

50376
1989
111

50376
1989
111

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

THESE

DE DOCTORAT DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

PAR

PATRICE PHEULPIN

CONSTRUCTION DE VECTEURS

NAVETTES

ESCHERICHIA COLI - BACTEROIDES



1989

Soutenue le 18 Juillet devant la commission d'examen

Président	: M. Guillaume	Professeur
Rapporteurs	: Mme Truffaut	Professeur
	: M. Ball	Professeur
Examineurs:	M. Courtois	Professeur
	: M. Dubourguier	Directeur de recherche

N° d'ordre: 409

Je remercie Monsieur le Professeur GUILLAUME de m'avoir accueilli au laboratoire de Microbiologie dont il assure la direction, ainsi que Madame le Professeur TRUFFAUT et Monsieur le Professeur BALL qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je suis également reconnaissant à Monsieur le Professeur COURTOIS et Monsieur DUBOURGUIER de bien vouloir examiner ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude et toute ma sympathie à Monsieur BECHET qui tout au long de ces trois années m'a apporté toute son aide, sa compétence, avec la plus grande gentillesse.

Enfin, je remercie Monsieur JONCQUIERT et Monsieur TIERNY pour leur aide et leur soutien quotidien dans une ambiance toujours amicale.

<u>1 GENERALITES-HISTORIQUE</u>	7
<u>2 DONNEES TAXONOMIQUES</u>	9
<u>3-HABITAT DES BACTERIES DU GENRE BACTEROIDES</u>	16
I GENERALITES.....	16
II BACTEROIDES DU TRACTUS DIGESTIF DE L'HOMME.....	17
<u>A- Bacteroides</u> de la flore buccale.....	17
<u>B- Bacteroides</u> du côlon.....	18
a-Rôle écologique de <i>Bacteroides</i>	18
b-Pathogénicité.....	18
c-Relation entre <i>Bacteroides</i> et l'étiologie du cancer du côlon.....	19
III BACTEROIDES DU TRACTUS DIGESTIF DES RUMINANTS.....	20
<u>4- BESOINS NUTRITIONNELS ET METABOLISME ENERGETIQUE</u>	24
I Besoins nutritionnels.....	24
II Métabolisme énergétique.....	25
<u>A- Dégradation</u> des hexoses en pyruvate.....	25
<u>B- Intervention</u> du CO ₂ dans le catabolisme du phospho-énol-pyruvate, dans la formation de l'acide oxaloacétique.....	25
<u>C- Formation</u> d'autres produits de fermentation.....	26
<u>D- Réactions</u> de phosphorylation oxydative.....	26
<u>5 RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES</u>	29
<u>6 PLASMIDES CRYPTIQUES</u>	32
<u>7 PLASMIDES NATURELS DONT LE PHENOTYPE EST CONNU</u>	35
<u>A- pBF4</u>	35
<u>B- pBFTM10</u>	36
<u>C- pBI136</u>	37
<u>D- pRYC3373</u>	37
<u>E- pRRI4</u>	38
<u>8 DESCRIPTION DES GENES RESPONSABLES DE LA RESISTANCE A LA CLINDAMYCINE</u>	41
<u>9 DESCRIPTION DES GENES RESPONSABLES DE LA RESISTANCE A LA TETRACYCLINE</u>	47
I Résistance associée au gène <i>ermF</i>	47
II Résistance de nature chromosomique.....	48

<u>10 UTILISATION DES CARACTERES MARQUEURS DE BACTEROIDES</u>	
<u>EXISTANTS POUR LA REALISATION DE VECTEURS DE CLONAGE.....</u>	50
I- Vecteurs navettes transférables vers <i>Bacteroides</i> à partir d' <i>E. coli</i> par mobilisation.....	51
A- pDP1.....	51
B- pE5-2.....	52
C- pVAL-1.....	55
D- pNJR1, pNJR5.....	56
II-Vecteurs navettes transférables par transformation.....	56
<u>11 MODE DE TRANSFERT DE CES VECTEURS.....</u>	60
I- Conjugaison.....	60
II- Transformation.....	60
a- Compétence naturelle.....	61
b- Compétence induite artificiellement.....	61
Transformation avec du polyéthylène-glycol.....	62
Transformation des bactéries par électroporation.....	62
<u>12 PRINCIPAUX GENES CLONES.....</u>	65
I Gènes de <i>Bacteroides</i> clonés chez <i>E. coli</i>	65
II Expression de gènes originaires de bactéries Gram négatives comme <i>E. coli</i> chez <i>Bacteroides</i>	65

MATERIELS ET METHODES.

