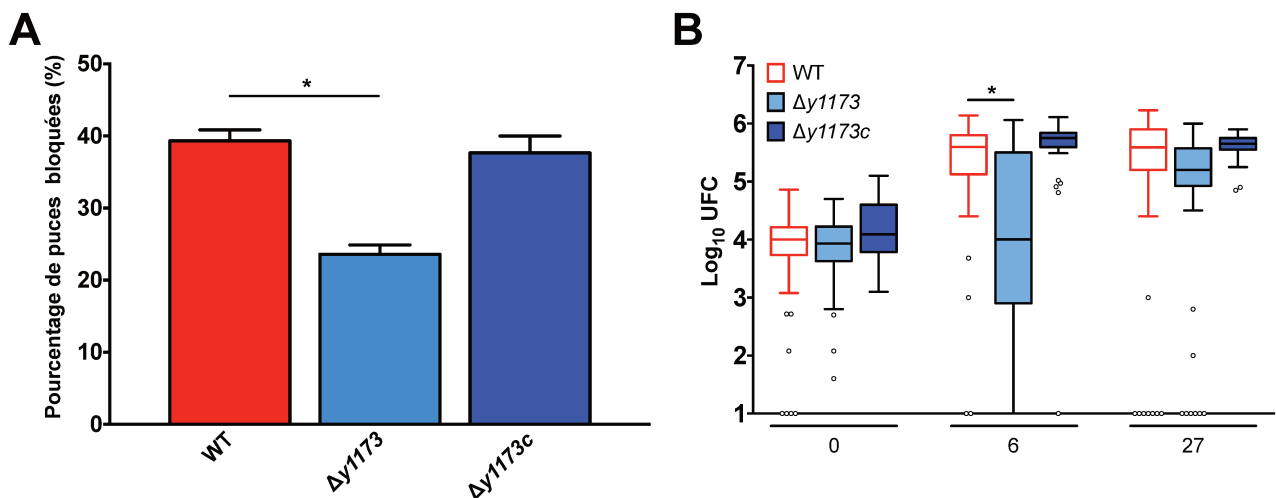


Figure 41 : Le gène *y1173* est un gène requis pour la colonisation des bactéries dans la puce. Des cohortes de puces ont été infectées avec la souche sauvage (WT), $\Delta y1173$ et $\Delta y1173c$ complémente par un plasmide portant le gène *y1173* sous le contrôle de son promoteur. (A) Le blocage des puces a alors été observé suite à leurs repas sanguin (J6, J9, J13, J16, J20, J23 et J27) pendant une période de 27 jours. Les résultats sont présentés en pourcentage de puce bloquées par souches pendant les 27 jours. (B) La charge bactérienne a été quantifiée par dénombrement sur gélose à J0, J6 et J27. Les résultats sont présentés en \log_{10} UFC aux différents jours pour la souche sauvage (en rouge), $\Delta y1173$ (en bleu clair) et $\Delta y1173c$ (en bleu foncé). Les résultats sont significativement différents selon un test Anova à 1 facteur) $P < 0.0001$ (A et B).

Les résultats de blocage et de cinétique de colonisation ont permis de découvrir le rôle du gène *y1173* dans l'infection chez la puce. Nous avons alors décidé d'approfondir l'étude de ce gène. Tout d'abord l'analyse des génomes de *Y. pestis* et d'*E. coli* a permis d'identifier le gène *y1173* comme *lipB* (possédant 61% d'identité avec *E. coli*) codant une octanoyltransférase qui de concert avec le gène *lipA* codant une lipoyl synthase (possédant 92% d'identité avec *E. coli*) permet la lipoylation endogène d'enzymes cibles. D'autre part *lplA* codant une lipoate ligase (possédant 75% d'identité avec *E. coli*) permet de réaliser une lipoylation exogène à partir de lipoate présent directement dans l'environnement. Les enzymes cibles de la lipoylation sont l'oxoglutarate dehydrogenase (OGDH), la pyruvate dehydrogenase (PDH) : deux enzymes clés du cycle de krebs et le système de clivage de la glycine (GCV).

Afin de confirmer le rôle de *lipA* et *lipB* dans la lipoylation chez *Y. pestis*, des complémentations fonctionnelles ont été réalisées. Pour cela les mutants de *E. coli* $\Delta lipA$ et $\Delta lipB$ ont été complémentés par l'apport d'un plasmide portant les gènes *lipB-lipA* de *Y. pestis*. La croissance des différentes souches ont alors été mesurée dans un milieu synthétique avec ou sans lipoate.

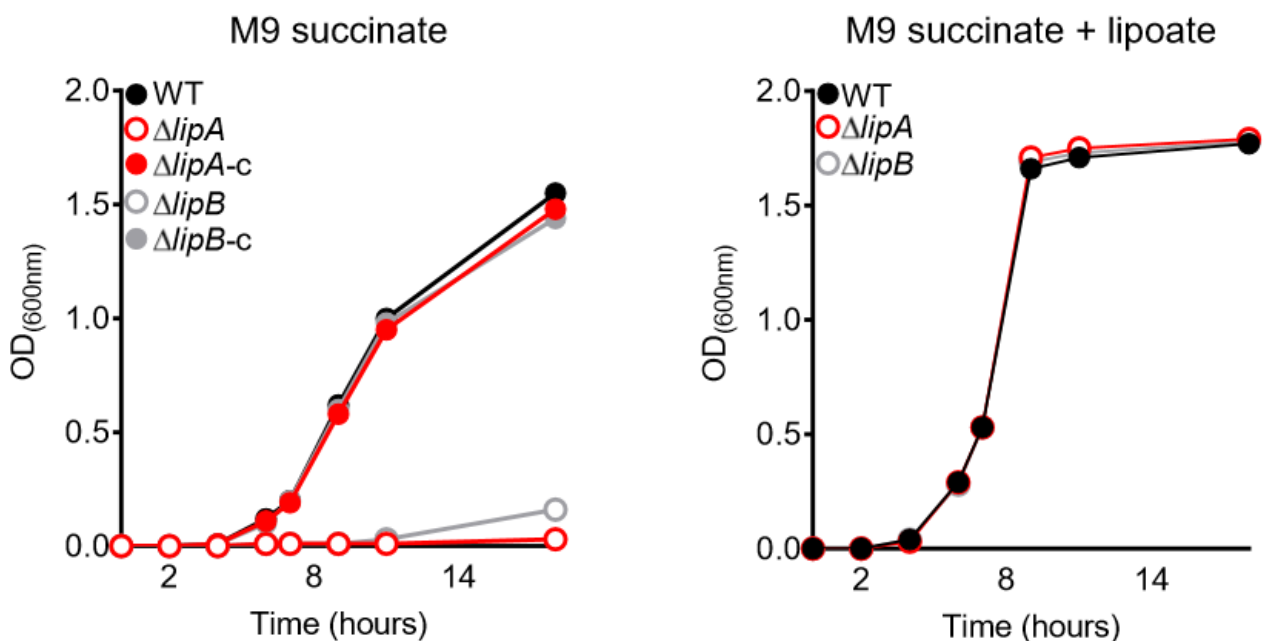


Figure 42 : La complémentation fonctionnelles des gènes *lipA* et *lipB*. La croissance des souches WT, $\Delta lipA$, $\Delta lipB$, $\Delta lipA-c$ et $\Delta lipB-c$ d'*E. coli* a été suivi sur 14h dans un milieu M9 succinate contenant ou non du lipoate. La complémentation a été réalisée par l'apport d'un plasmide contenant les gènes *lipB-lipA* de *Y. pestis*.

Les résultats montrent que les mutants $\Delta lipA$ et $\Delta lipB$ d'*E. coli* sont incapables ou poussent très mal en absence de lipoate, alors qu'ils sont capables de pousser comme la souche sauvage en présence

de lipoate ou lorsqu'ils sont complétés par les gènes de *Y. pestis* et ce quel que soit le milieu (avec ou sans lipoate) (Figure 42). Ces résultats permettent de conclure que le gène *lipA* et *lipB* sont bien chacun impliqués dans la formation de lipoate et par analogie avec *E. coli* codent respectivement une lipoyl synthase et une octanoyltransférase.

Afin de déterminer si un autre de ces gènes de lipoylation est impliqué dans l'infection chez la puce une étude en bioluminescence a été réalisée.

Rôle de la lipoylation dans l'infection de la puce

Tout d'abord, les résultats montrent un pourcentage de puces lumineuses plus faible pour le mutant $\Delta lipA$ (deuxième acteur de la voie endogène de lipoylation), le mutant $\Delta sucAB$ et le mutant $\Delta aceEF$ en plus du mutant $\Delta lipB$ (premier acteur de la voie endogène de lipoylation) (Figure 43A). Tandis que les mutants $\Delta lplA$ (voie exogène de lipoylation), $\Delta gcvTHP$ ne semblent pas affectés. Concernant l'émission de lumière les mutants $\Delta lipA$, $\Delta sucAB$ et $\Delta aceEF$ semblent présenter un défaut dans l'infection chez la puce avec un comportement différent par rapport à la souche sauvage (Figure 43 B). Ainsi, ces résultats préliminaires montrent que les gènes *lipA*, *sucAB* et *aceEF* seraient aussi requis pour l'infection dans la puce. Pour confirmer les résultats de bioluminescence, les méthodes usuelles de blocage et de suivi de cinétique de colonisation ont été appliquées.

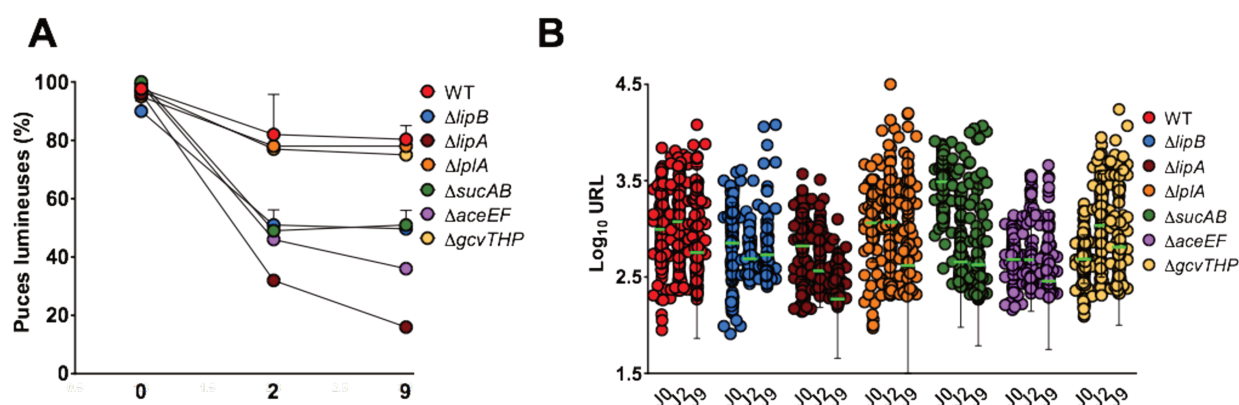


Figure 43 : La lipoylation serait requise pour l'infection. (A) La figure représente le pourcentage de puces lumineuses à différents temps post infection (J0, J2 et J9) (B) la figure représente la lumière émise par les puces infectées pour les souches sauvages (ronds rouges), $\Delta lipB$ (ronds bleus), $\Delta lipA$ (ronds bordeaux), $\Delta lplA$ (ronds violets), $\Delta sucAB$ (ronds verts), $\Delta aceEF$ (ronds mauves) et $\Delta gcvTHP$ (ronds beiges) lux⁺ (A et B). Chaque point représente la valeur émise par une puce. Le trait vert représente la médiane des valeurs.

La lipoylation est nécessaire pour un blocage optimal de *Y. pestis* dans la puce. Le pourcentage de puces bloquées est plus faible lorsqu'elles sont infectées par la souche $\Delta lipA$, $\Delta lipB$ et $\Delta lipB$ -

$\Delta lipA$ (Figure 44). Ces résultats montrent que la voie endogène est nécessaire pour un blocage optimal de la puce. Pourtant le défaut de blocage n'est pas total, cette observation peut être due au fait que la lipoylation n'est pas essentielle pour infecter la puce, ou un deuxième mécanisme de lipoylation. La littérature a permis de mettre en évidence le rôle de *lplA* (mécanisme exogène). Cependant les résultats de blocage montrent que les puces infectées par cette souche ($\Delta lplA$) bloquent de manière comparable à la souche sauvage. En revanche si le mutant utilisé est un double mutant de la voie endogène et exogène ($\Delta lipB-\Delta lplA$) la bactérie est incapable de bloquer l'insecte. De plus, l'apport de la copie sauvage des gènes permet de rétablir le phénotype observé avec la souche sauvage. Concernant les enzymes cibles de la lipoylation, le taux de puces bloquées est identique pour le mutant $\Delta aceEF$, diminué pour la souche $\Delta gcvTHP$ et nulle pour le mutant $\Delta sucAB$ (Figure 44). Ainsi ces résultats permettent de mettre en évidence que la lipoylation est nécessaire pour bloquer la puce. Et que la voie endogène semble avoir un rôle majeur par rapport à la voie exogène dans ce phénomène de blocage. De plus, le plus faible pourcentage de puces bloquées dans des mutants de lipoylation serait plutôt dû à un défaut d'activité de l'enzyme oxoglutarate dehydrogenase ($\Delta sucAB$) et plus faiblement à l'activité du système de clivage de la glycine.

Afin de déterminer si les mutants possédaient des défauts de croissance dans la puce, la quantité de bactéries présente dans la puce a été déterminée à différents jours après infection.

La lipoylation est nécessaire pour la colonisation optimale de *Y. pestis* dans la puce. Les résultats montrent que les mutants de la voie endogène ($\Delta lipB$ et $\Delta lipA$) ont le même comportement concernant la colonisation dans la puce (Figure 44). En effet l'augmentation de bactérie observée chez les puces infectées par la souche sauvage au premier jour après l'infection n'apparaît pas pour les deux mutants de la voie endogène. Cependant, on observe à J2 une pousse des bactéries concernant ces mutants, la quantité de bactéries devenant comparable à la souche sauvage. Alors qu'au sixième jours de l'infection une plus faible quantité de bactérie a de nouveau été mesurée pour ces deux mutants. Enfin, à J27 après infection, les deux mutants possèdent les mêmes charges bactériennes que la souche de référence. Concernant le mutant de la voie endogène de lipoylation ($\Delta lplA$) et le mutant $\Delta sucAB$ (enzyme lipoylée) aucun défaut n'est observable quel que soit le jour post-infection (Figure 44). En revanche, le double mutant de la voie endogène et exogène ($\Delta lipB-\Delta lplA$) possède une charge bactérienne légèrement plus faible à J6 que celle qui avait été ingérée au moment de l'infection. Et une très légère pousse est observée à J27, avec une charge bactérienne bien plus faible que celle de la souche sauvage. Alors que toutes les souches complémentées

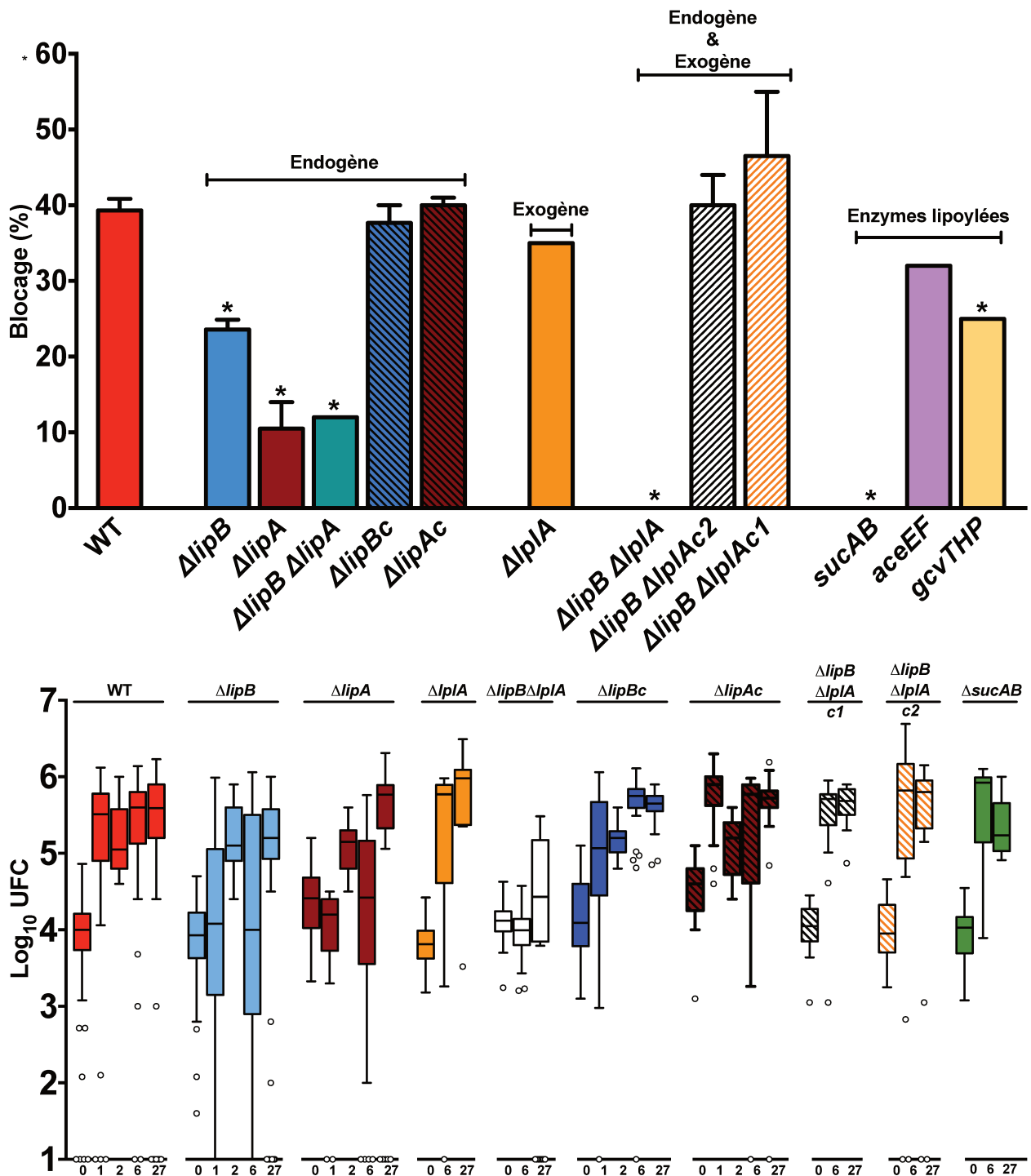


Figure 44 : La lipoylation est nécessaire pour la colonisation de la bactérie chez la puce. Des cohortes de puces ont été infectées avec la souche sauvage (WT), $\Delta lipB$, $\Delta lipA$, $\Delta lplA$, $\Delta lipB-\Delta lplA$, $\Delta lipBc$ (gène *lipB-lipA*), $\Delta lipAc$ (gène *lipB-lipA*), $\Delta lipB-\Delta lplAc1$ (gène *lipB-lipA*), $\Delta lipB-\Delta lplAc2$ (gène *lplA*) $\Delta sucAB$, $\Delta aceEF$, $\Delta gcvTHP$. (A) Le blocage des puces a alors été observé suite à leurs repas sanguin (J6, J9, J13, J16, J20, J23 et J27) pendant une période de 27 jours. Les résultats sont présentés en pourcentage de puces bloquées par souches pendant les 27 jours. (B) La charge bactérienne a été quantifiée par dénombrement sur gélose à J0, J1, J6, J27. Les résultats sont présentés en log₁₀ UFC aux différents jours pour la souche sauvage (en rouge), *y1173* (en bleu clair) et *y1173c* (en bleu foncé). Les résultats sont significativement différents selon un test Anova à 1 facteur) P<0.0001 (A et B).

poussent de manière comparable à la souche sauvage aux différents temps post-infection, ce qui permet de conclure que les effets observés sont bien dû aux gènes testés et non à une éventuelle mutation secondaire. Ainsi les résultats montrent que 1) la lipoylation est nécessaire pour la colonisation chez la puce 2) la voie endogène est la voie prédominante lors de l'infection. Bien que la voie exogène parvienne dans des mutants $\Delta lipA$ et $\Delta lipB$ à compenser l'effet et à conduire à la croissance bactérienne, cette croissance n'est quasiment pas visible chez les puces infectées par le double mutant.

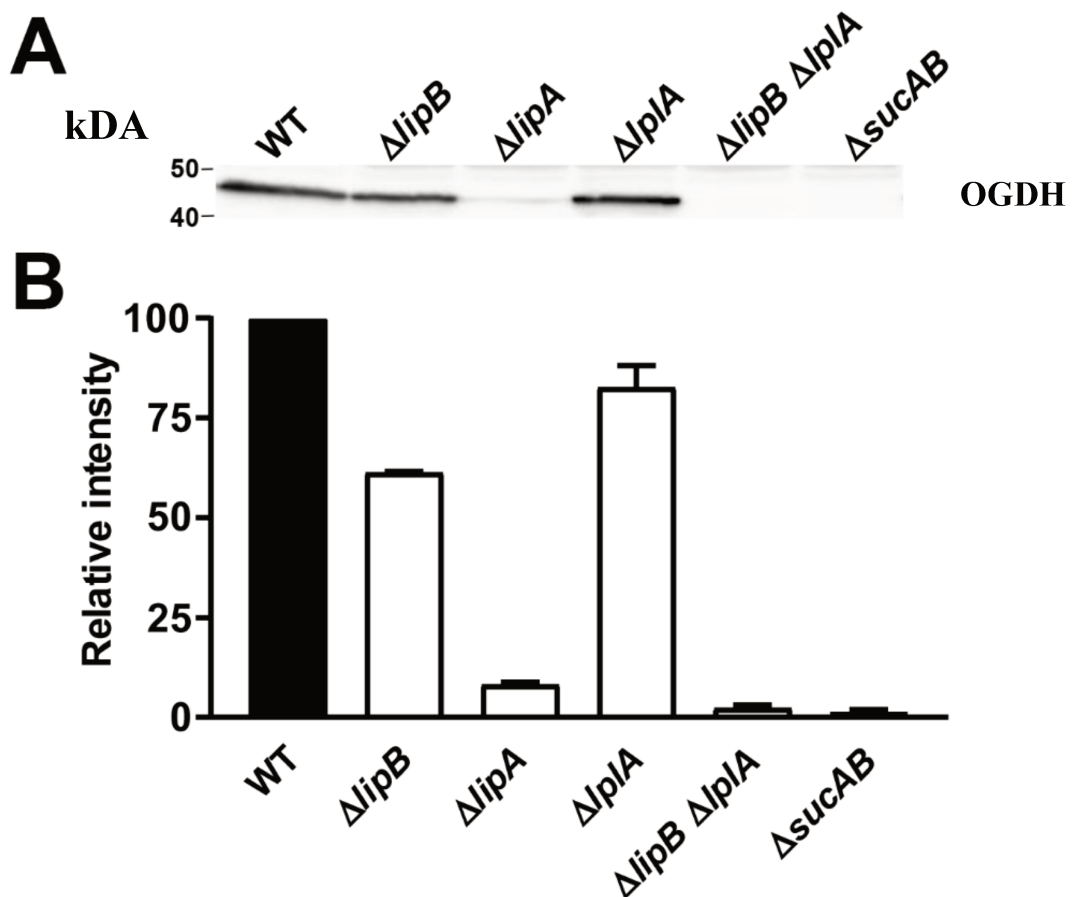


Figure 45 : La lipoylation est diminuée pour les mutants des voies de lipoylation. (A) Immunoblot à partir de lysat bactérien (WT, $\Delta lipB$, $\Delta lipA$, $\Delta lplA$, $\Delta lipB-\Delta lplA$, $\Delta sucAB$) cultivé à 21°C sur la nuit avec agitation dans du LB, révélation des protéines lipoylées à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-lipoïque, la bande observée d'une taille entre 40 et 50 kDa représente l'oxoglutarate déhydrogénase. (B) Histogramme montrant l'intensité de la bande présentée dans l'immunoblot par rapport à la densité obtenue pour la souche sauvage. La moyenne et l'erreur type de la moyenne (SEM) de deux blots sont présentées.

Afin de déterminer si ce défaut de blocage est dû à un problème de lipoylation des enzymes, des études en western blot ont été réalisées.

Rôle de la lipoylation dans la croissance bactérienne

La lipoylation permet une croissance optimale de la bactérie.

La lipoylation des mutants a été testée par immunoblot après culture sur la nuit à 21°C avec agitation dans du LB (Figure 45). La lipoylation de l'oxoglutarate dehydrogenase de la souche sauvage est utilisée pour comparer les souches entre elles. Les résultats montrent que la lipoylation de l'enzyme (OGDH) est légèrement plus faible pour le mutant $\Delta lipA$ (82% par rapport à la souche sauvage), de moitié pour le mutant $\Delta lipB$ (61%), très fortement diminuée pour le mutant $\Delta lipA$ (8%) et nulle pour le double mutant $\Delta lipB-\Delta lipA$ (0%) (Figure 45). Ainsi les mutations des voies de lipoylation conduisent bien à une diminution de la lipoylation. De manière légère pour le mutant $\Delta lipA$, partielle pour le mutant $\Delta lipB$, presque totale pour le mutant $\Delta lipA$ et totale pour le double mutant $\Delta lipB-\Delta lipA$. Bien que les gènes *lipB* et *lipA* agissent dans la même voie de lipoylation, les deux mutants de ces gènes ne montrent pas exactement le même phénotype. La littérature a permis de mettre en évidence que la protéine LplA en plus de son activité lipoate ligase possédait une activité octanoyl-transférase. Nos résultats obtenus semblent donc en accord avec cette constatation. La différence observée entre le mutant $\Delta lipB$ et $\Delta lipA$ serait due à l'activité octanoyl-transférase de la protéine LplA. Alors que la lipoylation du mutant $\Delta lipA$ serait due à la seule activité lipoate ligase de la protéine LplA. Ces résultats sont aussi confirmés par l'étude de blocage qui montre un taux de puce bloquée légèrement supérieur pour le mutant $\Delta lipB$ par rapport au mutant $\Delta lipA$ (Figure 44).

Afin de déterminer si le défaut de lipoylation des enzymes cibles pouvaient conduire au défaut de colonisation dans la puce, des études de croissance dans différents milieux de culture ont été réalisées.

La lipoylation est nécessaire pour la croissance de *Y. pestis*.

L'observation de colonisation dans la puce met en évidence un problème de cinétique de charge bactérienne à J1 mais pas à J2 et de nouveau un défaut à J6. Pour déterminer si ce phénomène est dû à un défaut de croissance, les capacités de croissance des mutants ont été testées dans différents milieux (pauvre contenant ou non du lipoate, ou riche) (Figure 46).

Tout d'abord, la croissance dans le milieu M9, un milieu contrôlé (donc sans apport de lipoate) montre un défaut de croissance pour le mutant $\Delta lipB$ (DO = 0,71 et 0,91 pour la souche sauvage) et une absence de croissance pour le mutant $\Delta lipA$ (Figure 46 A et B). Ces phénotypes ne sont plus

observables lors de la complémentation des deux gènes. Ainsi la croissance dans un milieu sans aucune source de lipote dans l'environnement est diminuée pour les mutants de la voie endogène. Les résultats pour les milieux (LB, BHI et M9 + lipote) contenant des sources de lipote sont différents, en effet la croissance du mutant $\Delta lipB$ est de nouveau comparable à celle de la souche sauvage. Alors que la celle du mutant $\Delta lipA$ augmente selon le milieu.

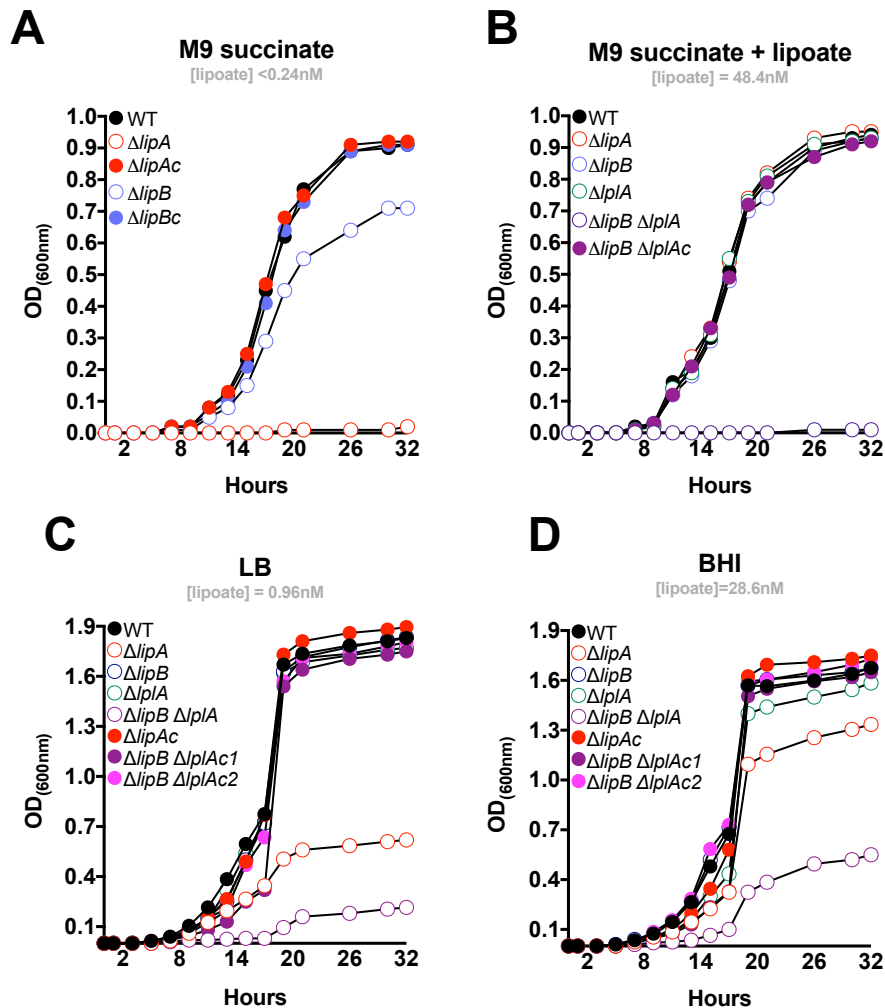


Figure 46 : La lipoylation permet la croissance de la bactérie. La croissance des souches sauvage (ronds noirs), $\Delta lipB$ (ronds bleus), $\Delta lipA$ (ronds rouges), $\Delta lipA$ (ronds oranges), $\Delta lipB-\Delta lipA$ (ronds violets), $\Delta lipBc$ (carré bleus), $\Delta lipAc$ (carré rouges foncés), $\Delta lipB-\Delta lipAc1$ (carrés violets), $\Delta lipB-\Delta lipAc2$ (carrés roses), a été suivie pendant 32h avec agitation à 21° dans des milieux : M9 succinate (dont la source de carbone est du succinate), M9 succinate + lipote (48,4nM), du LB et BHI (deux milieux riches).

La croissance dans le milieu LB est améliorée comparée à celle dans le milieu M9, et encore meilleure dans le milieu BHI. Enfin dans le milieu M9 + lipote le mutant $\Delta lipA$ est capable de croître de façon comparable à la souche sauvage. Concernant le mutant $\Delta lipB-\Delta lipA$, sa croissance dans du milieu M9 est nulle (DO: 0,01), augmente légèrement dans du LB (DO: 0,21) et encore

plus dans le milieu BHI (DO: 0,55). La pousse du double mutant est due à l'apport dans l'environnement des produits des enzymes cibles de la lipoylation : du succinate, de l'acétate et de la glycine. Afin de déterminer si le plus faible taux de blocage des mutants de la voie endogène de lipoylation était dû à un défaut de colonisation du proventricule, des infections avec des bactéries exprimant de la fluorescence ont été réalisées.

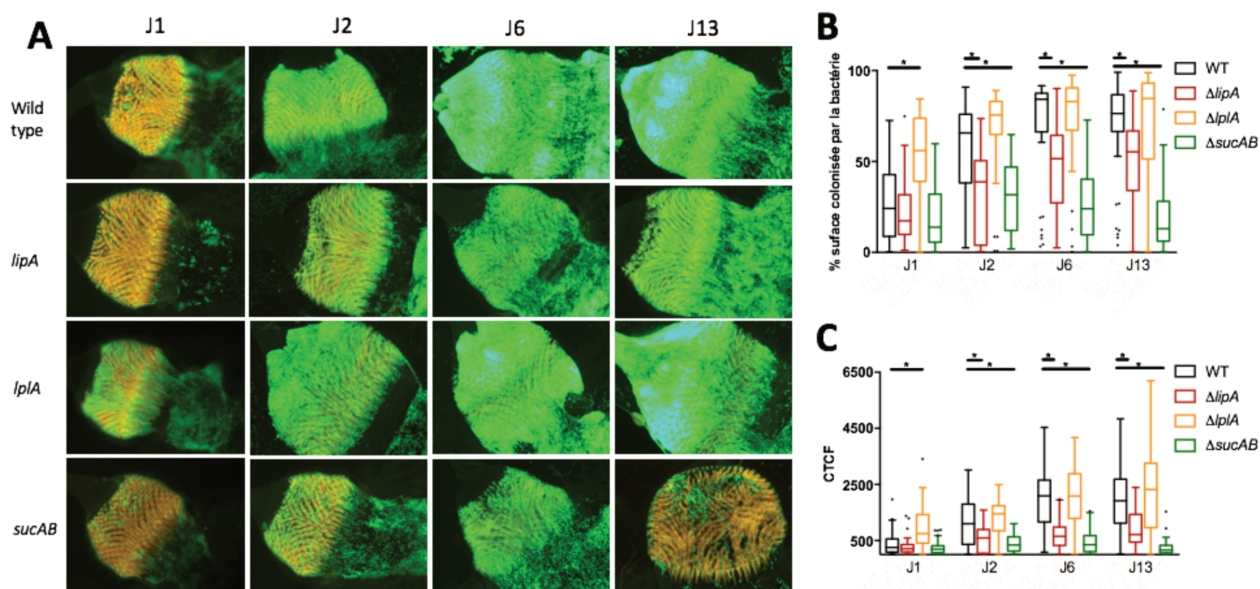


Figure 47 : *lipA* et *sucAB* sont requis pour coloniser de manière optimale le proventricule. (A) Photos de proventricule (en orange) représentatives de l'infection avec des souches *gfp* (vert) WT, *lipA*, *lplA* et *sucAB* à différents jours (J1, J2, J6 et J13). (B) Les résultats de la surface de colonisation des différentes souches sont représentés en box-and-whiskers en fonction des jours. (C) Les résultats représentent la fluorescence corrigée totale des cellules de *Y. pestis* WT, *lipA*, *lplA* et *sucAB* collectées à différents jours post infection.

Rôle de la lipoylation dans la croissance des bactéries dans le proventricule

Les mutants *lipA* et *sucAB* possèdent un défaut de colonisation du proventricule.

Des infections avec les souches sauvage, $\Delta lipA$, $\Delta lplA$ et $\Delta sucAB$ fluorescentes ont été effectués afin de pouvoir observer leurs colonisations au sein du proventricule grâce à la microscopie à fluorescence (Figure 47A). Les images ont ensuite été analysées à l'aide d'ImageJ pour déterminer la surface du proventricule colonisé par les bactéries (Figure 47B) et l'intensité de fluorescence (CTCF : fluorescence corrigée totale des cellules) (Figure 47C) émises par ces dernières. Les résultats montrent que les mutants $\Delta lipA$ et $\Delta sucAB$ possèdent un défaut de colonisation du proventricule par rapport à la souche sauvage observable au niveau de l'intensité de fluorescence émise et la surface de colonisation du proventricule dès J2 et jusqu'à J13. Concernant le mutant $\Delta lplA$, l'intensité et la surface de colonisation sont plus importantes à J1 après l'infection. Cette

différence n'est plus observable aux autres jours après l'infection (J2, J6, J13). Ces résultats montrent que la voie endogène de lipoylation est nécessaire pour que *Y. pestis* colonise de manière optimale le proventricule de l'insecte. De plus le mutant $\Delta sucAB$ codant l'oxoglutarate déshydrogénase possède le même phénotype que $\Delta lipA$, ce qui montre que le défaut observé chez le mutant de la voie endogène pourrait être dû au défaut de lipoylation de l'enzyme codée par *sucAB*. Les résultats montrent donc que 1) les mutants de la voie endogène dépendent de la présence de lipoate dans l'environnement, 2) le mutant $\Delta lipA$ est le « véritable » mutant qui abolit toute la voie endogène (*lplA* ne peut pas pallier le défaut de $\Delta lipA$), 3) la croissance du mutant $\Delta lipB-\Delta lplA$ dépend de la présence des produits des enzymes de lipoylation (succinate, acétate et glycine) et non de la quantité de lipoate de l'environnement.

Afin de déterminer si la quantité de lipoate était réellement le facteur qui permettait d'expliquer le changement de croissance dans les différents milieux, la quantité de lipoate présent dans chaque milieu a été mesurée.

Mesure de la quantité de lipoate dans les milieux

Le mutant *lipA* permet une mesure du lipoate présent dans un milieu synthétique ou dans un échantillon biologique. Afin de déterminer la quantité de lipoate présent dans un milieu de croissance dont la concentration en lipoate est inconnue, nous avons adapté une méthode développée par Herbert et Guest (1968). Dans cette dernière, la croissance d'un mutant $\Delta lipA$ d'*E. coli* est mesurée après 24 heures dans un milieu minimum dans lequel est ajouté un échantillon dont la quantité en lipoate est inconnue. La turbidité mesurée est alors comparée à celle du mutant cultivé dans le milieu minimum supplémenté avec différentes concentrations de lipoate, c'est-à-dire une courbe étalon reflétant la croissance bactérienne en fonction de la quantité de lipoate disponible dans le milieu. Dans notre méthode, nous avons utilisé un mutant $\Delta lipA$ de *Y. pestis* et l'avons cultivé dans un milieu M9 contenant du succinate comme source de carbone (comme la méthode d'Herbert et Guest), et la mesure du lipoate est effectuée par dénombrement bactérien (UFC) sur gélose LB. Nous avons trouvé que notre gamme étalon était linéaire pour des quantités de lipoate comprises entre 0,1 ng et 2 ng, et que le coefficient de corrélation de cette partie linéaire est très élevée ($R^2=0,9878$) (Figure 48). Grâce à cette méthode, nous avons mesuré la quantité de lipoate dans différents milieux de culture et dans le tube digestif de la puce. Nos données montrent que le milieu BHI contenait une quantité de lipoate de 5,9 ng/mL, alors que le LB et le milieu M9 contiennent respectivement 0,25 ng/mL et moins de 0,1 ng/mL (limite de détection de la méthode).

Grâce ces données, nous avons pu conclure que la croissance du mutant $\Delta lipA$ de *Y. pestis* était corrélée avec la concentration de lipoate présent dans le milieu de croissance (c'est à dire croissance en BHI>LB>M9).

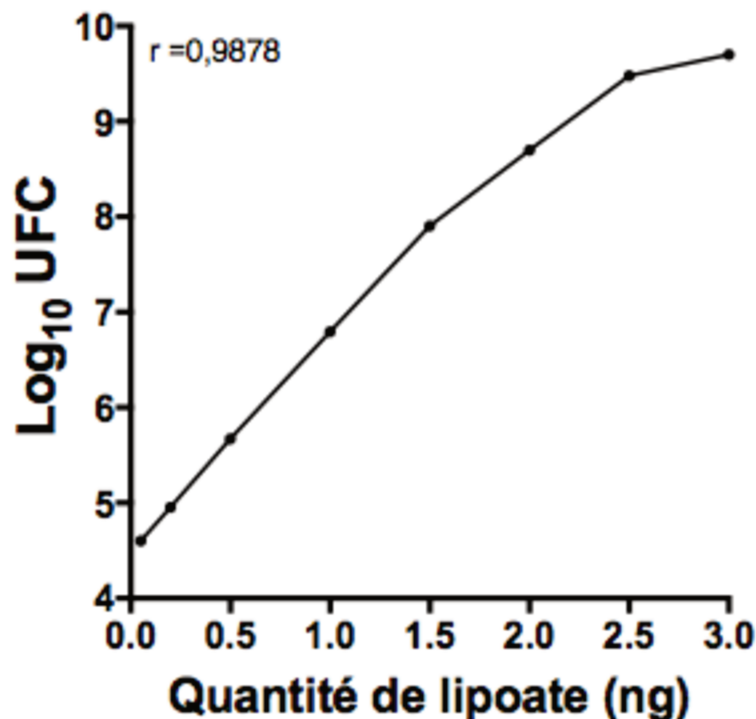


Figure 48 : La croissance du mutant $lipA$ permet la quantification de lipoate dans un échantillon. Un dénombrement bactérien a été réalisé après 22 heures de croissance du mutant $\Delta lipA$ dans un milieu M9 contenant du succinate comme source de carbone et différentes quantités de lipoate dans le milieu. Les résultats sont présentés en \log_{10} UFC en fonction des différentes quantités de lipoate. La corrélation de spearman r est indiquée.