<u>1- BACTERIES UTILISEES</u>	69
I. <i>Escherichia coli</i>	69
II. <i>Bacteroides</i>	69
<u>2- PLASMIDES</u>	69
<u>3- MILIEUX ET TECHNIQUES DE CULTURES</u>	73
I. Culture d' <i>Escherichia coli</i>	73
Milieu de Luria et Burrous. (LB)	
II. Culture de <i>Bacteroides</i>	74
A- Bouillon cerveau-coeur (BHI).....	74
B- Culture de <i>Bacteroides ruminicola</i>	74
C- Conditions de culture de <i>Bacteroides</i>	75
III Antibiotiques utilisés pour la réalisation des milieux sélectifs.....	75
<u>4- METHODES D'EXTRACTION DU DNA PLASMIDIQUE</u>	76
I. Technique rapide selon Grosveld et coll.....	76
II. Méthode de préparation de plasmides selon Ish-Horowicz et Burke.....	77
- Adaptation de la méthode de Ish-Horowicz à l'extraction de plasmides de <i>Bacteroides</i>	79
<u>5- EXTRACTION DE DNA TOTAL DE <i>BACTEROIDES</i></u>	80
<u>6- METHODES ELECTROPHORETIQUES</u>	81
I. Electrophorèse horizontale.....	81
II. Lyse directe sur gel par électrophorèse verticale.....	82
III. Electroélution.....	84
<u>7- METHODES DE TRANSFERT DU DNA</u>	85
I. Transformation.....	85
Protocole utilisé pour <i>E. coli</i> .	
II. Conjugaison.....	85

8-UTILISATION DES ENZYMES.....86
I. Enzymes de restriction.....86
II. Ligase.....86
III. Phosphatase alcaline.....86
IV. Nucléase S1.....86

RESULTATS ET DISCUSSION.

<u>1 REALISATION DE pKBF367-1</u>	89
I Généralités.....	89
A- Choix du plasmide originaire de <i>Bacteroides</i>	90
B- Choix du plasmide originaire de <i>E. coli</i>	90
C- Choix des caractères marqueurs s'exprimant chez <i>Bacteroides</i>	90
II Construction.....	92
A- 1 ^{ere} Etape: Insertion de pBF367 au site <i>BstEII</i> de pKC7.	
B- 2 ^{eme} Etape: Insertion du caractère marqueur.....	93
C- 3 ^{eme} Etape: Analyse des plasmides des transformants..	93
D- Propriétés attendues.....	93
III Transfert de pKBF367-1 par conjugaison.....	94
A- Transfert vers <i>E. coli</i>	94
B- Transfert vers <i>Bacteroides</i>	97
<u>2 REALISATION DE pKC7-pBFTM10</u>	98
I Construction.....	98
II Transfert de pKC7/pBFTM10 par conjugaison.....	98
<u>3 RECHERCHE DES SOUCHES RECEPTRICES ACCEPTANT LE VECTEUR</u>	101
<u>4 LOCALISATION DE LA REGION DE pKBF367-1 MOBILISEE PAR R751</u> ..	105
<u>5. REDUCTION DE LA TAILLE DE pKBF367-1</u>	105
I Réalisation des dérivés de délétion.....	106
A- 1 ^{ere} Etape. Délétion <i>NdeI</i> - <i>BamHI</i>	106
B- 2 ^{eme} Etape: Délétion par <i>ScaI</i>	107
C- 3 ^{eme} Etape: Délétion par <i>HindIII</i>	108
II Réalisation des cartes de restriction des différents vecteurs.....	108
III Transfert des vecteurs réalisés.....	108
A- Transfert vers <i>E. coli</i>	108
B- Transfert vers <i>Bacteroides distasonis</i> 419.....	116

<u>6. RECHERCHE DES REGIONS NECESSAIRES A LA MOBILISATION ET A LA REPLICATION DE pBF367.....</u>	117
I. Construction des dérivés de délétion de pKBF367-12....	117
II. Transfert des dérivés de délétion.....	117
<u>7. TRANSFERT DES VECTEURS CONSTRUIT VERS D'AUTRES MEMBRES DU GENRE BACTEROIDES.....</u>	123
I. Transfert de pKBF367-12 vers <i>Bacteroides ruminicola</i> ...	123
II. Choix de la souche.....	123
III. Conjugaison.....	124
<u>8. CONSTRUCTION DU VECTEUR pKBR23.....</u>	125
I. Choix du plasmide s'exprimant chez <i>E. coli</i>	125
II. Choix du plasmide originaire de <i>B. ruminicola</i>	125
III. Construction.....	125
IV. Transfert de pKBR23-1 et pKBR23-2 par conjugaison....	126
<u>9- UTILISATION DES VECTEURS CONSTRUIITS DANS L'ETUDE DE L'INSERTION DE FRAGMENTS DE DNA.....</u>	131
I Clonage de gènes de <i>Bacteroides</i>	131
A- Choix du caractère marqueur.....	131
B- Choix du vecteur.....	131
C- Choix de la souche résistante à la carbénicilline..	132
D- Clonage.....	132
II Clonage de gènes de bactéries aérobies.....	133
<u>CONCLUSION.....</u>	136
<u>BIBLIOGRAPHIE.....</u>	142

-INTRODUCTION-

1 GENERALITES-HISTORIQUE.

Les premiers êtres vivants qui apparurent sur terre se sont développés en absence d'oxygène. En effet l'atmosphère primitive était essentiellement composée de CH_4 , N_2 , NH_3 , CO_2 et H_2 ; tous les processus métaboliques se faisaient donc en milieu réducteur.