Sachant que le lipoate permettait de rétablir la croissance des mutants de la voie endogène, nous avons voulu déterminer si ce phénomène dépendait de $lplA$ en condition *in vitro* mais aussi dans la puce. Pour cela nous avons testé la capacité de croissance des mutants $\Delta lplA$, $\Delta lipB$ et la souche sauvage dans du sang en présence de 8 bromo-acid octanoic (8 BrO) : un analogue du lipoate qui ne permet pas l'activation des enzymes cibles.

Implication de $lplA$ dans l'infection

$LplA$ est actif en culture *in vitro* est dans la puce.

Afin de déterminer si la protéine $LplA$ est impliquée dans la lipoylation en milieu *in vitro*, la croissance de la souche sauvage, du mutant $lipB$ (voie endogène) et du mutant $\Delta lplA$ (voie exogène)

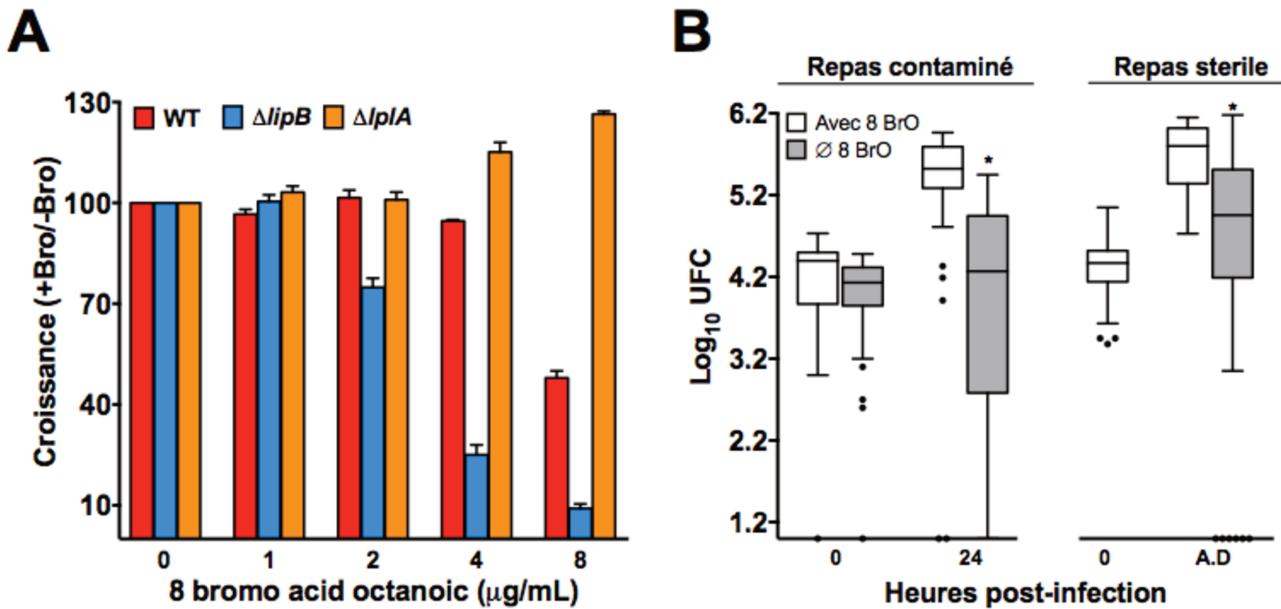


Figure 49 : *lplA* est actif en culture in vitro et dans la puce. La croissance des souches sauvage, *lipB* et *lplA* a été testée en culture dans du sang contenant différentes concentrations de 8 bromo-acid octanoic (8 BrO). La croissance a été mesurée après 6 heures sous agitation. (A) Les résultats sont présentés comme un taux de croissance par rapport à la condition sans 8 BrO. Des cohortes de puces ont été infectées avec des souches WT avec ou non 8 μg/mL de 8 BrO. Les charges bactériennes ont alors été quantifiées à J0 et J1 (B à gauche). Des cohortes de puces ont été infectées avec la souche sauvage, puis à J2 ces puces ont été nourries avec du sang non contaminé contenant du 8 BrO ou non. (B à droite) Les puces ont alors été récupérées 24 heures après défécation et la quantité de bactérie a alors été mesurée. (B) La figure en box-and-whiskers représente la quantité de bactérie en log₁₀ UFC après différents temps après infection.

dans du sang contenant différentes concentrations de 8 bromo-acid octanoic a été mesurée. Le 8 bromo acid octanoic est un analogue du lipoate qui ne permet pas l'activation des enzymes cibles de la lipoylation. Ainsi la croissance des bactéries l'ayant incorporé devrait diminuer fortement. Les résultats *in vitro* montrent pour la souche sauvage, un effet de l'analogue à des concentrations de 4 et 8 μg/mL, avec une diminution de croissance de 5% et 52% respectivement (Figure 49A). Pour le mutant *ΔlipB*, nous observons un effet plus marqué et à des concentrations plus faibles comme attendu. En effet, le mutant *ΔlipB* étant défaillant pour la voie endogène devrait utiliser la voie exogène de manière prépondérante par rapport à la souche sauvage. Or, un défaut est observé pour ce mutant à une concentration en 8 BrO de 2, 4 et 8 μg/mL, avec une diminution respectivement de 25%, 75% et 81%. En revanche, le mutant *ΔlplA* (de la voie exogène) incapable d'incorporer du lipoate ne possède aucun défaut de croissance quel que soit la quantité de 8 BrO utilisée. Ainsi cette expérience met en évidence que LplA est actif dans la bactérie en culture dans du sang. De plus, cela a permis de découvrir la quantité d'analogue à utiliser pour l'étude dans la puce. L'expérience a

donc été réalisée pour déterminer si LplA était actif dans la puce bien que ce mutant ne possède pas de défaut dans la puce (colonisation et blocage).

Des cohortes d'insectes ont tout d'abord été infectées avec du sang contaminé par une souche sauvage de *Y. pestis* contenant ou non du 8 bromo-acid octanoic (Figure 49B). La charge bactérienne mesurée après 24 heures d'infection est plus faible lorsque du 8 BrO a été utilisé. Ce qui montre que la bactérie n'est pas parvenue à croître après l'infection. Ainsi, ces résultats mettent en évidence que la protéine LplA peut être active et être utilisée par la bactérie pendant la période précoce de l'infection. Cependant, l'effet observé au cours de cette expérience, aurait pu être dû à l'incorporation de l'analogue au moment de la mise en contact des bactéries dans le sang contenant du 8 BrO et non à une incorporation dans la puce.

Pour exclure cette possibilité, les puces ont été infectées avec la souche sauvage. Les puces ont été collectées et incubées, puis nourries deux jours après l'infection avec du sang contenant ou non du 8 BrO (Figure 49A). Ensuite les puces ont été observées afin de déterminer le moment de leurs défécations pour pouvoir les collecter 24 heures après. La défécation ayant permis un évincement des bactéries par la puce, les bactéries présentes dans les insectes avec l'analogue devraient donc ne pas être capable de croître de nouveau pour pallier cet évincement. Les résultats montrent une charge bactérienne plus faible dans la condition avec du 8 BrO par rapport à celle sans. Ce qui montre que les bactéries ayant reçu l'analogue n'ont pas re-colonisées le tube digestif de la puce aussi bien que les bactéries non traitées. Ceci prouve bien que LplA peut être utilisé par la bactérie dans le tube digestif de la puce pendant la période précoce de l'infection mais aussi aux périodes plus tardives.

Cependant l'étude de colonisation des mutants de lipoylation a permis de mettre en évidence des défauts de croissance des mutants de la voie endogène à certains moments de l'infection (J1 et J6), ce qui montre que LplA ne parvient pas à compenser ces mutations pendant certaines périodes de l'infection. Afin de déterminer les périodes pendant lesquelles les mutants de la voie endogène possèdent des défauts de croissance, la capacité à croître du mutant $\Delta lipA$ et de la souche sauvage ont donc été testés dans la puce à différents temps après le nourrissage. De même, la quantité de lipoate a été mesurée en utilisant la méthode décrite précédemment, afin de mettre en évidence que les défauts du mutant $\Delta lipA$ sont bien à la présence ou non de lipoate dans le tube digestif de l'insecte.

lipA permet la croissance de la bactérie pendant certaine période après l'infection. `

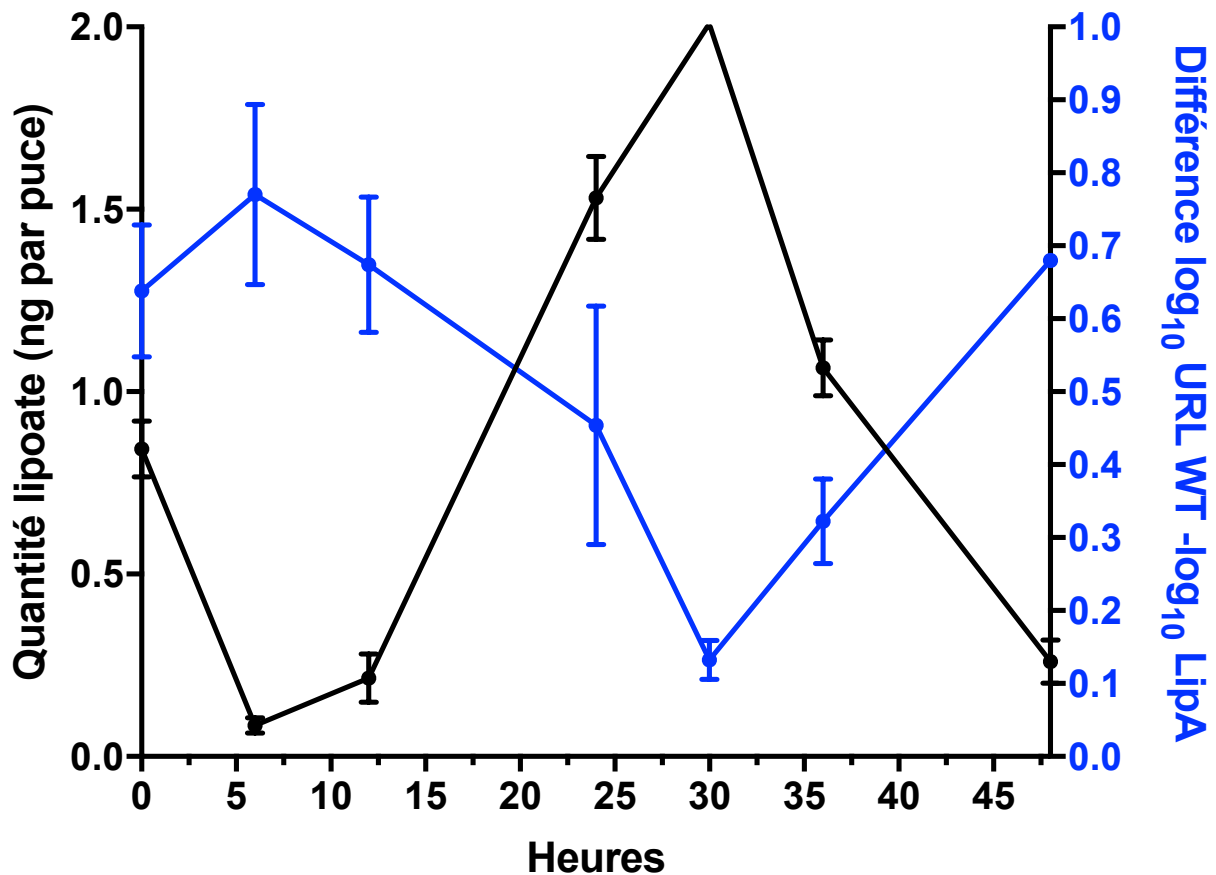


Figure 50: La croissance du mutant $\Delta lipA$ dans la puce dépend de la concentration en lipote. Les capacités de croissance des souches $\Delta lipA$ et sauvage lux+ ont été mesurées après 10 heures de culture dans du contenu de tube digestif de puce après différents temps post-nourrissage. Les résultats sont représentés avec la différence d'émission de lumière entre la souche sauvage et le mutant $\Delta lipA$ en log₁₀ URL (courbe bleue). La quantité de lipote contenue dans les tubes digestifs récoltés à différents temps après nourrissage a aussi été mesurée. La quantité de lipote est représentée en ng par puce (courbe noire).

Des cohortes de puces ont été nourries avec du sang non contaminé. Puis les puces s'étant nourries ont été collectées afin d'être disséquées pour récupérer le contenu des tubes digestifs de 20 puces à différents temps post-nourrissage (T0, T6, T12, T24, T30, T36 et T48 heures). Le contenu de ces tubes digestifs a alors été utilisé pour déterminer la quantité de lipote présent ou comme milieu de culture pour les souches $\Delta lipA$ et sauvage lux+. La luminescence émise par ces bactéries a alors été mesurée au cours du temps (Figure 50, ligne bleue). Les résultats montrent tout d'abord un défaut de croissance du mutant $\Delta lipA$ (comparé à la souche sauvage) à T0 post nourrissage, cette différence de croissance persiste et augmente légèrement par la suite à T6 et diminue légèrement à

T12. En revanche à T24 cette différence commence à diminuer et devient encore plus faible à T30. Cependant au de la du T30, la différence de croissance devient de nouveau plus élevée. La quantité de lipoate présent dans le tube digestif de la puce est en corrélation avec ces résultats (Figure 50, ligne noire). En effet, la quantité de lipoate présente dans les temps précoces après le nourrissage à T0 jusque T12, est faible puis augmente à T24 et T30 qui diminue de nouveau à T36 et encore plus à T48. Ainsi ces résultats mettent en évidence que la quantité de lipoate varie au cours de l'infection chez la puce et que cela modifie la capacité du mutant $\Delta lipA$ à croître dans la puce. En particulier à T30 avec une augmentation de la quantité de lipoate dans le tube digestif de la puce. Ce phénomène est peut-être lié à la digestion de la puce et en particulier à la lyse des globules rouges. Afin de vérifier cette hypothèse, la croissance du mutant $\Delta lipA$ a été testée dans du sang, du sérum, des globules rouges et des globules rouges lysés.

Le mutant $\Delta lipA$ est capable de pousser dans du sang, du sérum et des globules rouges lysés.

Les résultats de croissance montrent que le mutant $\Delta lipA$ ne possède pas de défaut de croissance dans du sang, du sérum et dans les globules rouges lysés (Figure 51), alors que ce mutant possède un défaut de croissance dans les globules rouges non lysés. Concernant le mutant $\Delta lipB-\Delta lipA$ un défaut de croissance dans les 4 conditions testées est observé (Figure 51). La capacité de croissance du double mutant est identique dans ces 4 conditions, ce qui montre que l'apport en produit des enzymes lipoylées est similaire dans chacune des conditions, suggérant que la quantité en lipoate dans les milieux : sang, sérum et globules rouges lysés est plus forte que celle dans les globules rouges. Cette conclusion est concordante avec la quantification du lipoate, qui a permis de montrer que le sang contient 46,5 nM de lipoate alors que le plasma en contient 87,7 nM, les globules rouges lysés 88,7 nM et les globules rouges en contiennent seulement 2,9 nM. Ces résultats permettent donc de conclure que la lyse des globules rouges conduit à la libération de lipoate en condition *in vitro*. Afin de déterminer si la lyse des globules rouges dans la puce est bien responsable de l'augmentation du lipoate observée 30 heures après-nourrissage, la lyse des globules rouges a été observée dans la puce.

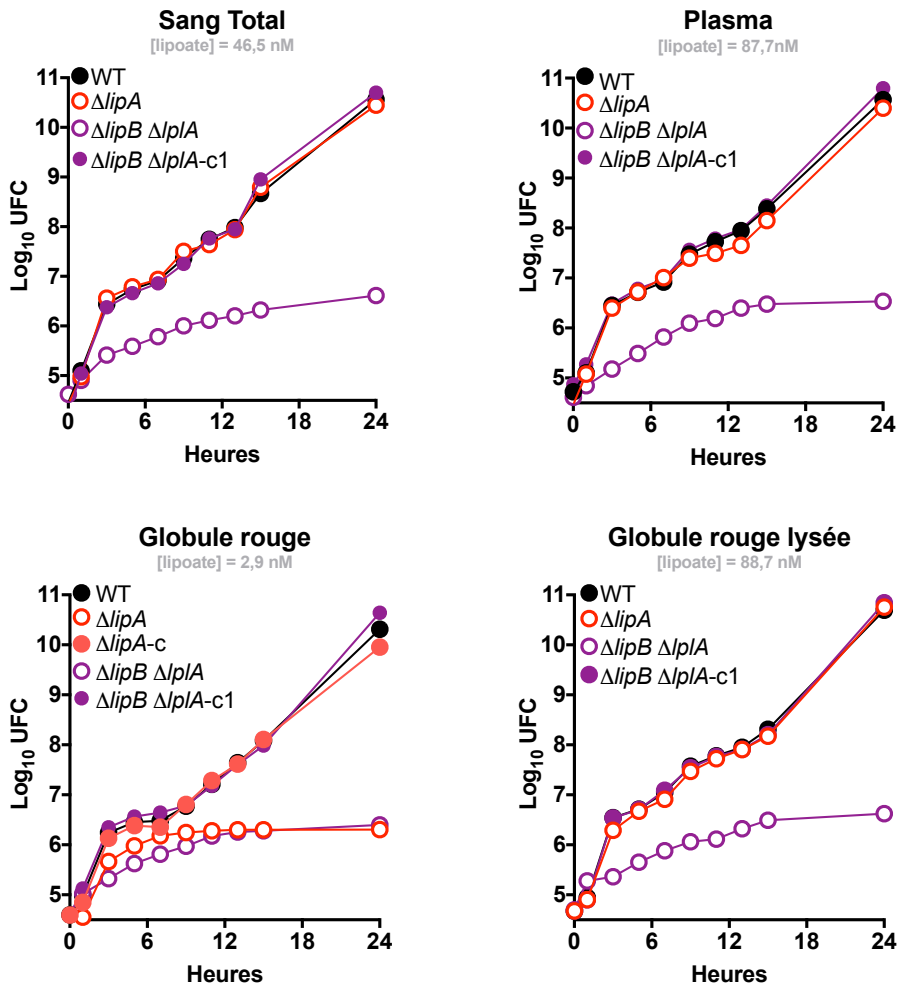


Figure 51 : La lyse des globules rouges conduit à la libération de lipote. La croissance des souches sauvage (ronds noirs), $\Delta lipA$ (ronds rouges), $lipA-c$ (ronds pleins rouges), $\Delta lipB-\Delta lplA$ (ronds bleu) et $\Delta lipB-\Delta lplAc1$ (carré violet) a été suivie pendant 24h dans du sang (panel en haut à gauche), du plasma (en haut à droite), des globules rouges (bas à gauche) et des globules rouges lysés (en bas à droite). Les résultats sont présentés en \log_{10} UFC en fonction du temps. La quantité de lipote pour chaque milieu est indiquée en nM.

La lyse des globules rouges à lieu dans les 6 premières heures après nourrissage.

Des puces ont été disséquées à différents temps après nourrissage, afin d'observer l'état des globules rouges au cours du temps au microscope électronique. Les résultats montrent une forte quantité de globules rouges juste après l'ingestion de sang par la puce (Figure 52A). En revanche, 6 heures après infection les globules rouges ont presque complètement disparus dans le tube digestif de la puce (Figure 52B), ce qui est concordant avec les résultats obtenus dans la littérature. Ces résultats montrent que l'augmentation de la quantité de lipote observée à 30h après l'ingestion de sang par la puce, ne peut être due à la lyse des globules rouges qui a lieu après 6 heures. Cela peut être due au fait que la lyse des globules rouges permet de libérer du lipote mais non disponible

pour la bactérie. Et que la digestion du sang dans la puce par l'intermédiaire d'enzyme digestive permet de libérer le lipoate après 12h post nourrissage. Pour vérifier cette hypothèse, des tests de croissance dans le contenu du tube digestif de la puce après digestion avec la protéinase K (proK) a été effectués. La protéinase K libère des tripeptides lipoylés à partir des enzymes lipoylés qui peuvent être utilisés par certaines bactéries.

***Y. pestis* peut utiliser les peptides lipoylés pour rétablir sa croissance dans le contenu du tube digestif de la puce.**

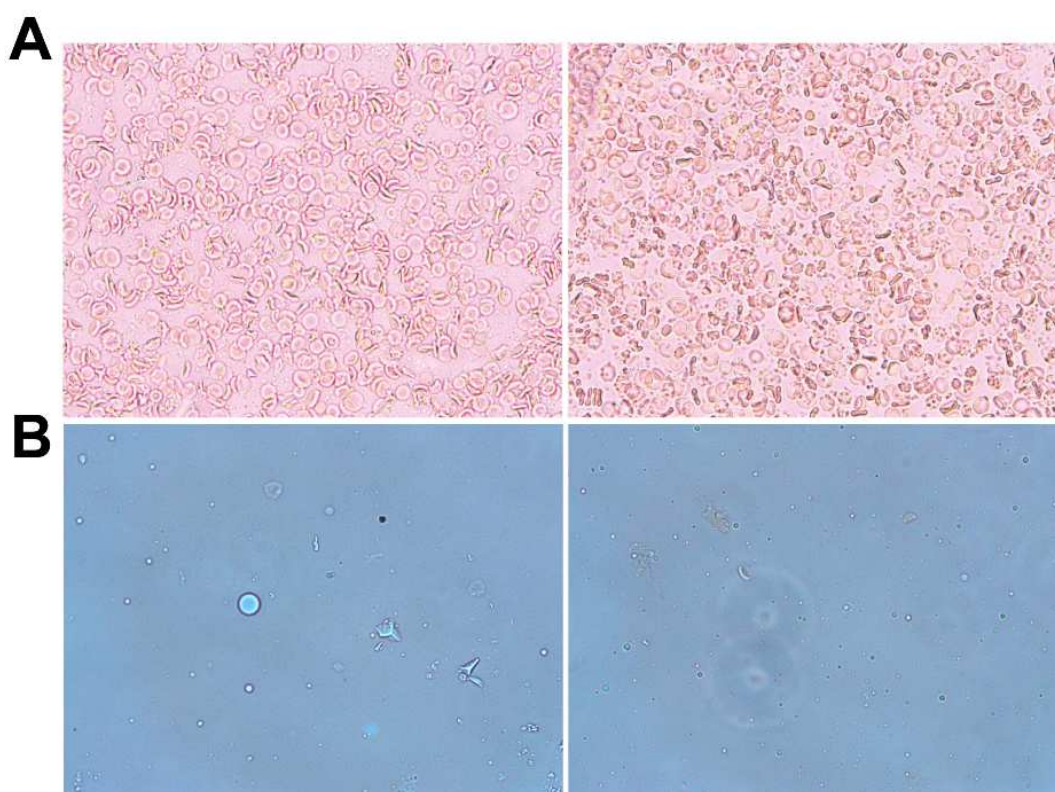


Figure 52 : Contenu du tube digestif de puce à différents temps après ingestion. A) Juste après nourrissage. B) 6 heures après nourrissage. Les photos sont représentatives de différents tubes digestifs.

Les contenus du tube digestif de puces collectées à différents temps après nourrissage (0h, 6h, 12h, 24h, 30h, 36h, 48h) ont été traités à la protéinase K afin de tester la capacité du mutant $\Delta lipA$ à pousser dans ceux-ci pour la comparer à la croissance de la souche sauvage (Figure 53). Les résultats montrent que le traitement à la proK permet de rétablir la croissance du mutant comme la souche sauvage au temps T0 jusqu'au T30 après nourrissage. En revanche au temps T36 et T48 le traitement à la proK ne permet plus de rétablir le défaut de croissance du mutant $\Delta lipA$. Ces résultats montrent que *Y. pestis* est capable d'utiliser les tripeptides lipoylés pour rétablir son métabolisme lipoïque.

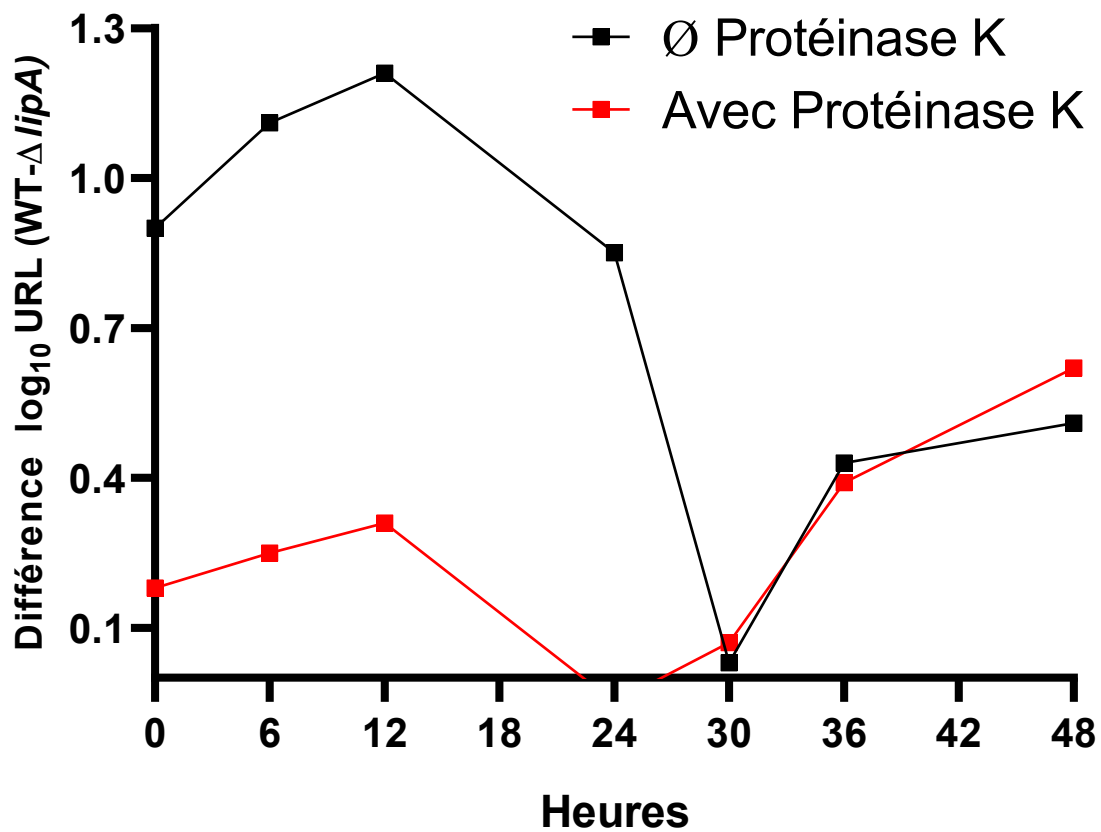


Figure 53 : La digestion à la protéinase K permet au mutant $\Delta lipA$ de pousser dans le contenu du tube digestif de la puce. La figure montre la différence d'émission lumineuse entre la souche sauvage et le mutant $\Delta lipA$ en \log_{10} dans le contenu du tube digestif collecté à différents temps après nourrissage traité (rouge) ou non (noir) à la protéinase K.

Discussion

Les mécanismes d'infection, reflet de la coordinations spatio-temporelle de programmes moléculaires mis en place par *Y. pestis* pour coloniser la puce, sont encore peu connus. Il apparaît donc nécessaire de les étudier afin de mieux comprendre les mécanismes complexes sur lesquels reposent ces processus. Afin de dévoiler ces mécanismes, des approches *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées mais elles ne fournissent qu'une vision limitée des processus mises en place dans l'insecte. En outre, une étude transcriptomique comparative a permis de mettre en évidence des gènes qui étaient sur-exprimés dans la puce comparée à des bactéries cultivées en condition *in vitro* (Vadyvaloo *et al.*, 2010). Cependant, ces données ne permettent pas d'établir la nécessité de ces locus géniques dans la colonisation de l'insecte. Nous avons donc choisi de construire une banque de mutants dépourvus de ces locus surexprimés dans l'arthropode et d'étudier le rôle de ce dernier dans la transmission de la peste. Cependant, les méthodes usuelles d'études de l'infectivité dans la puce sont longues et coûteuses et ne permettent pas de réaliser des expériences à haut débit. De nouvelles approches ont bien été élaborées pour étudier des banques de mutants chez l'animal, mais ces techniques utilisent généralement des inoculum non physiologique et/ou regroupent les mutants entre eux ce qui peut biaiser les conclusions. Ainsi, l'étude *in vivo* individuel de mutant reste la méthode par excellence pour identifier des facteurs de virulence aussi bien chez le mammifère que leurs ectoparasites associés.

Afin d'entreprendre le criblage d'une banque de mutant à « haut-débit » dans l'insecte, nous avons développé une nouvelle approche d'analyse en utilisant la bioluminescence. Pour cela, nous avons déterminé si la bioluminescence permettait 1) de suivre l'infection de *Y. pestis* dans la puce 2) de corrélérer la charge bactérienne et la lumière émise par ces bactéries au cours de l'infection, 3) de diagnostiquer des puces bloquées, 4) d'étudier l'effet de condition physique sur l'infection dans la puce, 5) de discriminer des mutants possédant un défaut de colonisation et/ou de blocage dans l'insecte.

Nos résultats montrent que 1) la bioluminescence permet de suivre l'infection pendant au moins 27 jours, avec 70% des puces qui restaient lumineuses sur toute la durée des tests. 2) La corrélation entre la charge bactérienne et la quantité de lumière émise est bonne juste après l'infection, diminue fortement dès J2 pour remonter à J27. Cependant, nos résultats montrent une corrélation bien plus faible que ceux dans du BHI ($R^2 : 0.96$ (Sun *et al.*, 2012)), dans du sang ($R^2 : 0.99$), dans le poumon ($R^2 : 0.96$) et le foie ($R^2 : 0.99$). La raison de ce défaut de corrélation à J0 dans la puce est probablement la couleur du bol alimentaire de la puce. En effet, ce dernier pouvait être rouge ou noire (Figure 28). Les résultats montrent que la corrélation est meilleure pour les puces noires (Fig

28). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la couleur du bol alimentaire des puces noires est uniforme quel que soit les puces sélectionnées alors que « l'intensité » du rouge peut varier selon l'insecte (Figure 54). Ce phénomène pourrait conduire à une absorption de la luminescence différente pour une même quantité de bactérie selon la couleur de la puce, et donc un défaut de corrélation.

La corrélation faible des jours 2 à 27 serait quant à elle est due à des différences de métabolisme des bactéries (phase de croissance, phase stationnaire ou en dormance).

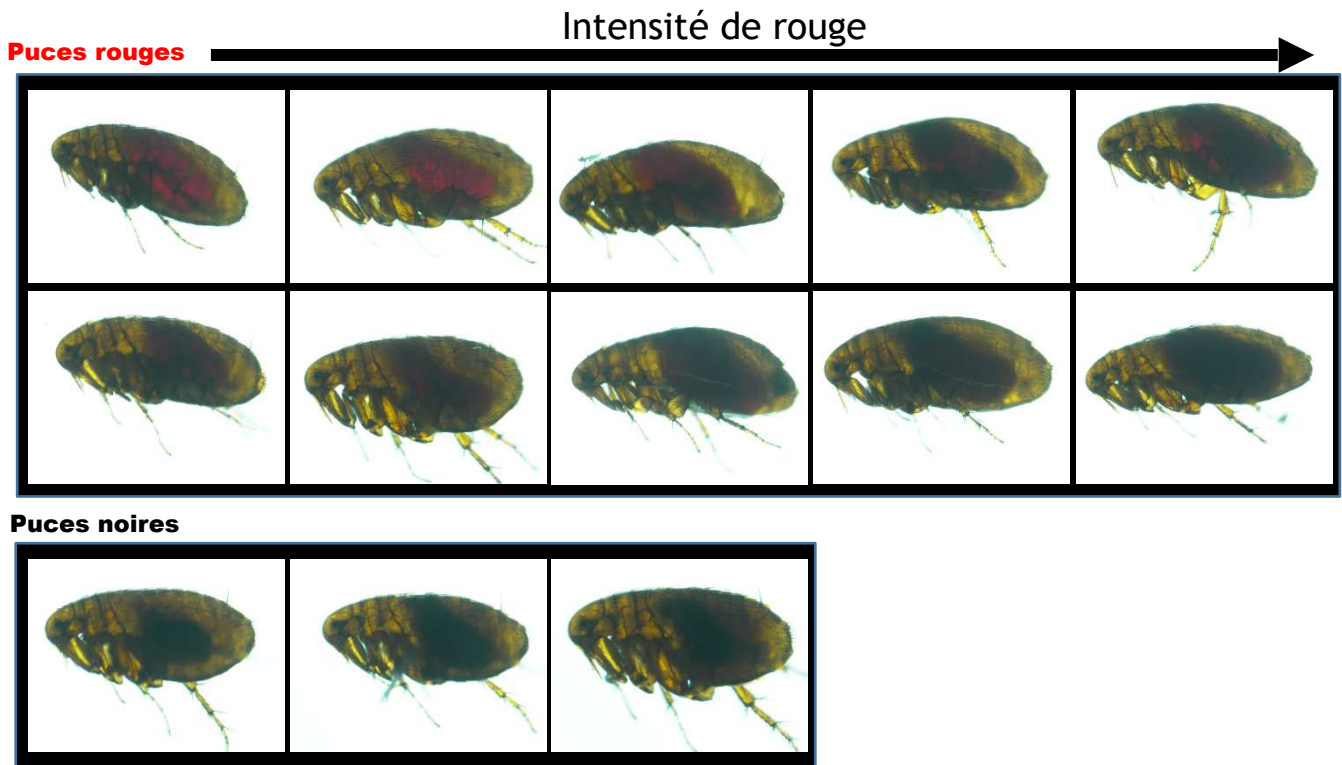


Figure 54 : La couleur des puces est différente juste après le nourrissage des puces. Des puces ont été nourries pendant 1h15, et des puces de couleurs différentes ont été sélectionnées afin de réaliser des images à l'aide d'une loupe.

Ensuite nous avons voulu déterminer si la bioluminescence permettait de diagnostiquer le blocage,

3) Les puces bloquées contiennent généralement plus de bactéries, bien qu'elles soient en moyenne plus lumineuses que les puces non bloquées. La bioluminescence ne permet pas de déterminer avec certitude le blocage d'une puce. Les raisons de ce résultat peuvent être multiples cela pourrait être le reflet du métabolisme. En effet, dans le biofilm les bactéries pourraient avoir un métabolisme, limitant la quantité de substrat et/ou d'ATP, et diminuant en conséquence la quantité de lumière émise par ces bactéries. Il est possible que la lumière émise par ces cellules au sein du biofilm soit absorbée en partie avant de parvenir au luminomètre. Bien que des puces bloquées sont supposées contenir plus de bactéries, des puces non bloquées peuvent quand même contenir une charge

bactérienne élevée. La bioluminescence pour mesurer/évaluer la quantité de bactérie dans une puce ne permet pas de définir si une puce est bloquée ou non.

4) La bioluminescence a aussi permis d'étudier l'impact de différents caractères physiques sur la colonisation du tube digestif de la puce par *Y. pestis* notamment la température d'incubation (21°C et 26°C), la fréquence de nourrissage de l'insecte (tous les jours ou tous les 3 jours), le sexe de l'insecte et la couleur du bol alimentaire juste après le nourrissage. De nombreuses autres caractéristiques peuvent être étudiées dans l'avenir grâce à cette méthodologie telles que : la source de sang (souris, rat, etc.), l'âge de l'insecte etc. De plus, la bioluminescence pourrait permettre de simuler des conditions climatiques (température, humidité) retrouvées dans les régions touchées par la peste afin d'en étudier l'impact sur le processus de transmission.

5) Nos résultats ont montré que bien que la corrélation URL/UFC était faible, la bioluminescence pouvait être utilisée pour mettre en évidence des défauts d'infection chez des mutants déjà connus. Nous avons validé la bioluminescence comme une nouvelle méthode à « haut débit » de suivi de l'infection dans la puce. Cette approche, appliquée à *Y. pestis* dans la puce, pourrait être utilisée pour d'autres pathogènes transmis par la puce comme *Rickettsia typhi* ou *Trypanosoma lewisi*, voir à d'autres pathogènes transmis par des arthropodes. Ici, le criblage d'une banque de 172 mutants dépourvus d'un locus surexprimé dans la puce a révélé le rôle potentiel de 14 locus dans l'infection de la puce.

Parmi ces gènes, les études de colonisation et de blocage du mutant $\Delta y1173$ ($\Delta lipB$) nous ont permis de mettre en évidence le rôle de ce gène ainsi que des voies de lipoylation dans l'infection (Figure 44). En effet, LipB et LipA réalise de concert la synthèse *de novo* du lipoate (Morris *et al.*, 1995, Herbert et Guest, 1968 ; Reed et Cronan, 1993 ; Hayden *et al.* , 2013) alors que LplA permet la fixation du lipoate de l'environnement (Morris *et al.*, 1995). Chez *E. coli*, la lipoylation se fait sur 3 enzymes clés du métabolisme (l'oxoglutarate dehydrogenase, la pyruvate dehydrogenase et le système de clivage de la glycine) (Cronan, 2016). Concernant *Y. pestis* la lipoylation pourrait donc se faire sur les mêmes enzymes. Nous avons pu mettre en évidence que la lipoylation était nécessaire au blocage de la puce et à la colonisation de l'insecte. La souche $\Delta lipB$ bloque moins la puce que la souche sauvage et possède un défaut de colonisation à J1 et J6 seulement (Figure 44). Ce défaut du mutant $\Delta lipB$ uniquement dans les premiers jours suggère fortement qu'en présence de LplA, LipB n'est pas essentiel. En effet, LplA possède une activité lipoate transférase mais peut très probablement octanoyler les enzymes cibles comme cela a déjà été observée chez *S. aureus* et *E. coli* (Zhao *et al.*, 2003). Cependant le rôle physiologique de l'octanoylation par LplA et son

importance reste inconnu chez les bactéries, et sûrement anecdotique. Notre étude met en évidence l'importance physiologique de LplA dans la synthèse de lipoate et suggère que l'octanoylation par LplA est importante pour la pathogénèse. Cette enzyme apparaît comme nécessaire pour le blocage optimal de la puce (colonisation du proventricule) par *Y. pestis* mais pas pour la colonisation de l'intestin de l'insecte (Figure 44). En favorisant la première étape de synthèse du lipoate, LplA pourrait permettre au pathogène de surpasser certains obstacles environnementaux.

La souche $\Delta lipA$ bloque moins la puce que la souche sauvage et possède également un défaut de colonisation à J1 et J6 seulement (Figure 44). Ce défaut de colonisation est dû à la fluctuation de la quantité de lipoate présent dans le tube digestif de la puce au cours du processus de digestion de l'insecte. Nous avons pu mettre en évidence que la bactérie était capable d'utiliser LplA (sa fonction lipoate ligase) en condition *in vitro* et *in pulex*. Dans l'insecte la quantité de lipoate est d'abord faible après le nourrissage pour augmenter après 24 heures jusque 30 heures après nourrissage et de nouveau diminuer entre 36 heures et 48 heures (Figure 50). LplA semble donc être utilisée par *Y. pestis* pour lipoyler les enzymes cibles surtout entre 24 heures et 30 heures après le nourrissage et permettre à la bactérie de coloniser le proventricule et l'intestin de l'insecte.

Concernant les enzymes cibles de la lipoylation, le mutant de l'oxoglutarate déshydrogénase est incapable de bloquer la puce alors qu'il possède une colonisation de l'insecte comparable à celle de la souche sauvage. Les mutant du système de clivage de la glycine (Δgcv), de la pyruvate déshydrogénase ($\Delta aceEF$) et de l'oxoglutarate déshydrogénase possède un taux de blocage similaire pour les deux premiers mutants et plus faible pour le dernier à la souche sauvage respectivement (Figure 44). Alors qu'aucune des souches ne possède de défaut de colonisation de l'insecte. Les résultats semblent montrer que le défaut de blocage de la souche incapable de lipoyler : $\Delta lipB-\Delta lplA$ pourrait être dû en grande partie aux problèmes de lipoylation de l'oxoglutarate déshydrogénase et quelque peu au défaut de lipoylation du système de clivage de la glycine. Cependant le grand défaut de colonisation de la souche $\Delta lipB-\Delta lplA$ n'est expliqué par aucun des mutants des enzymes cibles individuellement (Figure 44). Les résultats montrent donc que les problèmes de blocage et de colonisation de la souche $\Delta lipB-\Delta lplA$ seraient plutôt dus à l'effet cumulé des défauts de chacune des enzymes plutôt qu'à l'impact d'une enzyme en particulier.