L'apparition des premiers organismes photosynthétiques s'est traduite par un enrichissement progressif de l'atmosphère en oxygène et les micro-organismes anaérobies qui auparavant occupaient toute la surface de la planète se sont retrouvés confinés dans des niches écologiques où l'absence d'oxygène leur permettait de proliférer. Les bactéries anaérobies ont ainsi survécu et évolué dans des habitats aussi divers que les fonds océaniques, les lacs, l'humus de la terre et le tractus digestif de la totalité des animaux; leur métabolisme complexe leur permettant d'utiliser les substrats les plus divers.

C'est Pasteur qui en 1857 (7,34) mit en évidence pour la première fois l'activité de micro-organismes en absence d'oxygène. Il y décrit notamment la formation d'acide lactique, d'acide butyrique et de butanol par des agents microbiens dans des produits alimentaires comme le beurre, le lait et le vin. Pasteur découvrit également la présence de micro-organismes dans les moûts de fermentation du vin, lors de la transformation du sucre en éthanol et démontra que ce processus était dû à l'existence de levures. Peu de temps après, il fut appelé à Lille par les brasseurs du Nord pour y résoudre les problèmes de contamination rencontrés lors de la fabrication de la bière. C'est à cette époque qu'il mit en évidence qu'il existait de grandes différences métaboliques selon que des organismes aéro-anaérobies comme les levures étaient cultivés en présence ou en absence d'oxygène.

De nos jours, l'étude des bactéries anaérobies est d'un intérêt primordial. D'un point de vue médical tout d'abord; en effet ces bactéries sont responsables d'un grand nombre d'infections et de toxi-infections.

D'un point de vue industriel et biotechnologique ensuite puisque la grande majorité des étapes de fabrication ou d'altérations biologiques des aliments sont le fait d'organismes anaérobies.

2 DONNEES TAXONOMIQUES.

Par définition, d'après la neuvième édition du Bergey's manual, (30) *Bacteroides* appartient à la famille des *Bacteroidaceae*. Les bactéries de cette famille sont anaérobies strictes, à Gram-négatif, ne forment pas de spores, peuvent être mobiles ou non, elles sont toutes chimio-organotrophes. L'énergie nécessaire à l'anabolisme provient de l'oxydation de molécules organiques. Toutes ces bactéries métabolisent les sucres, les peptones. La plupart des espèces produisent des acides organiques de faible poids moléculaire comme l'acétate, le succinate, le lactate, le propionate et le butyrate. La famille des *Bacteroidaceae* est constituée de 13 genres dont les caractéristiques essentielles sont regroupées dans le tableau 1.

Le genre le plus connu et numériquement le plus important de cette famille est *Bacteroides* dont l'espèce type est *B. fragilis*. Les bactéries du genre *Bacteroides* sont des bacilles droits non mobiles; les produits résultant de la fermentation des sucres et des peptones sont le succinate, l'acétate et le propionate.

D'après l'édition de 1984 du Bergey's manual, *Bacteroides* est constitué de 39 espèces; mais celles-ci présentent entre elles de grandes hétérogénéités tant au point de vue de l'habitat, du % GC ou des caractères métaboliques (58) si bien que le genre est en perpétuel remaniement (Tableau 2). Ainsi Jensen et coll. ont défini 2 espèces nouvelles: *B. pectinophilus* et *B. galacturonicus* (36). Ces 2 bactéries pectinolytiques ont été isolées du tractus digestif de l'homme; leur % GC est respectivement de 45 et de 36. De même, de nouvelles espèces comme *B. polypragmatus* (59) *B. heparinolyticus* (54), *B. merdae* et *B. caeccae* ont été caractérisées. Les bactéries asaccharolytiques pigmentées en noir connaissent également de profondes modifications. Ainsi *B. gingivalis* et *B.*

endodontalis ont été nouvellement caractérisées (98, 100).