Notre étude permet donc 1) d'améliorer notre compréhension du métabolisme du lipoate pendant la pathogénèse. 2) De plus, il existe une stratégie adaptative qui rend les microorganismes très afin pour la lipoylation dans une variété de niche écologique, ce qui pousse la bactérie à s'adapter en

fonction de la quantité de lipoate présente dans le tube digestif de la puce. En effet, l'implication des voies de lipoylation (biosynthèse et récupération du lipoate) est différente selon le compartiment de l'insecte considéré (proventricule et intestin).

Cette étude a permis de mettre en avant également 13 autres loci. A l'exception des locus *rpiA*, *rpiA2* et *rovM*, les autres locus n'avaient jamais été identifiés comme impliqués dans la puce. Ils ont donc été testés par les méthodes usuelles afin de confirmer leur implication dans la puce. Cinq locus n'ont pas de rôle marqués car les résultats de blocage pour ces souches sont similaires à la souche sauvage. Cependant, notre méthode a permis de mettre en évidence du gène *rovM*, dont le rôle mineur lors de l'infection n'a pu être mis en évidence que par des expériences de co-infection avec la souche sauvage (Vadyvaloo, 2015). Cette méthode de co-infection pourrait être utilisée pour ces 5 locus afin de mettre en évidence un défaut mineur chez ces souches. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer pourquoi la bioluminescence permet de mettre en évidence des mutants mis en évidence par des méthodes de co-infection qui permet de souligner des défauts mineurs de colonisation des puces. 1) La bioluminescence pourrait représenter un léger fardeau pour la bactérie qui la porte. La souche sauvage lux+ possède la même capacité d'infection que la souche sauvage lux- (colonisation et blocage : donnée du laboratoire non présentée). Cependant un léger défaut d'une souche mutante pourrait être exacerbé par la bioluminescence et pourrait alors être mis en évidence. 2) La bioluminescence étant le reflet de l'activité métabolique, un léger ralentissement du métabolisme de la bactérie pourrait être rendu visible par une lumière émise par les bactéries plus faible bien que leur nombre soit similaire à la souche sauvage.

Parmi les 13 loci mis en évidence par la bioluminescence, nous avons pu montrer un défaut de blocage des 3 mutants ($\Delta y0555$ - $\Delta y0560$, $\Delta y2878$ et $\Delta y1173$), alors qu'aucun défaut n'est observé pour 5 les mutants ($\Delta y2455$, $\Delta y3525$, $\Delta y2892$ - $\Delta y2894$, $\Delta y1282$ et $\Delta y2882$ - $\Delta y2880$). De plus la délétion des 3 locus $\Delta y1076$ - $\Delta y1077$, $\Delta y3249$ - $\Delta y3250$ et $\Delta y0602$ - $\Delta y0605$ conduit à un taux de blocage plus élevée que la souche sauvage. Les résultats de blocage peuvent être un considérés comme surprenants car au vu des résultats de bioluminescence et que tous ces locus étaient surexprimés dans la puce ont aurait pu penser que tous les mutants auraient présenter des défauts de blocage. Malgré ce constat la bioluminescence est robuste car elle a permis d'identifier *rovM*, déjà connu pour être requis dans l'infection. Les méthodes classique de blocage et de suivi de colonisation n'avaient pas permis d'identifier ce gène. Seul des études de co-infection avec la

souche sauvage a permis d'identifier ce gène. Il est donc possible que le défaut de colonisation des souches mutantes possédant le même taux de blocage que la souche sauvage ne soit visible qu'en réalisant des études de co-infection alors qu'ils ont été vus en bioluminescence. Concernant les souches qui bloquent davantage que la souche sauvage, la bioluminescence montrait pour ceux-ci, une quantité de lumière émise plus faible. Ce phénomène pourrait être le reflet du métabolisme bactérien. Si les bactéries forment plus ou plus vite le biofilm nécessaire au blocage de la puce, le métabolisme de celle-ci peut se ralentir plus précocement et donc diminuer la quantité de lumière émise par les bactéries au moment de la mesure de la luminescence. Des mutants capables de bloquer la puce de manière plus importante que la souche sauvage auront donc une quantité de lumière émise plus faible que la souche de référence (Figure 32).

La plupart des mutants (9 sur 14) que nous avons sélectionnés sont impliqués dans des mécanismes de résistances: aux stress oxydatifs, osmotiques, aux peptides antimicrobiens (Figure 33). Ces gènes impliqués dans la réponse aux stress sont le reflet des fluctuations que doit rencontrer la bactérie lors de la colonisation de la puce. En effet, en plus, de devoir affronter les mécanismes de défenses de la puce, les paramètres physico-chimiques varient (Figure 33). L'osmolarité passe de 500 mOsM à 300 mOsM (osmolarité du sang) en 1h et remonte à sa valeur basale de 500 mOsM en 12 h après le repas sanguin (Bontemps-Gallo *et al.*, 2019). Le pH basal de l'intestin de la puce est de 6,7. Sa valeur chute à 6,3 en 12 heures et remonte à 6,7 en 24 heures (Bontemps-Gallo *et al.*, 2019). Le repas sanguin conduit à une production massive (10 à 15mM) de ROS indépendamment de la présence de la bactérie (Zhou *et al.*, 2012). Enfin, le processus de digestion conduit à une diminution de la quantité de nutriments disponibles (Vaughan et Azad, 1993, Terra et Ferreira, 1994, Hinnebusch, 2004).

Les locus sont impliqués dans le stress osmotique (*glnE*), oxydatif (*yfiD*, *putA*, *terZABCDE* et le locus *y0602-dsbD-cutA-dcuA*), lié à la réponse aux défenses de l'hôte/de l'insecte (*lpxP*, *rpiA*, le locus *rpiA2-xylB-gadD1* et *wbyJ-wbyI*) et/ou dans le métabolisme (*lipB*, *rovM*, *psaABC*) et de fonction inconnue (*y2878* et *y3249-y3250*) (Figure 55).

Le stress oxydatif semble être un stress majeur pour *Y. pestis* dans la puce. En effet, pas moins de 4 gènes impliqués dans la réponse à ce stress semblent être requis pour la colonisation de l'insecte. En effet, le gène *yfiD* code un cofacteur (Autonomous glyceryl radical cofactor). Chez *E. coli*, il a pu être mis en évidence qu'il était impliqué dans la résistance au stress acide et permettre l'adaptation en fonction de la disponibilité en oxygène (Wagner *et al.*, 2001; Wyborn *et al.*, 2002). Bien que le pH ne varie pas énormément dans la puce, il a pu être montré que celui-ci descend à environ 6,5

(Bontemps-Gallo *et al.*, 2019). Le pH est donc une variation environnementale subie par *Y. pestis* dans la puce lors de sa colonisation et y résister pourrait être un élément nécessaire pour l'infection optimale du pathogène. De plus, *Y. pestis* est une bactérie anaérobie facultative et pourrait avoir besoin de *yfiD* pour s'adapter aux différents milieux de culture au moment des infections puis dans la puce.

Ensuite le gène *putA* code une flavoprotéine qui permet l'oxydation de la L-proline en glutamate. Chez *E. coli* il a pu être mis en évidence qu'une souche mutante de *putA* était plus sensible au stress oxydatif par rapport à la souche sauvage. Cela serait lié au fait qu'en présence de proline *putA* active la transcription de *katG* (hyperoxydase I) une catalase qui détoxifie l' H_2O_2 en eau et oxygène. Ce phénomène serait expliqué par le mécanisme de dégradation de la L-proline, celui-ci génère en sous-produit de l' H_2O_2 qui permettrait un pré-conditionnement en augmentant les niveaux d'hyperoxydase I augmentant ainsi la tolérance générale de la bactérie au stress de la cellule (Zhang *et al.*, 2015). Pour pouvoir confirmer ces résultats chez *Y. pestis* il pourrait être intéressant d'étudier la résistance à l' H_2O_2 des souches mutantes $\Delta putA$ et $\Delta katG$.

L'opéron *ter* (*terZABCDE*) chez *E. coli* est nécessaire pour la résistance au tellurium. C'est un oxyanion de tellure TeO_3^{2-} qui est hautement toxique pour la plupart des bactéries à des concentrations aussi faibles que 1 $\mu g/mL$. Les raisons de la toxicité du tellurium ne sont pas encore comprises. Plusieurs hypothèses ont été émises notamment il a été suggéré que le tellurium pourrait remplacer le soufre dans certains aminés, générant alors des protéines non fonctionnelles. (Taylor, 1999). Ou encore, la toxicité du tellurium serait due à sa capacité d'oxyder fortement certains composants cellulaires (Summer et Jacoby, 1977). Les bactéries résistantes au tellurium transforment le TeO_3^{2-} en Te^0 qui est après déposé au niveau externe de la membrane interne ou dans le périplasme. Il a été proposé que l'opéron *ter* puisse détoxifier les composés antimicrobiens pendant un stress oxydatif. Chez une souche d'*E. coli* résistante, la tellurite provoque une induction d'un mécanisme de défense antioxydant avec une augmentation de la superoxyde dismutase, de catalase, d'oxydoréductase et de cystéine désulfurase. Il a pu être démontré qu'il existait une faible quantité de tellurium dans le sang (0.11–0.45 ng/ml) (Goullé *et al.*, 2005). Ainsi au moment de l'infection l'opéron *ter* pourrait permettre dans un premier temps de résister au tellurium présent dans le sang mais aussi de résister aux composés antimicrobiens produit par la puce pendant l'infection.

Le locus suivant est composé de différents gènes avec différentes fonctions : *y0602* de fonction inconnue, *dsbD* une protéine cytoplasmique qui compose la machinerie dsb. Cette machinerie permet de réaliser des liaisons disulfures au niveau des protéines pour leur conférer stabilité, activité et résistances aux protéases (Heras *et al.*, 2009). Les bactéries expriment de nombreuses protéines possédant des liaisons disulfures comme facteurs de virulence, comme par exemple le système de sécrétion de type III chez *Yersinia pestis*. De plus des études ont pu montrer que DsbD est capable de fournir des équivalents réducteurs pour de nombreuses protéines rédox. Ces protéines peuvent : maturer les cytochromes de type C, protéger les cystéines des protéines sécrétées de l'oxydation, réduire les sulfoxides méthionine et piéger les espèces réactives de l'oxygène (Arts *et al.*, 2015). Ainsi DsbD dans la puce pourrait être utilisé par la bactérie pour protéger ses protéines de la dégradation, mais aussi en se protégeant des espèces réactives de l'oxygène produite par la puce. Ensuite dans le locus identifié par la bioluminescence, il y a *cutA* qui code une protéine de liaison aux cuivres permettant la résistance aux cuivres et est induit par de nombreux composants tels que le : cuivre, zinc, nickel, cobalt, cadmium, manganèse et l'argent (Fong *et al.*, 1995). Il est intéressant de souligner que dans le sang, la présence de cuivre, zinc, cadmium et manganèse a déjà été démontrée. Enfin le dernier gène de ce locus est *dcuA* qui permet l'import de L-aspartate (Strecker *et al.*, 2018). Les gènes les plus probablement impliqués dans la puce pourraient être *dsbD* et *cutA* en permettant à la bactérie de résister au mieux à la complexité du milieu qu'est la puce. Il faut souligner que le suivi de blocage a montré un plus fort taux pour le mutant du locus, ce qui n'est pas logique avec l'étude bibliographique des gènes présent de ce locus. Cependant, il faudrait réaliser des mutations des gènes des locus un à un pour identifier l'impact de chacun de ces gènes dans l'infection.

lpxP code quant à lui une acétyltransférase qui ajoute du palmitoléate au lipide A de la bactérie le rendant hexa-acylé. Il a pu être observé que le lipide A hexa-acylé prédominait à une température de 21°C comparé à 27°C. Cette protéine est liée à la résistance à la cécropine A mais pas à la polymixine B, cependant des études de colonisation et de blocage ont déjà montré qu'il ne possédait pas de défaut (Rebeil *et al.*, 2005; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2010). En revanche des études de co-infection pourraient montrer un défaut mineur de cette souche par rapport à la souche sauvage.

Ensuite l'implication des gènes *rpiA* et *rpiA2*, codant des ribose-5-phosphate isomérases, a déjà pu être mis en évidence dans l'étude réalisée par Dewitte *et al.* 2020.

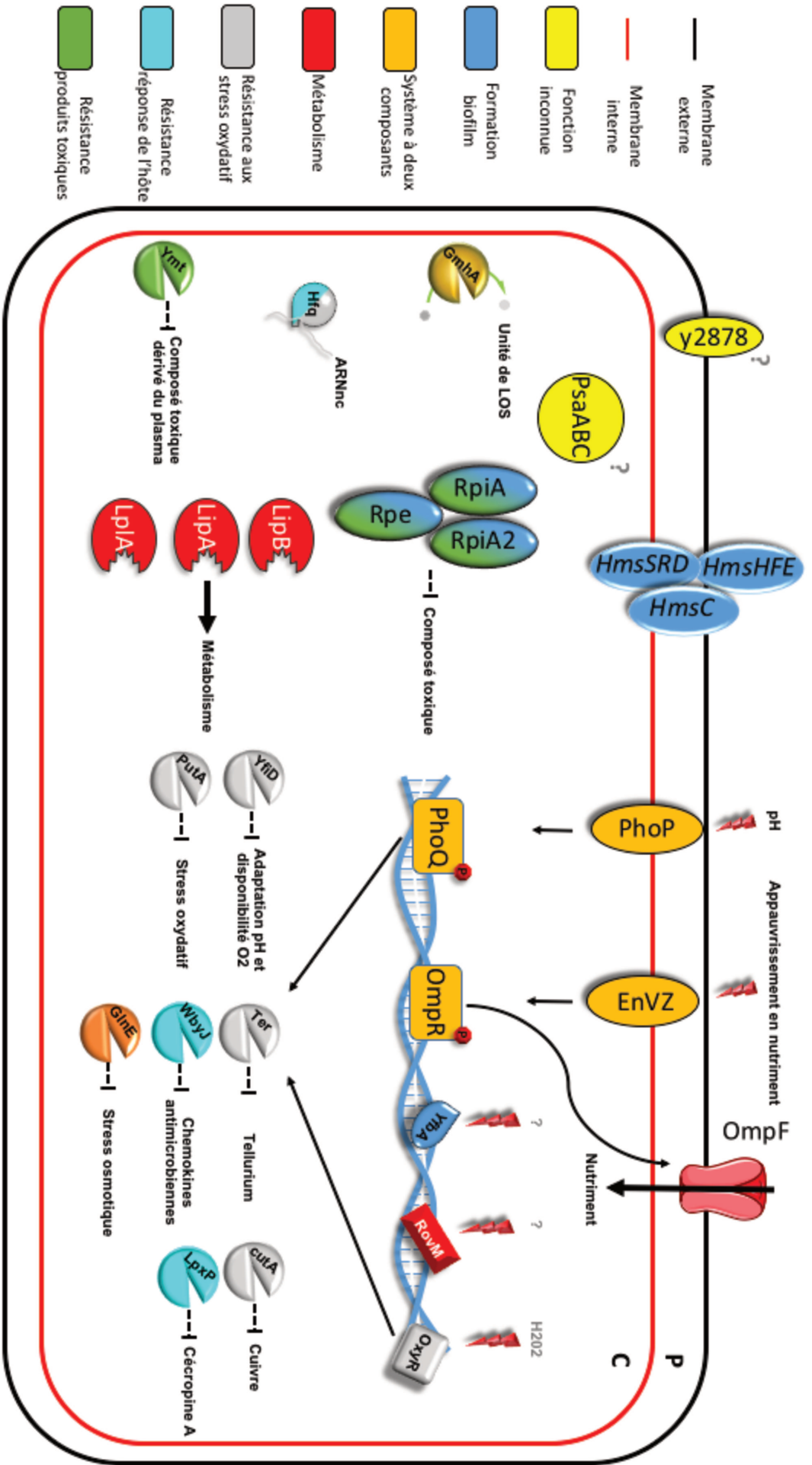


Figure 55: Schéma de régulation hypothétique lors de l'infection de la puce par *Y. pestis*.

Le locus suivant est composé des gènes *wbyJ* codant une protéine semblable à une mannosyltransférase et *wbyI* codant une protéine semblable à une glycosyltransférase qui a été démontrée comme inactive chez *Y. pestis*. Des études ont pu montrer qu'un mutant de ce gène présentait un défaut de colonisation des souris après infection par injection intraveineuse ou intrapéritonéale. Ce défaut pourrait être dû à une augmentation de la sensibilité aux chemokines antibactérienne (Erickson *et al.*, 2016). Ainsi, la protéine WbyJ pourrait permettre à la bactérie de se défendre vis à vis des chemokines que pourrait produire la puce pour se défendre vis à vis de l'infection.

glnE code chez *E. coli* une adénylyl transférase qui module l'activité de la glutamine synthétase. Il a pu être montré que la mutation du gène *glnE* conférait un phénotype osmosensible à la bactérie (Nandineni *et al.*, 2004). Or Bontemps-Gallo, Fernandez *et al.* ont pu montrer que l'osmolarité diminuait au temps précoce après un nourrissage, GlnE pourrait donc permettre à la bactérie de s'adapter à cette baisse d'osmolarité.

psaABC est nécessaire pour l'opéron antigène fimbriae pH6, il permet chez *Y. pestis* dans la souris de résister à la phagocytose. Dans l'insecte, il pourrait rompre la cohésivité du biofilm soit de manière directe ou en masquant des adhésines. Des résultats ont pu montrer que *psaAB* était plus exprimée dans le bubon que dans la puce. En effet, cet opéron n'est exprimé qu'à 37°C et est réprimé par *phoP* dans la puce (Vadyvaloo *et al.*, 2010; Vadyvaloo *et al.*, 2015). Cependant le gène *psaC* a pu être montré comme sur-exprimé dans l'insecte.

En revanche les connaissances actuelles sur *y2878* et *y3249-y3250* ne permettent pas de conclure sur une possible fonction de ces gènes. Il faudrait donc les étudier plus précisément pour étudier leurs défauts réels dans la puce.

La bioluminescence a permis de mettre en évidence un possible défaut de colonisation de la puce du mutant $\Delta y2878$. Les études de colonisation et de blocage du mutant $\Delta y2878$ ont montré un défaut de blocage important (50% de puces bloquées par rapport à la souche sauvage) (Figure 37A) et un léger défaut de colonisation du tube digestif de l'insecte à J6 (Figure 37B). Ce défaut de colonisation, pourrait plus être le reflet d'un problème pour bloquer le proventricule de la puce que d'un problème de croissance de cette souche (défaut de blocage et non de colonisation). En effet, les bactéries bloquant moins le tube digestif de la puce, pourraient se faire éliminer par les fèces plus facilement. Les résultats de colonisation du proventricule en microscopie à fluorescence de la

souche $\Delta y2878$ montrent des différences significatives au J6 après infection par rapport à la souche sauvage en intensité de fluorescence émise (Figure 39), montrant un défaut de colonisation du proventricule de ce mutant. Ce problème de charge bactérienne au niveau du proventricule de l'insecte provoque probablement le défaut de blocage. On peut penser que le bouchon bactérien formé par la souche $\Delta y2878$ soit moins compact donc moins solide que celui formé par la souche sauvage. La masse alors formée au lieu de pouvoir bloquer la puce va se retrouver éliminée par le repas sanguin et parvenir à obstruer le tube digestif de l'insecte moins fréquemment que la souche sauvage.

Matériels et méthodes

Tableau 1 : Liste souches et plasmides

Souche ou plasmide*	Caractéristiques d'intérêt	Source
Souches		
<i>Escherichia coli</i>		
DH5- α	<i>supE ΔlacU169 hsdR recA endA gyrA hri relA</i>	Collec. L
BW25113	<i>lac lq rrrB T14 ΔlacZ WJ16 hsdR514 ΔaraBAD AH33 ΔrhaBAD LD78</i>	Collec. L
BW25113 Δ lipA	Dérivé BW25113, ZeoR	Ce travail
BW25113 Δ lipB	Dérivé BW25113, ZeoR	Ce travail
 <i>Yersinia pestis</i>		
KIM6+	pYV-négatif, souche avirulente	Collec. L
KIM6+/P	Porte le plasmide pEP1436 ; ApR	Collec. L
KIM6+/P lux+	KIM6+/P + l'opéron <i>cysZK luxCDABE</i> (miniTn7)	Collec. L
KIM6+/P Δ y0555-0560	Dérivé de KIM6+/P; TpR	Ce travail
KIM6+/P Δ y0767- Δ y0768	Dérivé de KIM6+/P; TpR	Ce travail
KIM6+/P Δ y1171	Dérivé de KIM6+/P; TpR	Collec. L
KIM6+/P Δ y1172- Δ y1173	Dérivé de KIM6+/P; TpR	Collec. L
KIM6+/P Δ y1171- Δ y1172- Δ y1173	Dérivé de KIM6+/P; TpR, KnR	Ce travail
KIM6+/P Δ y1926	Dérivé de KIM6+/P lux+; TpR	Ce travail
KIM6+/P Δ y1172- Δ y1173- Δ y1926	Dérivé de KIM6+/P lux+; TpR, KnR	Ce travail
KIM6+/P Δ y2878	Dérivé de KIM6+/P lux+; TpR	Ce travail
KIM6+/P Δ y3066- Δ y3067	Dérivé de KIM6+/P lux+; TpR	Ce travail
KIM6+/P Δ y3292- Δ y3293- Δ y3294	Dérivé de KIM6+/P lux+; TpR	Ce travail
KIM6+/P lux+ Δ y0555-0560	Dérivé de KIM6+/P lux+; TpR	Ce travail
KIM6+/P lux+ Δ y0767- Δ y0768	Dérivé de KIM6+/P lux+; TpR	Ce travail
KIM6+/P lux+ Δ y1171	Dérivé de KIM6+/P lux+; TpR	Ce travail
KIM6+/P lux+ Δ y1172- Δ y1173	Dérivé de KIM6+/P lux+; TpR	Ce travail
KIM6+/P lux+ Δ y1171- Δ y1172- Δ y1173	Dérivé de KIM6+/P lux+; TpR, KnR	Ce travail
KIM6+/P lux+ Δ y1926	Dérivé de KIM6+/P lux+; TpR	Ce travail
KIM6+/P lux+ Δ y1172- Δ y1173- Δ y1926	Dérivé de KIM6+/P lux+; TpR, KnR	Ce travail
KIM6+/P lux+ Δ y2878	Dérivé de KIM6+/P lux+; TpR	Ce travail
KIM6+/P lux+ Δ y3066- Δ y3067	Dérivé de KIM6+/P lux+; TpR	Ce travail
KIM6+/P lux+ Δ y3292- Δ y3293- Δ y3294	Dérivé de KIM6+/P lux+; TpR	Ce travail
 Plasmides		
pCRII	Vecteur de clonage; Ap ^R et Km ^R	Invitrogen
pCR2.1	Vecteur de clonage; Ap ^R et Km ^R	Collec. L
pKD4	Vecteur ori6K, source de la Km ^R (FRT)	Collec. L
pEP1042	Dérive de pKD4, source de la Zeo ^R (FRT)	Collec. L
pEP1436	Vecteur Red recombinaison, endonuclease I-SceI, Ap ^R	Collec. L
pEP1087	Dérive de pKD4, source de la Tp ^R (FRT)	Ce travail
pEP1446	Dérive de pKD4, source de la Km ^R (site I-SceI)	Ce travail
pBT1	pCR zero blunt contenant y1171-y1172-y1173	Ce travail
pBT2	pCR zero blunt contenant y1926	Ce travail
pBT3	pCR zero blunt contenant y2878	Ce travail

*, Ap^R, Tp^R, Km^R, résistance à l'ampicilline, au triméthoprime et à la kanamycine respectivement ; /P, pEP1436 ; Collec. L, collection du laboratoire.

Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture. L'ensemble des souches bactériennes et des plasmides utilisés dans cette étude ainsi que leurs principales caractéristiques sont présentées

dans le tableau 1. Les bactéries ont été cultivées dans des milieux liquides : Lysogeny Broth (LB), Brain Heart Infusion (BHI), du milieu M9. Les milieux ont été rendus solides par ajout de 15g/L d'agar. Quand nécessaire, les milieux de culture ont été rendus sélectifs par addition de kanamycine (50 µg.mL⁻¹), de triméthoprime (25 µg.mL⁻¹), d'ampicilline (100 µg.mL⁻¹) ou de zéocine (50 µg.mL⁻¹). De même les milieux ont pu être supplémentés en lipoate, succinate, acétate ou glycine lorsque nécessaire. *E.coli* a été cultivée à 37°C alors que *Y. pestis* a été cultivée à 21°C (température requise pour une transmission efficace du bacille de la peste par la puce), 28°C (température optimale de croissance) ou 37°C (température de l'hôte mammifère) avec ou sans agitation.

Elevage de puce. Les puces sont placées dans des jarres contenant une litière composée au 3/4 de sciure de bois (passé dans un tamis de 850 microns) et pour le quart restant d'un mélange composé de 1/3 de sang de mouton déshydraté broyé (passé au tamis de 250 microns), 1/3 de régilait broyé (passé au tamis de 250 microns) et 1/3 de nourriture de souris pour le quart restant (pour permettre la croissance des larves de puces). De la litière est ajoutée une fois par mois. L'élevage de puces est nourri deux fois par semaine pendant une heure avec un souriceau.

Transformation bactérienne. Concernant *E.coli* (DH5- α), les bactéries ont été rendu chimiocompétentes par un traitement au CaCl₂ (100mM) froid. Puis la transformation a été effectuée avec l'ADN exogène par choc thermique : 30 minutes dans la glace puis 1min à 42°C. Concernant *Y. pestis* les bactéries sont rendues électrocompétentes par plusieurs traitements successifs à l'eau froide. Les bactéries sont alors transformées par l'ADN exogène par électroporation, un choc électrique de 2,5kV, 25µF, 200Ω appliqué par l'appareil « gêné pulseur » de Biorads. Ensuite pour sélectionner les *E.coli* ou *Y. pestis* ayant intégrées l'ADN exogène, les bactéries sont étalées sur gélose LB avec antibiotiques, 0,2 mM final de 5-bromo-4-chloro-inodyl β -Dgalatoside et 0,2 mM final de l'isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) afin de réaliser une sélection des clones blanc/bleu. Ensuite les clones sont vérifiés par PCR ou séquençage.

Tableau 2 : Liste des oligonucléotides utilisés.

ORF(s)	Set de primers utilisés (5' -> 3')	
	Oligos pour la mutation ^a	Vérification
y0555-0560	GAGTTGAATGATGATGGCTTCATGATATGATTGGTGTGATGCGGTTAATG GTGTAGGCTGG AGCTGCTTC	AAACAAACTGGCTGCC TCAG
	TTACAGTTGAAAATCAGCAGGGACAAAACCTAACGTCACGCAAATTT CATATGAATAT CCTCCTTAG	ATTTTACGGCCGCAT TGGC
y0767-y0768	ATGTCAGAACGTTTAAATAATGACGTGGATCCGATCGAAACCCGCGACTG GTGTAGGCTGG AGCTGCTTC	ACAGCGCAAGGAGTAG AAAC
	TTACATCACCAGACGGCGAATATCCGCCATAATGGTAGCGATATACGCGG CATATGAATAT CCTCCTTAG	TTCATAACGCCCTCATC CAC
y1171	ATGAGTAAACCGATTTCAGATGGAACGCGCGTAAAATACCGTGATGCAGAG GTGTAGGCTGG AGCTGCTTC	CGCCAAAAGTGAATGG CTGA
	TTACTTCACTTCCATACCTTTCGCTTGCAGGTCTGCATGGTAAGAAGAGC CATATGAATAT CCTCCTTAG	TTTTGCCTGTGCCATAT CGC
y1172-y1173	ATGATGCCTCGCTTGCAACAACACAAGATCATTTTACGTCAGCTAGGGTT GTGTAGGCTGG AGCTGCTTC	GGTCAAGATGGTGCTC AGT
	TTACAACACGCTTGATGATGAATGGCTTGATAATAAATAGTCTGATAATG CATATGAATAT CCTCCTTAG	CGCCATTTGTCTGCA TCAC
y1926	ATGTCATCCCTTCGTTTACTCATTTCTGATTCTTATGATCCTTGGTTTAA GTGTAGGCTGG AGCTGCTTC	CGCTCGTCATTGGAGA ATGT
	TTAGCGTAATACTTCTACCAGCCAATGGCAGGCTTGCTGTAACTCGGTTT CATATGAATAT CCTCCTTAG	TAGGTTGCAAGCGGGT GTAA
y2878	ATGGCGACTTCTCAGACAAAAGAACTCCCCCGCCTCAGCTGTTACTGT GTGTAGGCTGG AGCTGCTTC	ATGCTCCCTCGCCTATC GCT
	TTACACAAGTGCAATATGTTGCACAAATAAGTTGATACCGGTGCCACCGA CATATGAATAT CCTCCTTAG	CGGATACGGCCCTTAA ACGG
y3066-y3067	ATGCAGAACGGCGCAATGAAGGCCTGGCTGGATTCTCCTATCTGGCGGG GTGTAGGCTGG AGCTGCTTC	GCCGGCATAATGTCTG TTTC
	TTTATACATCAAGTAGCAAGCGAGCAGGATCTTCCAGCATCTCTTTTACC CATATGAATAT CCTCCTTAG	CATGCCATACCGAGCAA ACA
y3292-y3293- y3294	ATGGCTAAGCAGACCCCGCTGTATGACCAACATGTTCGCGTGCGGTGC GTGTAGGCTGG AGCTGCTTC	TAGCTTATGGTCCCT GAGG
	TTACTCATAGTCACTGATTGGCACACATGAACAGAACAATTCGGATCAC CATATGAATAT CCTCCTTAG	GTGAGGATAGGCAGAA GAGT

Extraction d'acides désoxyribonucléiques (ADN). Les extraits bruts d'ADN génomique ont été obtenus par thermolysat. Les bactéries sont d'abord mises en culture, puis centrifugées à 20 000g pendant 5 minutes afin de faire sédimenter les bactéries. Ce culot bactérien est alors suspendu dans 50 µL d'eau et chauffé à 100°C pendant 10 minutes. Les ADN plasmidiques sont quant à eux obtenus par thermolysat puis purifiés avec le kit « NucleoSpin Plasmid » (Machery-Nage) en respectant les recommandations du fournisseur (Macherey-Nagel).

Amplification d'une séquence d'ADN. Des fragments d'ADN ont été amplifiés à l'aide de la dream taq polymérase par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant le thermocycleur 2720 d'Applied Biosystem. Tout d'abord une étape de dénaturation de l'ADN est effectuée à 94°C durant 10 min, suivie de 30 cycles constitués (i) d'une étape de dénaturation à 94°C durant 45 s, (ii) d'une étape d'hybridation des oligonucléotides complémentaires avec l'ADN à 55°C durant 45 s, (iii) et d'une étape d'élongation par la Taqpolymérase à 72°C et d'une durée d'une minute par Kilo-base (Kb) amplifié. La réaction se termine par une étape d'élongation à 72°C pendant 10 min. Le mélange réactionnel (50µL) comprend 0,1mM de désoxy-adénosine triphosphate (dATP), désoxy-cytidine triphosphate (dCTP), désoxy-thymidine triphosphate (dTTP) et désoxy-guanosine triphosphate (dGTP) (Sigma), 1µM d'amorce (Eurogentec), une unité de dream taq polymérase (Applied Biosystem), du tampon 1X, 25 mM de MgCl₂, et 1µg d'ADN génomique.

Construction de mutants de *Y. pestis*. La banque de mutants a été construite précédemment. Les détails sont disponibles dans Bouvenot *et al.* . Les mutants construits spécifiques a ce projet sont présentés ici. Les mutants de *Y. pestis* ont été construits par recombinaison homologue et à l'aide de produits de PCR (Datsenko and Wanner, 2000). Plus particulièrement, le gène de résistance au triméthopime *dfrB* ou de résistance à la kanamicine ont été amplifiées par PCR à l'aide d'amorces de 70 bases dont 50 bases correspondent à la région chromosomique ciblée (tableau 2). Les produits de PCR obtenus ont été précipités à l'isopropanol en présence d'acétate d'ammonium 5 M, lavés à l'éthanol 70°, repris dans 20 µL d'eau puis dessalés sur membrane de nitrocellulose. Les amplicons purifiés, qui peuvent être assimilés à une forme inactivée des régions d'intérêt, ont été introduits chez *Y. pestis* par électroporation. Les bactéries recombinantes ont été sélectionnées sur gélose LB agar contenant du l'antibiotique d'intérêt (kanamycine, trimétoprine ou zéocine). Pour permettre l'événement de recombinaison entre l'ADN génomique et le produit de PCR, *Y. pestis* doit exprimer la recombinaise phagique Red ainsi que la protéine Gam qui inhibe l'exonucléase V du système RecBCD de la bactérie transformée ; celles-ci sont produites par le plasmide pEP1436. Le « système Red », dont l'expression est sous le contrôle du promoteur *p_{lac}*, a été induit pendant 2 heures suite à l'ajout d'IPTG (1 mM final) dans le milieu de culture contenant des bactéries se trouvant en début de phase exponentielle de croissance. Les mutants ont été vérifiés par PCR à l'aide des couples d'oligonucléotides s'hybridant avec le gène de résistance à l'antibiotique (5' AAAAATGGGTCAAAGTAGCGA-3' & 5'-GACCGGGGGATCCACTAGTT-3') et les régions d'ADN flanquant les zones des gènes cibles utilisés pour la recombinaison (Voir tableau 2). Par ailleurs, la présence dans les souches mutantes du gène *ymt* (porté par le plasmide pFra) a été

vérifiée par PCR à l'aide du couple des oligonucléotides 5'-CGGAATTCGCGTTATCGCT-3' et 5'-GGGAGCCATAAGCAGAAGAACC-3'.

Clonage d'ADN. Les gènes *y1171-y1172-y1173*, *y1926* et *y2878* sous le contrôle de leur promoteur ont été amplifiés par PCR à l'aide des couples d'oligonucléotides 5'-GCCCATTTGGTGGTGGTGAAC-3'/5'-ATCGGGCAGGTTCCAGTTCT-3' et 5'-TGAAGGGAAATAAGGGCCGC-3'/ 5'-ATAAGGGCTGCGGTTACACA-3' respectivement. La qualité et la taille des amplicons obtenus ont été vérifiées à l'aide du marqueur de poids moléculaire Smart Ladder (Eurogentec) et, après électrophorèse sur un gel à 1% d'agarose immergé dans une solution tampon 1X de TBE [tris-Borate (90 mM)-EDTA (2 mM)-acide borique (90 mM)], suivie d'une coloration dans un bain de bromure d'éthidium (BET) puis visualisation sous lumière ultraviolette. Après vérifications, les fragments d'ADN amplifiés ont été clonés dans le plasmide pCR™4-TOPO®, à l'aide du kit « TA-cloning » (ThermoFisher Scientific) et selon les recommandations du fabricant. Afin de vérifier l'absence de mutations dans les fragments clonés, la séquence de ces derniers a été obtenue (par la compagnie Genoscreen) à l'aide des oligonucléotides M13-forward et M13-reverse, ainsi que des oligonucléotides 5'-CTAGCTGGCGTACACCGATT-3' / 5'-CCCGCCCTGTTTATTCAGGTA-3' pour *y1173* et 5'-TTGTACGGTTTCCGCCTGAC-3' / 5'-GTGATCACCGCCGCATTTC-3' pour *y2878*, analysée puis comparée à la séquence d'origine à l'aide des programmes Sequencher et Serial Cloner 2.1. Les plasmides contenant les séquences des gènes *y1171-y1172-y1173*, *y1926* et *y2878* ont été nommées respectivement pTB1, pTB2 et pTB3 (Tableau1).

Infection de puces. Après une croissance en milieu BHI (8 mL), à 28°C, sur la nuit et sans agitation, la souche KIM6+ de *Y. pestis* et ses mutants ont été transférées dans un milieu BHI (100 mL) pour être cultivées sans agitation pendant 18 h à 37°C. Suite à l'incubation, les bactéries sont culotées par centrifugation puis suspendues dans du PBS afin d'obtenir une suspension bactérienne de 5.10⁹ bactéries/mL. 1mL de cette suspension cellulaire sont ajoutés à 4,5 mL de sang hépariné de souris contenant ou non du 8 Bro (8 µg/mL). Immédiatement après avoir été souillé, le sang a été ajouté à un nourrisseur artificiel dans lequel des cohortes de puces, préalablement anesthésiées par le froid, ont été déposées. Les insectes sont autorisés à se nourrir pendant une période de 1h15. Après nourrissage, les puces sont déposées dans une bassine, collectées dans une bouteille par aspiration à l'aide d'un vacuum, anesthésiées sur glace, puis placées sur une table réfrigérée afin de collecter (à l'aide d'une pince et sous loupe binoculaire) les puces ayant un pris repas sanguin. Les

puces sélectionnées sont placées dans une cage à puces, puis maintenues dans une chambre climatique à 75% d'humidité et à 21 ou 26°C en fonction des besoins de l'étude. Lorsque les puces infectées étaient nourries artificiellement avec du sang supplémenté avec du 8Bro (c'est-à-dire deux jours après l'infection), les puces ont été placées dans un puit d'une plaque blanche à 96 puits (1 puce par puit). La plaque a été scellée avec un transparent le film plastique et les puces ont été surveillées pour la défécation toutes les 6 heures pendant les 24 heures. Les puces qui ont déféquées ont été collectées immédiatement après la défécation, et la charge bactérienne a été mesurée. Nous avons utilisé cette approche car la défécation est le seul moyen fiable de savoir si une puce a pris un repas deux jours après le repas précédent.

Suivi du blocage et de l'infection par ensemencement. Des cohortes de 500 puces ont été nourries artificiellement avec la souche KIM6+ de *Y. pestis* ou ses dérivées. Après nourrissage, deux cohortes de 100 puces, dont une constituée uniquement de femelles et l'autre de 50 mâles et 50 femelles, ont été collectées dans une cage à puces puis maintenues à 21°C et 75% d'humidité. La cohorte constituée que de femelles a été utilisée pour mesurer le taux d'infection et la charge bactérienne immédiatement, à 6 et 27 jours après le repas sanguin contaminé. Plus particulièrement, 20 insectes ont été collectés, conservés à -80°C jusqu'au jour de la détermination de la charge bactérienne. Après décongélation, chacune des puces ont été stérilisées par immersion dans 250 µL d'eau oxygénée pendant deux minutes puis dans 250 µL d'éthanol 70% pendant deux minutes. Après séchage à l'air libre, les puces ont été nettoyées dans 500 µL de PBS puis transférées dans un tube « lysin-matrix H » contenant 1 mL de BHI. Les tubes ont été secoués à l'aide du FastPrep FP120 (MP Biomedicals) pendant 15 secondes à une vitesse de 6 m/s, afin de broyer les puces à l'aide des billes contenu dans le tube de lysin-matrix H. Dix microlitres du broyage ont ensuite été étalés sur une gélose BHI contenant 1µg/mL d'Irgasan et 10 µg/mL d'hémine. Après 48 h d'incubation à 28°C, les bactéries ayant poussées sur la gélose ont été dénombrées. La cohorte composée de mâles et de femelles a été utilisée pour suivre le blocage du tube digestif de l'insecte ; le blocage est diagnostiqué, sous loupe binoculaire, par la présence de sang frais dans la partie supérieur du tube digestif (oesophage et/ou proventricule) mais pas dans le tube digestif moyen.

Etude de la formation de biofilm *in vitro*. Les bactéries sont cultivées à 21°C pendant 24 heures, puis 1 mL de la suspension à 1.10^7 bactérie/mL est placée dans une plaque 24 puits et laissée à incubée pendant 48 heures à 21°C sous agitation. Les puits sont alors lavés avec de l'eau, puis du crystal violet à 0,01% est ajouté dans le puit et laissé à température ambiante pendant 15 minutes. Ensuite les puits sont de nouveau lavés à l'eau, puis les bactéries accrochées à la paroi du puit sont récupérées à l'aide d'Ethanol/Acétone et l'absorbance (DO: 600nm) de 200 μ L est mesurée.

Suivi de l'infection par mesure la bioluminescence. Des groupes de 350 insectes ont été autorisés à prendre un repas sanguin contaminé par la souche KIM6+ bioluminescente de *Y. pestis* ou ses dérivées. Après nourrissage, quatre-vingt-seize puces (48 de chaque sexe) nourries ont été collectées. Le jour de l'infection et avant nourrissage (à J2, J6, J9, J13, J16, J121, J23 et J27), les puces ont été anesthésiées par le froid puis placées individuellement dans le puits d'une plaque 96 puits blanche (Greiner), déposée préalablement sur de la glace afin de maintenir les insectes endormis lors de la collecte. La plaque a ensuite été scellée à l'aide d'un film transparent (ThinSeal™), réchauffée à température ambiante pendant 15 minutes dont au moins au 5 min dans le luminomètre Centro XS. LB 960 (Berthold); le maintien dans le noir réduit le bruit de fond car il permet aux photons accumulés par les matériaux de s'échapper. A l'issue des 15 min d'incubation, chaque puit a été lu pendant une période de 5 et/ou 15 s en fonction des besoins de l'étude. Après lecture, les puces ont été replacées dans leur cage et maintenues dans une chambre climatique à 75% d'humidité et à 21 ou 26°C en fonction des besoins de l'étude.