Mais récemment, les bactéries asaccharolytiques pigmentées en noir: *B. gingivalis*, *B. endodontalis*, *B. asaccharolyticus* ont été reclassées en un nouveau genre: *Porphyromonas*. Ces bactéries possèdent en effet des caractères biochimiques très différents des autres *Bacteroides*. (73)

Le groupe *Bacteroides* est génétiquement très distant des autres bactéries Gram-négatives. L'analyse du rRNA 16S a montré que *Bacteroides* et *Fusobacterium* sont assez étroitement reliés aux Flavobactéries et aux *Cytophagaceae* (58). La divergence du groupe *Flavobacterium-Bacteroides* des autres eubactéries apparaît être un événement relativement ancien, apparu avant la séparation avec les bactéries Gram+, les bactéries pourpres et les Cyanobactéries. (70)

Par hybridation entre DNA chromosomique et rRNA 16S, il est possible de déterminer des pourcentages d'homologie entre deux souches. Paster et coll. (58) ont montré qu'il existait une assez grande hétérogénéité dans le genre *Bacteroides*. Ces bactéries seraient ainsi subdivisées en 3 groupes; le premier, le plus important, étant constitué des *Bacteroides* apparentés à *B. fragilis*: *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis*. Le deuxième groupe serait représenté par *B. ruminicola* et *Fusobacterium*. Enfin, *B. distasonis* constituerait un groupe séparé, phylogénétiquement assez éloigné des 2 précédents (58) (figure 1).

Les autres *Bacteroides* du rumen comme *B. succinogenes* présentent une très faible homologie avec les autres bactéries du même genre. (58) C'est pourquoi ces bactéries font maintenant partie d'un nouveau genre: *Fibrobacter* et sont ainsi dénommées *F. succinogenes* (51). *B. amylophilus*

est apparenté aux bactéries pourpres et a été reclassé en
Ruminobacter amylophilus. (51)

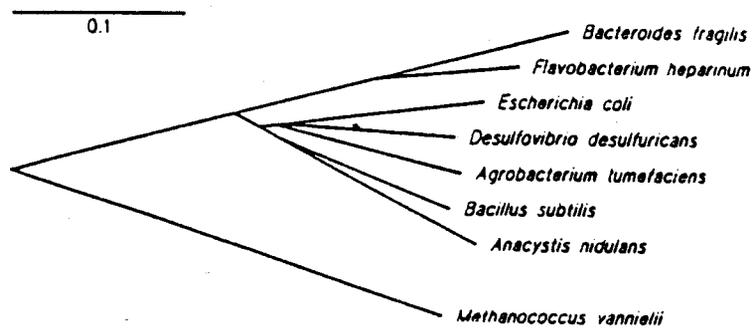
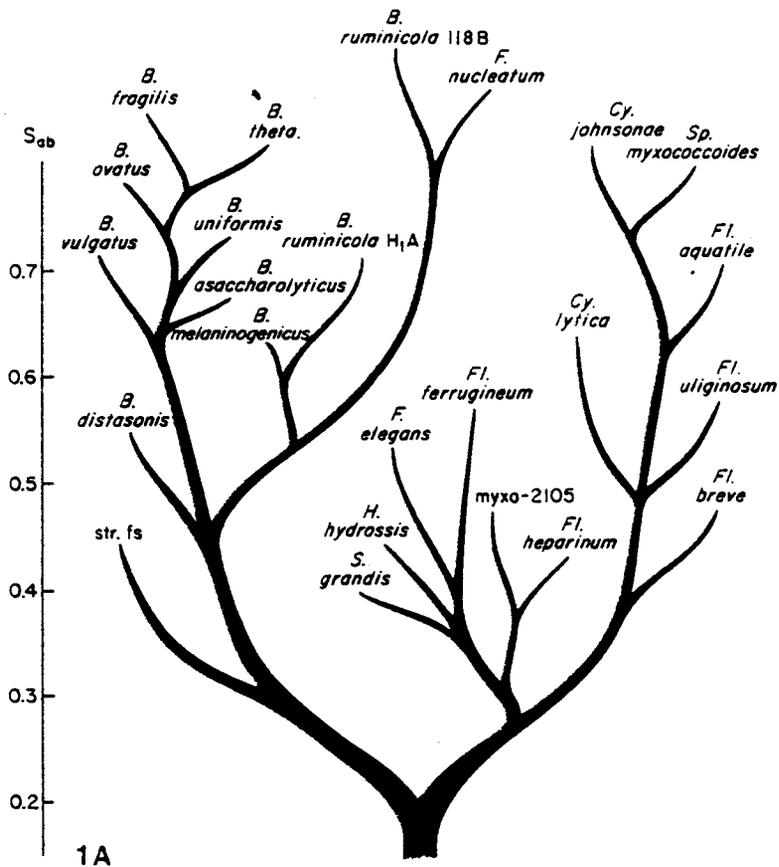


Figure IA: Relations phylogénétiques entre différentes espèces de *Bacteroides* et les espèces apparentées au genre (58).

IB: Relations phylogénétiques entre bactéries du genre *Bacteroides* et les autres genres bactériens (70).

Genre	Mobilité, Ciliature	Métabolites produits
<i>Bacteroides</i>	Non mobile péritriche	Succinate Acétate
<i>Fusobacterium</i>	Non mobile péritriche	Butyrate
<i>Leptotrichia</i>	Non mobile péritriche	Lactate
<i>Butyrivibrio</i>	Mobile monotriche	Butyrate
<i>Succinomonas</i>	Mobile flagellepolaire	Succinate Acétate
<i>Anaerobiospirillum</i>	Mobile bipolaire	Succinate Acétate
<i>Wolinella</i>	Flagelles en touffes Mobile flagelle unique	Formate
<i>Selenomonas</i>	Mobile Flagelles en touffes	Propionate Acétate
<i>Anaerovibrio</i>	Flagelle unique polaire	Propionate Acétate
<i>Pectinatus</i>	Mobile	Propionate Acétate
<i>Acetovibrio</i>	Bacilles courbes mobiles	Acétate, CO ₂ , éthanol
<i>Succinovibrio</i>	Bipolaire flagelles en touffes	Succinate Acétate
<i>Lachnospira</i>	Bacilles courbes flagelles polaires	Formate, Acétate, CO ₂ , Ethanol, H ₂

Tableau 1: Famille des *Bacteroidaceae* (30).

Espèce	% GC	Habitat naturel
<i>fragilis</i>	41 à 44	Côlon
<i>vulgatus</i>	40 à 42	Côlon
<i>distasonis</i>	43 à 45	Côlon
<i>multiacidus</i>	56 à 58	Côlon homme, porc
<i>ovatus</i>	39 à 43	Côlon
<i>thetaiotaomicron</i>	40 à 43	Côlon
<i>uniformis</i>	45 à 48	Côlon homme, porc
<i>eggerthii</i>	44 à 46	Côlon
<i>splanchnicus</i>		Côlon - vagin
<i>zoogloiformans</i>	47	Cavité buccale
<i>oris</i>	42 à 46	Côlon poulet, abcès
<i>buccae</i>	50 à 52	Poches gingivales
<i>loeschii</i>	46	Poches gingivales
<i>oralis</i>	43	Cavité buccale
<i>denticola</i>	49 à 51	Poches gingivales
<i>melaninogenicus</i>	36 à 40	Crevasses gingivales
<i>bivius</i>	40	Flore normale du vagin
<i>disiens</i>	40 à 42	Flore normale du vagin
<i>corporis</i>	43 à 46	
<i>intermedius</i>	41 à 44	Crevasses gingivales
<i>ruminicola</i>		
ss esp <i>ruminicola</i>	49	Réticulo-rumen des
ss esp <i>brevis</i>	50	bovins et des moutons

Tableau 2: Genre *Bacteroides* (30).

Espèce	% GC	Habitat naturel
<i>hypermegas</i>	61	Côlon homme, chien
<i>levii</i>	48	Rumen des bovins
<i>termitidis</i>	34 à 36	Intestin des termites
<i>capillosus</i>	60	Intestin porc
		Cavité buccale homme
<i>amylophilus</i>	40 à 42	Rumen
<i>succinogenes</i>	47 à 49	Rumen
<i>microfusus</i>	60 à 61	Caecum poulets
<i>gracilis</i>	44 à 46	Poches gingivales
<i>nodosus</i>	45	Pied de mouton
<i>pneumosintes</i>		Pharynx
<i>furcosus</i>	34	Tractus digestif
<i>ureolyticus</i>	28 à 30	Tractus digestif, uréogénital
<i>praecutus</i>	28	Tractus digestif
<i>macacae</i>	43 à 44	Cavité buccale des macaques
<i>putredinis</i>		Côlon du mouton
<i>coagulans</i>	37	Tractus digestif, uréogénital
<i>gingivalis</i>	46 à 48	Abcès dentaires
<i>asaccharolyticus</i>	50 à 51	Cavité buccale

Tableau 2 (suite): Genre *Bacteroides*.

3-HABITAT DES BACTERIES DU GENRE BACTEROIDES

I GENERALITES.

Les bactéries anaérobies strictes ne peuvent survivre en présence d'oxygène, elles ne prolifèrent que dans des milieux réducteurs. C'est ainsi qu'elles se développent dans les sédiments aquatiques, dans les sols, dans le tractus digestif des animaux, et dans tous les milieux dépourvus d'oxygène (69).

Le tractus digestif est un habitat parfait pour les bactéries du genre *Bacteroides*. En effet, la température y est constante et relativement élevée (35 à 40°C), l'oxygène y est totalement absent. L'animal apporte un approvisionnement constant en eau et en aliments fermentescibles utilisables par les bactéries. Celles-ci dégradent des molécules non digérées par l'hôte et les transforment en molécules plus simples qui sont absorbées en grande partie par les cellules de la muqueuse intestinale (41, 69). Les bactéries et l'organisme qui les abrite vivent ainsi en étroite relation.

Dans le côlon la quantité de micro-organismes est de l'ordre de 10^{10} par gramme de matière sèche environ.

La grande majorité des bactéries anaérobies du tractus digestif appartient au genre *Bacteroides*.