Suivi de l'infection à l'aide de la fluorescence. Pour suivre la capacité des souches à coloniser le proventricule, des puces femelles ont été infectées avec *Y. pestis* exprimant la protéine fluorescente verte (GFP) du plasmide pAcGFP(Addgene). Les photos de fluorescence du proventricule de puces sélectionnées au hasard ont été prises avec le microscope à fluorescence Eclipse CiS (Nikon) monté avec un B-2A filtre d'émission (Nikon) et un appareil photo Sight DS-F1c (Nikon). Les photos étaient alors traitées (à l'aide du logiciel ImageJ) pour mesurer la surface dans le proventricule (jaune) occupée par les bactéries (vert) et l'intensité émise par ces bactéries (méthode mise au point au laboratoire) soit de manière automatisée (y2878), soit manuellement (étude des gènes de lipoylation).

Mesure de la corrélation entre la quantité de lumière émise et la charge bactérienne présente dans la puce. Des groupes de 20 puces ont été collectés immédiatement après infection avec différentes quantités de *Y. pestis* KIM6+ bioluminescente et à différents temps (J0, J2, J6, J13 et J27) suite à la prise d'un repas sanguin contenant une charge bactérienne de 5.10^8 bactéries/mL. La luminescence émise par chacune des puces vivantes a été mesurée comme décrit précédemment. Après cette mesure, les puces ont été triturées individuellement (comme décrit plus haut) pour mesurer la lumière émise par 100µl de broyat (avec un temps d'acquisition de 1s) et pour dénombrer la charge bactérienne sur gélose (comme présenté ci-dessus). Des droites de régression et des coefficients de corrélation ont été obtenues et calculées avec le logiciel GraphPrism.

Dosages d'acide lipoïque *in vitro* et *in vivo*. La quantité de lipoate dans les différents milieux et dans des conditions *in vivo* a été testée en utilisant la méthode de Hebert et Guest, comme décrit précédemment avec quelques modifications. Ce test est basé sur une comparaison de la capacité des mutant de *Y. pestis* $\Delta lipA$ à croître dans un milieu de concentration de lipoate inconnue avec sa capacité à croître dans des milieux (dont la composition est détaillée ci-dessus) complété avec diverses concentrations connues de lipoate (c'est-à-dire une courbe standard). Plus spécifiquement, *Y. pestis* $\Delta lipA$ cultivée pendant une nuit dans du LB à 28 ° C a été centrifugée, lavée trois fois dans du PBS et mis en suspension dans PBS avant l'inoculation du milieu d'intérêt avec 5.10^4 bactéries / mL final. Après incubation à 28 ° C sous agitation pendant 22 heures, des dilutions en série du milieu ont été étalées sur de la gélose LB, et les colonies ont été comptées après une incubation de 48 heures à 28 ° C. Pour déterminer la quantité de lipoate *in vivo*, les tubes digestifs de puces ont été collectés, lavés dans du PBS et perforés pour libérer le contenu dans 5 µL de PBS. Ce volume a été ajouté au milieu à base de M9, qui a ensuite été inoculé avec *Y. pestis* $\Delta lipA$ pour déterminer la quantité de lipoate.

Western blot. Des cultures cultivées pendant la nuit de bactéries cultivées dans du LB à 28 ° C ont été culottées par centrifugation, lavées deux fois dans du PBS et lysées à l'aide de l'appareil FastPrep et des tubes lysing matrix B (MP Biomedicals). Après centrifugation, le surnageant a été recueilli et les protéines totales ont été dosées avec un kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific). Des quantités égales de protéines ont été séparées par SDS-PAGE. Deux gels ont été réalisés en même temps: le premier a été coloré avec du bleu de Coomassie (pour contrôler le chargement) et le second gel a été utilisé pour le transfert électrophorétique sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a été colorée de manière réversible avec le colorant Ponceau S (pour

vérifier le transfert correcte des protéines) puis incubé avec un anticorps anti-lipoate polyclonal primaire et un IgG anti-lapin secondaire conjuguée à la peroxydase de raifort (toutes deux de Merck). La chimioluminescence des protéines immunoréactives a été visualisée et quantifiée en utilisant l'appareil LAS-3000 et le logiciel Multi-Gauge, respectivement (tous deux de Fujifilm).

Statistique. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de Prism (GraphPad software)

Ethique. Toutes les expériences impliquant les mammifères ont été approuvées par un comité d'éthique locale (comité 75) en accord avec la législation nationale (Décret 2017-1411, Article R, 214-87 à R,214-126).

Bibliographie

- Alirol, E., Getaz, L., Stoll, B., Chappuis, F. & Loutan, L. Urbanisation and infectious diseases in a globalised world. *The Lancet Infectious Diseases* **11**, 131–141 (2011).
- Andreu, N. *et al.* Optimisation of Bioluminescent Reporters for Use with Mycobacteria. *PLoS ONE* **5**, e10777 (2010).
- Aoyagi, J. A. *et al.* . LPS modification promotes maintenance of *Yersinia pestis* in fleas. *Microbiology* **161**, 628–638 (2015).
- Arts, I. S., Gennaris, A. & Collet, J.-F. Reducing systems protecting the bacterial cell envelope from oxidative damage. *FEBS Letters* **589**, 1559–1568 (2015).
- Ayyadurai, S. *et al.* Long-term persistence of virulent *Yersinia pestis* in soil. *Microbiology* **154**, 2865–2871 (2008).
- Bacot, A. W. LXXXI. FURTHER NOTES ON THE MECHANISM OF THE TRANSMISSION OF PLAGUE BY FLEAS. *JOURNAL OF HYGIENE* **5** (1914).
- Bacot, A. W. & Martin, C. J. LXVII. OBSERVATIONS ON THE MECHANISM OF THE TRANSMISSION OF PLAGUE BY FLEAS. **20** (1915).
- Ben Ari, T. *et al.* . Plague and Climate: Scales Matter. *PLoS Pathog* **7**, e1002160 (2011).
- Bertherat, E. & Bertherat, É. Plague around the world in 2019. *WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD* **4** (2019).
- Bevins, S. N., Baroch, J. A., Nolte, D. L., Zhang, M. & He, H. *Yersinia pestis*: examining wildlife plague surveillance in China and the USA. *Integrative Zoology* **7**, 99–109 (2012).
- Bitam, I., Dittmar, K., Parola, P., Whiting, M. F. & Raoult, D. Fleas and flea-borne diseases. *International Journal of Infectious Diseases* **14**, e667–e676 (2010).
- Bobrov, A. G. *et al.* . Systematic analysis of cyclic di-GMP signalling enzymes and their role in biofilm formation and virulence in *Yersinia pestis*: c-di-GMP signalling enzymes of *Y. pestis*. *Molecular Microbiology* **79**, 533–551 (2011).

- Bobrov, A. G. *et al.* . The *Yersinia pestis* HmsCDE regulatory system is essential for blockage of the oriental rat flea (*Xenopsylla cheopis*), a classic plague vector: *Y. pestis* HmsCDE system is essential for blockage of fleas. *Environ Microbiol* **17**, 947–959 (2015).
- Bontemps–Gallo, S. *et al.* . Nutrient depletion may trigger the *Yersinia pestis* OmpR–EnvZ regulatory system to promote flea–borne plague transmission. *Mol Microbiol* **112**, 1471–1482 (2019).
- Bramanti, B., Dean, K. R., Walløe, L. & Chr. Stenseth, N. The Third Plague Pandemic in Europe. *Proc. R. Soc. B* **286**, 20182429 (2019).
- Brodl, E. *et al.* . The impact of LuxF on light intensity in bacterial bioluminescence. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **207**, 111881 (2020).
- Brodl, E., Winkler, A. & Macheroux, P. Molecular Mechanisms of Bacterial Bioluminescence. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **16**, 551–564 (2018).
- Broussard, L. Biological agents: Weapons of warfare and bioterrorism. *Molecular Diagnosis* **6**, 323–333 (2001).
- Brown, L. D. Immunity of fleas (Order Siphonaptera). *Developmental & Comparative Immunology* **98**, 76–79 (2019).
- Burrough, A. L. Sylvatic plague studies: The vector efficiency of nine species of fleas compared with *Xenopsylla cheopis*. *J Hyg (Lond)* **45**, 371–376
- Busby, S. & Ebright, R. H. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *Journal of Molecular Biology* **293**, 199–213 (1999).
- Butler, T. The black death past and present. 1. Plague in the 1980s. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **83**, 458–460 (1989).
- Butler, T. Plague into the 21st Century. *CLIN INFECT DIS* **49**, 736–742 (2009).
- Byard, R. W. A forensic evaluation of plague – a re-emerging infectious disease with biowarfare potential. *Med Sci Law* 002580242090848 (2020) doi:10.1177/0025802420908483.

- Caccia, S., Casartelli, M. & Tettamanti, G. The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. *Cell Tissue Res* **377**, 505–525 (2019).
- Chain, P. S. G. *et al.* . Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 13826–13831 (2004).
- Cheek, J. *et al.* . A Spatial Model of Shared Risk for Plague and Hantavirus Pulmonary Syndrome in the Southwestern United States. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **77**, 999–1004 (2007).
- Chouikha, I. & Hinnebusch, B. J. *Yersinia*–flea interactions and the evolution of the arthropod-borne transmission route of plague. *Current Opinion in Microbiology* **15**, 239–246 (2012).
- Chouikha, I., Sturdevant, D. E., Jarrett, C., Sun, Y.-C. & Hinnebusch, B. J. Differential Gene Expression Patterns of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* during Infection and Biofilm Formation in the Flea Digestive Tract. *mSystems* **4**, e00217-18, /msystems/4/1/msys.217-18.atom (2019).
- Christensen, Q. H. & Cronan, J. E. Lipoic Acid Synthesis: A New Family of Octanoyltransferases Generally Annotated as Lipoate Protein Ligases. *Biochemistry* **49**, 10024–10036 (2010).
- Cronan, J. E. Assembly of Lipoic Acid on Its Cognate Enzymes: an Extraordinary and Essential Biosynthetic Pathway. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80**, 429–450 (2016).
- Cronan, J. E., Zhao, X. & Jiang, Y. Function, Attachment and Synthesis of Lipoic Acid in *Escherichia coli*. in *Advances in Microbial Physiology* vol. 50 103–146 (Elsevier, 2005).
- Cui, Y. & Song, Y. Genome and Evolution of *Yersinia pestis*. in *Yersinia pestis: Retrospective and Perspective* (eds. Yang, R. & Anisimov, A.) vol. 918 171–192 (Springer Netherlands, 2016).
- Darby, C., Ananth, S. L., Tan, L. & Hinnebusch, B. J. Identification of *gmhA*, a *Yersinia pestis* Gene Required for Flea Blockage, by Using a *Caenorhabditis elegans* Biofilm System. *IAI* **73**, 7236–7242 (2005).

- Demeure, C. E. *et al.* . Yersinia pestis and plague: an updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination, and diagnostics. *Genes Immun* **20**, 357–370 (2019).
- Deng, W. *et al.* . Genome Sequence of Yersinia pestis KIM. *JB* **184**, 4601–4611 (2002).
- Dewitte, A. *et al.* . A refined model of how Yersinia pestis produces a transmissible infection in its flea vector. *PLoS Pathog* **16**, e1008440 (2020).
- Ditchburn, J.-L. & Hodgkins, R. Yersinia pestis, a problem of the past and a re-emerging threat. *Biosafety and Health* **1**, 65–70 (2019).
- Douce, R., Bourguignon, J., Neuburger, M. & Rébeillé, F. The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends in Plant Science* **6**, 167–176 (2001).
- Drancourt, M. Plague in the genomic area. *Clinical Microbiology and Infection* **18**, 224–230 (2012).
- Drancourt, M., Houhamdi, L. & Raoult, D. Yersinia pestis as a telluric, human ectoparasite-borne organism. *The Lancet Infectious Diseases* **6**, 234–241 (2006).
- Dunlap, P. V. Bioluminescence, Microbial. in *Encyclopedia of Microbiology* 45–61 (Elsevier, 2009). doi:10.1016/B978-012373944-5.00066-3.
- Dunlap, P. Biochemistry and Genetics of Bacterial Bioluminescence. in *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology - Volume 1* (eds. Thouand, G. & Marks, R.) vol. 144 37–64 (Springer Berlin Heidelberg, 2014).
- Earl, S. C. *et al.* . Resistance to Innate Immunity Contributes to Colonization of the Insect Gut by Yersinia pestis. *PLoS ONE* **10**, e0133318 (2015).
- Eisen, R. J. *et al.* . Early-phase transmission of Yersinia pestis by unblocked fleas as a mechanism explaining rapidly spreading plague epizootics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 15380–15385 (2006).
- Eisen, R. J., Wilder, A. P., Bearden, S. W., Montenieri, J. A. & Gage, K. L. Early-Phase Transmission of Yersinia pestis by Unblocked Xenopsylla cheopis (Siphonaptera: Pulicidae) Is

- as Efficient as Transmission by Blocked Fleas. *6* (2007).
- Eisen, R. J. *et al.* Persistence of *Yersinia pestis* in Soil Under Natural Conditions. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 941–943 (2008).
- Eisen, R. J. & Gage, K. L. Transmission of Flea-Borne Zoonotic Agents. *Annu. Rev. Entomol.* **57**, 61–82 (2012).
- Erickson, D. L. *et al.* Lipopolysaccharide Biosynthesis Genes of *Yersinia pseudotuberculosis* Promote Resistance to Antimicrobial Chemokines. *PLoS ONE* **11**, e0157092 (2016).
- Eskey, C.R. Fleas as Vectors of Plague. *Am J Public Health Nation Health.* **28**, 1305-1310 (1938)
- Felek, S. *et al.* . Phosphoglucomutase of *Yersinia pestis* Is Required for Autoaggregation and Polymyxin B Resistance. *IAI* **78**, 1163–1175 (2010).
- Fong, S.-T., Camakaris, J. & Lee, B. T. O. Molecular genetics of a chromosomal locus involved in copper tolerance in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **15**, 1127–1137 (1995).
- Frean, J. Susceptibility of *Yersinia pestis* to novel and conventional antimicrobial agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**, 294–296 (2003).
- Fujiwara, K., Takeuchi, S., Okamura-Ikeda, K. & Motokawa, Y. Purification, Characterization, and cDNA Cloning of Lipoate-activating Enzyme from Bovine Liver. *J. Biol. Chem.* **276**, 28819–28823 (2001).
- Gage, K. L. & Kosoy, M. Y. NATURAL HISTORY OF PLAGUE: Perspectives from More than a Century of Research. *Annu. Rev. Entomol.* **50**, 505–528 (2005).
- Galimand, M. *et al.* . Multidrug Resistance in *Yersinia pestis* Mediated by a Transferable Plasmid. *N Engl J Med* **337**, 677–681 (1997).
- Galy, A., Loubet, P., Peiffer-Smadja, N. & Yazdanpanah, Y. La peste : mise au point et actualités. *La Revue de Médecine Interne* **39**, 863–868 (2018).
- Gao, H. *et al.* . Phenotypic and transcriptional analysis of the osmotic regulator OmpR in *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol* **11**, 39 (2011).

- Geng, J. *et al.* . Involvement of the Post-Transcriptional Regulator Hfq in *Yersinia pestis* Virulence. *PLoS ONE* **4**, e6213 (2009).
- Gratz, N. G. EMERGING AND RESURGING VECTOR-BORNE DISEASES. *Annu. Rev. Entomol.* **44**, 51–75 (1999).
- Guilhaudis, L. *et al.* . Investigation of the Local Structure and Dynamics of the H Subunit of the Mitochondrial Glycine Decarboxylase Using Heteronuclear NMR Spectroscopy †. *Biochemistry* **38**, 8334–8346 (1999).
- Guiyoule, A. *et al.* . Transferable Plasmid-Mediated Resistance to Streptomycin in a Clinical Isolate of *Yersinia pestis*. *Emerging Infectious Diseases* **7**, 6 (2001).
- Haddock, S. H. D., Moline, M. A. & Case, J. F. Bioluminescence in the Sea. *Annu. Rev. Mar. Sci.* **2**, 443–493 (2010).
- Han, Y. *et al.* . Microarray Analysis of Temperature-Induced Transcriptome of *Yersinia pestis*. *Microbiology and Immunology* **48**, 791–805 (2004).
- Handschumacher, P., Duplantier, J.-M. & Chanteau, S. La résurgence de la peste à Madagascar : une maladie centenaire à l'épreuve de l'histoire et de l'écologie. *espos* **18**, 195–208 (2000).
- Hao, Z., Kasumba, I. & Aksoy, S. Proventriculus (cardia) plays a crucial role in immunity in tsetse fly (Diptera: Glossinidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **33**, 1155–1164 (2003).
- Hassell, J. M., Begon, M., Ward, M. J. & Fèvre, E. M. Urbanization and Disease Emergence: Dynamics at the Wildlife–Livestock–Human Interface. *Trends in Ecology & Evolution* **32**, 55–67 (2017).
- Hayden, M. A., Huang, I. Y., Iliopoulos, G., Orozco, M. & Ashley, G. W. Biosynthesis of lipoic acid: Characterization of the lipoic acid auxotrophs *Escherichia coli* W1485-lip2 and JRG33-lip9. *Biochemistry* **32**, 3778–3782 (1993).
- Hernandez, E. Antibiotic susceptibilities of 94 isolates of *Yersinia pestis* to 24 antimicrobial agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**, 1029–1031 (2003).

- Heroven, A. K. & Dersch, P. Coregulation of host-adapted metabolism and virulence by pathogenic yersiniae. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, (2014).
- Hinnebusch, B. J., Jarrett, C. O. & Bland, D. M. “Fleaing” the Plague: Adaptations of *Yersinia pestis* to Its Insect Vector That Lead to Transmission. *PLoS Pathogens* **13**, e1005321 (2017).
- Hinnebusch, B. J. Role of *Yersinia Murine* Toxin in Survival of *Yersinia pestis* in the Midgut of the Flea Vector. *Science* **296**, 733–735 (2002).
- Hinnebusch, B. J., Perry, R. D. & Schwan, T. G. Role of the *Yersinia pestis* Hemin Storage (hms) Locus in the Transmission of Plague by Fleas. *Science* **273**, 367–370 (1996).
- Hu, P. *et al.* . Structural Organization of Virulence-Associated Plasmids of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* **180**, 5192–5202 (1998).
- Inglesby, T. V. *et al.* . Plague as a Biological Weapon: Medical and Public Health Management. *JAMA* **283**, 2281 (2000).
- Jordan, S. W. & Cronan, J. E. The *Escherichia coli* lipB Gene Encodes Lipoyl (Octanoyl)-Acyl Carrier Protein:Protein Transferase. *JB* **185**, 1582–1589 (2003).
- Kartman, L. The concept of vector efficiency in experimental studies of plague. *Experimental Parasitology* **6**, 599–609 (1957).
- Khan, M. D., Thi Vu, H. H., Lai, Q. T. & Ahn, J. W. Aggravation of Human Diseases and Climate Change Nexus. *IJERPH* **16**, 2799 (2019).
- Khokhlova, I. S., Serobyanyan, V., Krasnov, B. R. & Degen, A. A. Effect of host gender on blood digestion in fleas: mediating role of environment. *Parasitol Res* **105**, 1667–1673 (2009).
- Kiefer, D. *et al.* . Phenotypical Characterization of Mongolian *Yersinia pestis* Strains. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **12**, 183–188 (2012).
- Kirillina, O., Fetherston, J. D., Bobrov, A. G., Abney, J. & Perry, R. D. HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hms-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis*: Regulation of Hms biofilm formation in *Y. pestis*. *Molecular Microbiology* **85**, 103–115 (2012).

Microbiology **54**, 75–88 (2004).

Korhonen, T. K., Haiko, J., Laakkonen, L., Järvinen, H. M. & Westerlund-Wikström, B. Fibrinolytic and coagulative activities of *Yersinia pestis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, (2013).

Kukkonen, M. & Korhonen, T. K. The omptin family of enterobacterial surface proteases/adhesins: from housekeeping in *Escherichia coli* to systemic spread of *Yersinia pestis*. *International Journal of Medical Microbiology* **294**, 7–14 (2004).