Bacteroides est une bactérie capable de coloniser le tractus digestif de l'homme, des mammifères, des oiseaux et des insectes. Chez l'homme, *Bacteroides* est un membre prédominant de la flore buccale, du côlon et du tractus vaginal. Ces bactéries sont également présentes dans le rumen et le côlon des mammifères polygastriques comme les bovins et les ovins ainsi que dans le ceacum des rongeurs.

II BACTEROIDES DU TRACTUS DIGESTIF DE L'HOMME.

Les bactéries du genre *Bacteroides* sont présentes dans la quasi-totalité du tractus digestif de l'homme et des mammifères monogastriques. Ainsi *Bacteroides* est présent dans la bouche, au niveau des gencives et de la plaque dentaire, il est présent dans l'intestin grêle et dans le côlon. Par contre, dans l'estomac, le pH et la présence de protéases ne permettent pas la survie des bactéries.

Pourtant, pendant de très nombreuses années, on a négligé l'importance numérique de *Bacteroides* dans le tractus digestif, ces bactéries étant anaérobies donc plus difficiles, à cultiver, à isoler et à dénombrer.

A- *Bacteroides* de la flore buccale.

B. gingivalis, *B. asaccharolyticus* et *B. melaninogenicus* possèdent un métabolisme essentiellement protéolytique. Selon certains auteurs (99, 101, 52, 55, 47), *B. gingivalis* posséderait une forte activité collagénasique et serait responsable d'un grand nombre d'abcès dentaires. Ces bactéries pigmentées en noir s'attachent aux cellules épithéliales de la gencive, elles sont capsulées ce qui leur permet de montrer une certaine résistance à la phagocytose, et sécrètent des substances leucotoxiques qui inhibent les leucocytes polynucléaires. (101)

D'autres bactéries de la flore buccale comme *B. oralis* synthétisent des dextranases. Ces enzymes sont capables d'hydrolyser les dextrans qui sont les principaux polysaccharides de la plaque dentaire et qui sont synthétisés par *Streptococcus mutans* à partir de sucres simples comme le saccharose (91, 92).

B- Bacteroides du côlon.

Dans le côlon on peut dénombrer environ 400 espèces bactériennes différentes. *Bacteroides* qui constitue l'un des 5 genres prédominants représente environ 30% des bactéries de la flore fécale.

Les espèces numériquement les plus importantes sont *B. vulgatus*, *B. distasonis* et *B. thetaiotaomicron* (10^{10} bactéries par gramme de matière sèche). *B. fragilis*, *B. uniformis*, *B. eggerthii* et *B. ovatus* sont présents dans des proportions plus faibles (10^9 bactéries par gramme de matière sèche).

a- Rôle écologique de *Bacteroides*.

Dans le côlon, tous les sucres simples (Glucose, Saccharose, Amidon etc ...) assimilables par la muqueuse de l'intestin grêle sont absents. Par contre, un grand nombre de polysaccharides complexes provenant de la paroi des cellules végétales (Pectines, xylanes, etc ...) ou des sécrétions de la muqueuse intestinale (Chondroïtine sulfate, dérivés d'acides sialiques, etc ...) sont présents et constituent la seule source de carbone utilisable par les bactéries fécales. C'est pourquoi ces micro-organismes ont développé des systèmes enzymatiques variés capables d'hydrolyser un très grand nombre de polysaccharides complexes et capables de s'adapter rapidement aux variations de régime alimentaire de l'hôte. L'hydrolyse de ces molécules s'accompagne de l'excrétion d'acides gras volatils et de vitamines qui sont assimilées par les cellules de la muqueuse intestinale. Les *Bacteroides* du côlon sont donc bénéfiques et indispensables à l'hôte.

b- Pathogénicité.

Malheureusement, lorsque les conditions écologiques deviennent anormales, *Bacteroides* est susceptible de

causer des infections variées: *Bacteroides* est un pathogène opportuniste (41, 69).

B. fragilis et les espèces apparentées comme *B. distasonis*, *B. thetaïotaomicron* et *B. ovatus* peuvent en effet provoquer des septicémies et des oedèmes, aux poumons, à la cavité abdominale et au cerveau.

Le traitement de ces infections est compliqué et rendu difficile par le fait que les *Bacteroides* sont résistants à un très grand nombre d'antibiotiques. (69, 70)

c- Relation entre *Bacteroides* et l'étiologie du cancer du côlon.

Les micro-organismes du tractus digestif peuvent être impliqués dans la synthèse de composés carcinogènes. En effet ces bactéries synthétiseraient des molécules cancérigènes à partir de produits issus de l'alimentation ou à partir de molécules excrétées par l'hôte. Il a été ainsi démontré que des produits cancérigènes sont générés par l'action de certaines bactéries intestinales sur les sels biliaires excrétés dans l'intestin. Il est en effet possible que certains *Bacteroides* déconjuguent les sels biliaires primaires en sels biliaires secondaires cancérigènes.

Certains produits du métabolisme des acides aminés et des protéines sont apparemment impliqués dans la carcinogénèse. Ainsi le métabolisme de la tyrosine entraîne la formation de dérivés phénoliques; plusieurs souches de *B. thetaïotaomicron* sont capables de former à partir du tryptophane des composés cancérigènes possédant un noyau indole. *Bacteroides* pourrait également métaboliser et synthétiser des dérivés polycycliques aromatiques hydrocarbonés (41).

Néanmoins il faut bien reconnaître que le rôle exact des *Bacteroides* du tractus digestif dans l'apparition du cancer du côlon n'est pas connu. Il est pourtant acquis qu'il existe une corrélation directe entre le régime alimentaire et l'apparition de cancer.

III. BACTEROIDES DU TRACTUS DIGESTIF DES RUMINANTS.

Chez les ruminants, l'hydrolyse des polysaccharides de la paroi des cellules végétales a lieu avant le passage dans l'intestin grêle. Cette conversion se produit dans la panse ou rumen et elle est due en totalité à l'action de micro-organismes.

La panse représente 80% du volume total de l'estomac des polygastriques soit environ 250 litres pour une vache.

Dans le rumen, les débris végétaux sont finement broyés et désolidarisés par l'action de la mastication et de la rumination; la température y est constante de 39 à 40°C et le pH est compris entre 6 et 7. Le milieu est totalement anaérobie. L'atmosphère du rumen est constituée de 60 à 70 % de dioxyde de carbone, 25 à 35% de méthane, quelques % d'azote, des traces de sulfure d'hydrogène et d'hydrogène. Les petites quantités d'oxygène qui pénètrent dans la panse par la mastication et la rumination sont rapidement réduites par les micro-organismes anaérobies facultatifs.

La micro-population du rumen est constituée de protozoaires et de bactéries. Il existe entre ces différentes espèces des relations complexes de symbiose et de compétition; chacun des micro-organismes ayant besoin pour son développement de nombreuses substances qui sont synthétisées par les autres espèces.

La microflore du rumen apparaît dès que les jeunes animaux absorbent des aliments végétaux. A l'âge adulte, les protozoaires et les bactéries sont présents à la concentration de 10^6 et 10^{10} cellules par millilitre respectivement. Environ 200 espèces bactériennes se développent et coexistent, mais 30 sont spécifiques du rumen. (34)

Les glucides végétaux assimilables par les micro-organismes peuvent être classés en trois catégories:

1- Des glucides solubles comme le glucose et le saccharose qui sont utilisés immédiatement et en totalité par les bactéries pour leur métabolisme énergétique.

2- Des polysaccharides cytoplasmiques comme l'amidon qui sont dégradés facilement par les espèces amylolytiques comme *Bacteroides amylophilus*.

3- Des polysaccharides pariétaux comme la cellulose, l'hémicellulose, les pectines, les xylanes. Des bactéries comme *B. succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens* fermentent très énergiquement la cellulose et ses produits d'hydrolyse. *B. ruminicola* hydrolyse l'hémicellulose et les pectines. *B. succinogenes* serait l'organisme cellulolytique le plus important (25).

Un grand nombre de ces espèces ont tendance à s'attacher aux fibres qu'elles dégradent; *B. succinogenes*, *R. flavefaciens* adhèrent aux parois des cellules végétales et hydrolysent celles-ci en y creusant des cavités.

La très grande hétérogénéité des polymères pariétaux nécessite une multiplicité d'enzymes pour que la dégradation soit complète. Ces enzymes sont synthétisées par plusieurs espèces bactériennes qui collaborent ainsi ensemble à la digestion totale des parois cellulaires.

Ainsi il n'existe pas une cellulase mais un véritable complexe multi-enzymatique. Chez *B. succinogenes* (24, 71), après purification, Forsberg a ainsi mis en évidence 19 protéines différentes possédant une activité β -endoglucanasique. Ces cellulases formeraient des agrégats ce qui permettrait une meilleure digestibilité des fibres et ce qui expliquerait la multiplicité des fractions purifiées.

Une proportion relativement importante de lignine est présente dans les cellules végétales; cette molécule, non dégradée par les micro-organismes, apparaît être un important facteur limitant la digestion des cellules végétales dans le rumen.

Les caractéristiques de quelques bactéries du rumen sont représentées dans le tableau 3.

Les manipulations génétiques des bactéries du rumen sont d'un intérêt primordial pour les nutritionnistes des ruminants. En effet d'après Forsberg (25), il serait ainsi envisageable:

-de synthétiser dans le rumen des métabolites (vitamines, hormones, etc,...) qui peuvent améliorer la croissance des ruminants.

- de modifier dans le rumen la distribution des produits issus de la fermentation.