Laczkovich, I. *et al.* . Increased flexibility in the use of exogenous lipoic acid by *Staphylococcus aureus*: Lipoic acid salvage in *S. aureus*. *Molecular Microbiology* **109**, 150–168 (2018).

Laroche, M., Raoult, D. & Parola, P. Insects and the Transmission of Bacterial Agents. *Microbiology Spectrum* **6**, (2018).

Leevy, W. M., Serazin, N. & Smith, B. D. Optical imaging of bacterial infection models. *Drug Discovery Today: Disease Models* **4**, 91–97 (2007).

Liu, L. *et al.* CRP Is an Activator of *Yersinia pestis* Biofilm Formation that Operates via a Mechanism Involving *gmhA* and *waaAE-coaD*. *Front. Microbiol.* **7**, (2016).

Ligon, B. L. Plague: A Review of its History and Potential as a Biological Weapon. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* **17**, 161–170 (2006).

Lindler, L. E., Plano, G. V., Burland, V., Mayhew, G. F. & Blattner, F. R. Complete DNA Sequence and Detailed Analysis of the *Yersinia pestis* KIM5 Plasmid Encoding Murine Toxin and Capsular Antigen. *Infect. Immun.* **66**, 5731–5742 (1998).

Lorange, E. A., Race, B. L., Sebbane, F. & Joseph Hinnebusch, B. Poor Vector Competence of Fleas and the Evolution of Hypervirulence in *Yersinia pestis*. *J INFECT DIS* **191**, 1907–1912 (2005).

Macek, B. *et al.* . Protein post-translational modifications in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **17**, 651–664 (2019).

Marvin, M. E., Williams, P. H. & Cashmore, A. M. The isolation and characterisation of a

- Saccharomyces cerevisiae gene (LIP2) involved in the attachment of lipoic acid groups to mitochondrial enzymes. *FEMS Microbiology Letters* **199**, 131–136 (2001).
- Mayr, J. A., Feichtinger, R. G., Tort, F., Ribes, A. & Sperl, W. Lipoic acid biosynthesis defects. *J Inherit Metab Dis* **37**, 553–563 (2014).
- McNally, A., Thomson, N. R., Reuter, S. & Wren, B. W. ‘Add, stir and reduce’: Yersinia spp. as model bacteria for pathogen evolution. *Nat Rev Microbiol* **14**, 177–190 (2016).
- Miguel-Aliaga, I., Jasper, H. & Lemaitre, B. Anatomy and Physiology of the Digestive Tract of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **210**, 357–396 (2018).
- Miyashiro, T. & Ruby, E. G. Shedding light on bioluminescence regulation in Vibrio fischeri: Shedding light on bioluminescence regulation in Vibrio fischeri. *Molecular Microbiology* **84**, 795–806 (2012).
- Mooney, B. P., Miernyk, J. A. & Randall, D. D. THE COMPLEX FATE OF α -KETOACIDS. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 357–375 (2002).
- Morris, T. W., Reed, K. E. & Cronan, J. E. Lipoic acid metabolism in Escherichia coli: the lplA and lipB genes define redundant pathways for ligation of lipoyl groups to apoprotein. *Journal of bacteriology* **177**, 1–10 (1995).
- Motin, V. L. *et al.* . Temporal Global Changes in Gene Expression during Temperature Transition in Yersinia pestis. *JB* **186**, 6298–6305 (2004).
- Nandineni, M. R., Laishram, R. S. & Gowrishankar, J. Osmosensitivity Associated with Insertions in argP (iciA) or glnE in Glutamate Synthase-Deficient Mutants of Escherichia coli. *JB* **186**, 6391–6399 (2004).
- Nham, T., Filali, S., Danne, C., Derbise, A. & Carniel, E. Imaging of Bubonic Plague Dynamics by In Vivo Tracking of Bioluminescent Yersinia pestis. *PLoS ONE* **7**, e34714 (2012).
- O’Neill J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations.

- Parkhill, J. *et al.* . Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* **413**, 523–527 (2001).
- Perham, R. N. Domains, motifs, and linkers in 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes: a paradigm in the design of a multifunctional protein. *Biochemistry* **30**, 8501–8512 (1991).
- Perry, R. D. & Fetherston, J. D. *Yersinia pestis*—Etiologic Agent of Plague. *CLIN. MICROBIOL. REV.* **10**, 32 (1997).
- Petersen, S. & Young, G. M. Essential Role for Cyclic AMP and Its Receptor Protein in *Yersinia enterocolitica* Virulence. *IAI* **70**, 3665–3672 (2002).
- Pérez-Gutiérrez, C., Llobet, E., Llompart, C. M., Reinés, M. & Bengoechea, J. A. Role of Lipid A Acylation in *Yersinia enterocolitica* Virulence. *IAI* **78**, 2768–2781 (2010).
- Pohanka, M. & Skládal, P. *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. The most important bacterial warfare agents — review. *Folia Microbiol* **54**, 263–272 (2009).
- Pollitzer, R. Plague. *World health organisation monograph series 22*. Geneva : World health organisation. Geneva, Switzerland.
- Ralph, S. A. Evolutionary Pressures on Apicoplast Transit Peptides. *Molecular Biology and Evolution* **21**, 2183–2194 (2004).
- Rasetto, N. B., Lavatelli, A., Martin, N. & Mansilla, M. C. Unravelling the lipoyl-relay of exogenous lipoate utilization in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **112**, 302–316 (2019).
- Rasmussen, S. *et al.* . Early Divergent Strains of *Yersinia pestis* in Eurasia 5,000 Years Ago. *Cell* **163**, 571–582 (2015).
- Rebeil, R. *et al.* Characterization of Late Acyltransferase Genes of *Yersinia pestis* and Their Role in Temperature-Dependent Lipid A Variation. *JB* **188**, 1381–1388 (2006).
- Rebeil, R. *et al.* . Induction of the *Yersinia pestis* PhoP-PhoQ Regulatory System in the Flea and Its Role in Producing a Transmissible Infection. *Journal of Bacteriology* **195**, 1920–1930 (2013).

- Reboul, A. *et al.*. Yersinia pestis Requires the 2-Component Regulatory System OmpR-EnvZ to Resist Innate Immunity During the Early and Late Stages of Plague. *Journal of Infectious Diseases* **210**, 1367–1375 (2014).
- Reed, K. E. & Cronan, J. E. Lipoic Acid Metabolism in Escherichia coli: Sequencing and Functional Characterization of the hpA and lpB Genes. **175**, 12 (1993).
- Rempe, K. A., Hinz, A. K. & Vadyvaloo, V. Hfq Regulates Biofilm Gut Blockage That Facilitates Flea-Borne Transmission of Yersinia pestis. *Journal of Bacteriology* **194**, 2036–2040 (2012).
- Ren, G.-X., Yan, H.-Q., Zhu, H., Guo, X.-P. & Sun, Y.-C. HmsC, a periplasmic protein, controls biofilm formation via repression of HmsD, a diguanylate cyclase in *Yersinia pestis*: HmsC controls biofilms by repression of HmsD. *Environ Microbiol* **16**, 1202–1216 (2014).
- Renna, M. C. Regulation of the Bacillus subtilis aisS, alsD, and alsR Genes Involved in Post-Exponential-Phase Production of Acetoin. **175**, 13 (1993).
- Ribeiro, José M. C., Vaughan, J. A. & Azad, A. F. Characterization of the salivary apyrase activity of three rodent flea species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **95**, 215–218 (1990).
- Riedel, S. Plague: From Natural Disease to Bioterrorism. *Baylor University Medical Center Proceedings* **18**, 116–124 (2005).
- Rochette, L., Ghibu, S., Muresan, A. & Vergely, C. Alpha-lipoic acid: molecular mechanisms and therapeutic potential in diabetes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **93**, 1021–1027 (2015).
- Rock, C. O. Opening a New Path to Lipoic Acid. *JB* **191**, 6782–6784 (2009).
- Rollins, MD, S. E., Rollins, PhD, S. M. & Ryan, MD, E. T. Yersinia pestis and the Plague. *Pathology Patterns Reviews* **119**, 78–85 (2003).
- Schiano, C. A. & Lathem, W. W. Post-Transcriptional Regulation of Gene Expression in Yersinia Species. *Front. Cell. Inf. Microbio.* **2**, (2012).
- Schonauer, M. S., Kastaniotis, A. J., Kursu, V. A. S., Hiltunen, J. K. & Dieckmann, C. L. Lipoic

- Acid Synthesis and Attachment in Yeast Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **284**, 23234–23242 (2009).
- Sebbane, F., Gardner, D., Long, D., Gowen, B. B. & Hinnebusch, B. J. Kinetics of Disease Progression and Host Response in a Rat Model of Bubonic Plague. *The American Journal of Pathology* **166**, 1427–1439 (2005).
- Sherpa, R. T., Reese C. J., Montazeri Aliabadi H. Application of iChip to Grow « Uncultivable » Microorganisms and its Impact on Antibiotic Discovery. *J Pharm Pharm Sci.* 2015 ; 18(3), 303-315.
- Soreze, Y. *et al.* . Mutations in human lipoyltransferase gene LIPT1 cause a Leigh disease with secondary deficiency for pyruvate and alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *Orphanet J Rare Dis* **8**, 192 (2013).
- Spalding, M. D. & Prigge, S. T. Lipoic Acid Metabolism in Microbial Pathogens. *MMBR* **74**, 200–228 (2010).
- Spencer, M. E. & Guest, J. R. Transcription analysis of the *sucAB*, *aceEF* and *lpd* genes of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **260**, 10 (1985).
- Stauffer, L. T. & Stauffer, G. V. GcvA interacts with both the α and σ subunits of RNA polymerase to activate the *Escherichia coli gcvB* gene and the *gcvTHP* operon. *FEMS Microbiology Letters* **242**, 333–338 (2005).
- Stenseth, N. C. *et al.* Plague: Past, Present, and Future. *PLoS Medicine* **5**, 5 (2008).
- Strecker, A., Schubert, C., Zedler, S., Steinmetz, P. & Uden, G. DcuA of aerobically grown *Escherichia coli* serves as a nitrogen shuttle (L-aspartate/fumarate) for nitrogen uptake. *Molecular Microbiology* **109**, 801–811 (2018).
- Sun, Y.-C., Hinnebusch, B. J. & Darby, C. Experimental evidence for negative selection in the evolution of a *Yersinia pestis* pseudogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 8097–8101 (2008).

- Sun, Y., Connor, M. G., Pennington, J. M. & Lawrenz, M. B. Development of Bioluminescent Bioreporters for In Vitro and In Vivo Tracking of *Yersinia pestis*. *PLoS ONE* **7**, e47123 (2012).
- Sun, Y.-C. *et al.* . Differential Control of *Yersinia pestis* Biofilm Formation In Vitro and in the Flea Vector by Two c-di-GMP Diguanylate Cyclases. *PLoS ONE* **6**, e19267 (2011).
- Sung, N.-D. & Lee, C. Y. The lux Genes and Riboflavin Genes in Bioluminescent System of *Photobacterium leiognathi* are under Common Regulation. *5* (2004).
- Suutari, M. & Laakso, S. Microbial Fatty Acids and Thermal Adaptation. *Critical Reviews in Microbiology* **20**, 285–328 (1994).
- Tan, L. & Darby, C. *Yersinia pestis* YrbH is a multifunctional protein required for both 3-deoxy-d-manno-oct-2-ulosonic acid biosynthesis and biofilm formation. *Mol Microbiol* **61**, 861–870 (2006).
- Terra, W. R. & Ferreira, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **109**, 1–62 (1994).
- Ulitzur, S. & Hastings, J. W. Evidence for tetradecanal as the natural aldehyde in bacterial bioluminescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**, 265–267 (1979).
- Vadyvaloo, V. & Hinz, A. K. A LysR-Type Transcriptional Regulator, RovM, Senses Nutritional Cues Suggesting that It Is Involved in Metabolic Adaptation of *Yersinia pestis* to the Flea Gut. *PLoS ONE* **10**, e0137508 (2015).
- Vadyvaloo, V., Jarrett, C., Sturdevant, D. E., Sebbane, F. & Hinnebusch, B. J. Transit through the Flea Vector Induces a Pretransmission Innate Immunity Resistance Phenotype in *Yersinia pestis*. *PLoS Pathog* **6**, e1000783 (2010).
- Vadyvaloo, V., Sebbane, F., Hinnebusch, B. J., Sturdevant, D. & Jarrett, C. Analysis of *Yersinia pestis* Gene Expression in the Flea Vector. in *The Genus Yersinia* (eds. Perry, R. D. & Fetherston, J. D.) vol. 603 192–200 (Springer New York, 2007).

- Vadyvaloo, V. *et al.* . Role of the PhoP–PhoQ gene regulatory system in adaptation of *Yersinia pestis* to environmental stress in the flea digestive tract. *Microbiology* **161**, 1198–1210 (2015).
- Vallès, X. *et al.* Human plague: An old scourge that needs new answers. *PLoS Negl Trop Dis* **14**, e0008251 (2020).
- Vise, A. B. Some Properties of a Mutant Strain of *Escherichia coli* which Requires Lysine and Methionine or Lipoic Acid for Growth. *J Biol Chem* **7** (1967)
- Wagner, A. F. V. *et al.* YfiD of *Escherichia coli* and Y06I of Bacteriophage T4 as Autonomous Glycyl Radical Cofactors Reconstituting the Catalytic Center of Oxygen-Fragmented Pyruvate Formate-Lyase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **285**, 456–462 (2001).
- Wheeler, C. M. & Douglas, J. R. Sylvatic Plague Studies: V. The Determination of Vector Efficiency. *Journal of Infectious Diseases* **77**, 1–12 (1945).
- Willias, S. P., Chauhan, S., Lo, C.-C., Chain, P. S. G. & Motin, V. L. CRP-Mediated Carbon Catabolite Regulation of *Yersinia pestis* Biofilm Formation Is Enhanced by the Carbon Storage Regulator Protein, CsrA. *PLoS ONE* **10**, e0135481 (2015).
- Wimsatt, J. & Biggins, D. E. A review of plague persistence with special emphasis on fleas. *J VECTOR BORNE DIS* **15** (2009).
- Wyborn, N. R. *et al.* Expression of the *Escherichia coli* yfiD gene responds to intracellular pH and reduces the accumulation of acidic metabolic end products. *Microbiology* **148**, 1015–1026 (2002).
- Xiao, Z. & Xu, P. Acetoin Metabolism in Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* **33**, 127–140 (2007).
- Zeppelini, C. G., de Almeida, A. M. P. & Cordeiro-Estrela, P. Zoonoses As Ecological Entities: A Case Review of Plague. *PLoS Negl Trop Dis* **10**, e0004949 (2016).
- Zhan, L. *et al.*. The Cyclic AMP Receptor Protein, CRP, Is Required for Both Virulence and

- Expression of the Minimal CRP Regulon in *Yersinia pestis* Biovar microtus. *IAI* **76**, 5028–5037 (2008).
- Zhang, Y.-M. & Rock, C. O. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **6**, 222–233 (2008).
- Zhang, L., Alfano, J. R. & Becker, D. F. Proline Metabolism Increases *katG* Expression and Oxidative Stress Resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **197**, 431–440 (2015).
- Zhao, X., Miller, J. R., Jiang, Y., Marletta, M. A. & Cronan, J. E. Assembly of the Covalent Linkage between Lipoic Acid and Its Cognate Enzymes. *Chemistry & Biology* **10**, 1293–1302 (2003).
- Zhou, D., Han, Y. & Yang, R. Molecular and physiological insights into plague transmission, virulence and etiology. *Microbes and Infection* **8**, 273–284 (2006).
- Zhou, W., Russell, C. W., Johnson, K. L., Mortensen, R. D. & Erickson, D. L. Gene Expression Analysis of *Xenopsylla cheopis* (Siphonaptera: Pulicidae) Suggests a Role for Reactive Oxygen Species in Response to *Yersinia pestis* Infection. *jnl. med. entom.* **49**, 364–370 (2012).
- Zhou, Y. *et al.* . Bioluminescent tracing of a *Yersinia pestis* pCD1 + -mutant and *Yersinia pseudotuberculosis* in subcutaneously infected mice. *Microbes and Infection* **20**, 166–175 (2018).

Nouvelles perspectives sur les mécanismes génétiques impliqués dans la propagation de la peste par les puces grâce à l'utilisation de la bioluminescence.

L'agent de la peste, *Yersinia pestis*, obstrue le tube digestif de la puce pour augmenter ses chances d'être transmise à un hôte mammifère. Ici, nous avons cherché à identifier et à étudier le rôle de nouveaux gènes de *Y. pestis* impliqués dans la production d'une infection transmissible par les puces. Pour cela, nous avons d'abord développé une méthode (fondée sur la bioluminescence) qui permet d'évaluer des mutants dans l'insecte à un rythme sans précédent. Puis, nous avons appliqué notre méthode pour cribler une banque de mutants (chacun dépourvu d'un ou plusieurs des gènes précédemment identifiés comme étant surexprimés chez les puces) que nous avons générée. Notre criblage a listé plusieurs nouveaux facteurs potentiellement importants dans la transmission de *Y. pestis* par les puces. Parmi eux figure LipB qui catalyse la première étape de synthèse du lipoate (un cofacteur greffé de manière covalente à au moins trois enzymes du métabolisme central). Nos études ultérieures ont également révélé que la deuxième et dernière enzyme de la voie biosynthèse du lipoate, LipA, mais aussi la lipoate ligase LplA (greffant sur les apoenzymes le lipoate collecté depuis le milieu extérieur) sont également requis pour produire une infection transmissible par les puces. Grâce à des approches bactériologiques, microscopiques et biochimiques réalisées *in vitro*, *ex-vivo* et *in vivo*, nous avons mis au jour que la voie de biosynthèse et de récupération du lipoate sont impliquées dans la colonisation du proventricule et de l'estomac de l'insecte. De manière intéressante, nous avons également révélé que LplA participe, grâce son activité octanoate ligase, à la première étape de la biosynthèse du lipoate pendant la colonisation du proventricule, mais pas pendant la colonisation de l'estomac. Enfin, nous avons découvert que, dans la puce, *Y. pestis* utilise principalement le lipoate fourni par la protéolyse digestive (vraisemblablement sous forme de peptides de lipoylés) plutôt que le lipoate libre dans le sang car le lipoate est rapidement épuisé par le vecteur. Ainsi, des facteurs spatiaux et temporels dictent les stratégies de lipoylation de la bactérie lors d'une infection, et le réapprovisionnement en lipoate par protéolyse digestive dans le vecteur pourrait constituer un talon d'Achille exploité par les pathogènes.

Mot clés: Transmission, *Yersinia pestis*, lipoate, bioluminescence, peste, puce.

New insights into the genetic mechanisms used in the spread of plague by fleas through the use of bioluminescence.

The agent of the plague, *Yersinia pestis*, obstructs the flea's digestive tract to be transmitted by fleas. Here, we sought to identify and study the role of new *Y. pestis* genes involved in the production of a transmissible infection in fleas. To this end, we developed a bioluminescence-based approach and employed it to investigate the mechanisms of pathogenesis at an unprecedented level of detail. Notably, we used our method to screen a library of mutants (each lacking one or more of the genes previously identified as over-expressed in fleas) that we generated. Our screening listed several new and potentially important factors needed for flea-borne transmission of *Y. pestis*. Among them is LipB that catalyzes the first step of lipoate synthesis (a cofactor covalently attached to at least three central metabolism enzymes). Our subsequent studies have also revealed that the second and last enzyme of the lipoate biosynthesis pathway, LipA, but also the lipoate ligase LplA (attaching lipoate scavenged from the environment to apoenzymes) are also required to produce a transmissible infection in fleas. Thanks to bacteriological, microscopic and biochemical approaches carried out *in vitro*, *ex-vivo* and *in vivo*, we have revealed that both the lipoate biosynthesis pathway and the lipoate scavenge pathway are involved in the colonization of the insect's proventriculus and midgut. Interestingly, we also revealed the salvage pathway's enzyme LplA enhances the first step in lipoate biosynthesis during foregut colonization but not during midgut colonization thanks to its octanoate activity. Lastly, we found that *Y. pestis* primarily uses lipoate provided by digestive proteolysis (presumably as lipoyl peptides) rather than free lipoate in blood, which is quickly depleted by the vector. Thus, spatial and temporal factors dictate the bacterium's lipoylation strategies during an infection, and replenishment of lipoate by digestive proteolysis in the vector might constitute an Achilles' heel that is exploited by pathogens.

Keys word : Transmission, *Yersinia pestis*, lipoate, bioluminescence, plague, flea.