-d'introduire de nouvelles voies métaboliques permettant une meilleure dégradation des aliments par la microflore.

Substrat utilisé	Exemple de bactéries utilisatrices
Cellulose	<i>Ruminococcus albus, flavefaciens</i> <i>Bacteroides succinogenes, Butyrivibrio fibrosolvans</i> et quelques protozoaires
Amidon	<i>Bacteroides amylophilus, Succinomonas amylolytica, Streptococcus bovis</i>
Pectine, Saccharose	<i>Bacteroides ruminicola, Lachnospira multiparus</i>
Hémicellulose	<i>B. ruminicola</i>
Acide succinique	<i>Selenomonas ruminantium</i>
Lipides	<i>Anaerovibrio lipolytica</i>
CO ₂	Tous les <i>Bacteroides, Methanobacterium</i> spp
Acide lactique	<i>Selenomonas ruminantium, Veillonella</i> spp

Tableau 3: Substrats utilisés par les bactéries du rumen (34).

4- BESOINS NUTRITIONNELS ET METABOLISME ENERGETIQUE.

I Besoins nutritionnels.

Le CO₂ est nécessaire à la croissance; il est utilisé par beaucoup d'espèces saccharoclastiques pour former des acides gras volatils.

Les bactéries se développent facilement à des températures comprises entre 25 et 45°C. Bien qu'elles soient anaérobies strictes, elles peuvent néanmoins survivre à l'air, pendant des expositions de 6 à 8 heures. Les bactéries les plus sensibles à l'oxygène seraient dépourvues de superoxyde-dismutase. Un grand nombre d'espèces de *Bacteroides* ne possèdent pas de catalase. Les *Bacteroides* de la flore buccale comme *B. gingivalis* et *B. oralis* sont les plus aérotoles (55, 98).

Les espèces vivant dans le côlon sont peu exigeantes et sont faciles à cultiver; leur temps de génération sur milieu riche glucosé complété en hémine et en vitamine B12 est de 1 heure à 37°C (12).

Les espèces vivant dans le rumen sont beaucoup plus exigeantes; leur culture nécessite l'adjonction d'un grand nombre de facteurs de croissance qui ne peuvent être fournis que par l'apport de jus de rumen dans le milieu de culture.

En absence d'hémine, le métabolisme anaérobie libère de l'acide fumarique et de l'acide lactique.

En présence d'hémine, les produits majeurs issus de la fermentation sont l'acide succinique et l'acide acétique. L'hémine est en effet indispensable à la formation de cytochrome b et de la NADH-fumarate-oxydo-réductase qui catalyse la synthèse d'acide succinique à partir d'acide fumarique. L'acide succinique formé est ensuite excrété dans le milieu extracellulaire (41).

Le métabolisme fermentatif libère beaucoup d'acides gras à faible nombre de carbones (97) si bien que pendant la croissance on observe un abaissement notable du pH qui passe de 7,2 à 5,0 si la souche est cultivée en milieu non tamponné.

2 Métabolisme énergétique.

Bacteroides dégrade des polysaccharides complexes, les enzymes impliquées dans leur hydrolyse sont très souvent extracellulaires comme par exemple les dextranases des *Bacteroides* de la cavité buccale (91,92), ou intracellulaires comme les polygalacturonate-hydrolases de *Bacteroides thetaïotaomicron* (48)

A- Dégradation des hexoses en pyruvate.

La dégradation de sucres complexes aboutit à la formation de monosaccharides à 5 ou 6 carbones. Le mécanisme de passage de ces sucres à travers la membrane cytoplasmique a été très peu étudié. A l'intérieur de la cellule, le catabolisme des monosaccharides est réalisé par la voie d'Embden-Meyerhof. Ainsi une fructose 1-6 diphosphate-aldolase qui est spécifique de la glycolyse a été détectée chez *B. eggerthii*, *fragilis*, *thetaïotaomicron*, *ruminicola*, *amylophilus* et *succinogenes*.

B- Intervention du CO₂ dans le catabolisme du phospho-énolpyruvate, dans la formation de l'acide oxaloacétique.

Chez *Bacteroides fragilis* et *B. ruminicola*, la formation d'acide oxaloacétique (AOA) à partir du phosphoénolpyruvate (PEP) est catalysée par une PEP carboxykinase ADP-dépendante; cette réaction s'accompagne de la formation d'ATP. Une malate-déshydrogénase à NAD réduit ensuite l'AOA en malate. Le fumarate formé à partir du malate est alors réduit en succinate par la NADH-

fumarate-oxydoréductase. Cette réaction engendre la formation d'ATP via un système primitif transporteur d'électrons.

Le succinate est le produit majeur de la fermentation des sucres (68).

Plusieurs espèces produisent du propionate à partir du succinate; celui-ci est tout d'abord transformé en succinyl-CoA puis en méthyl-malonyl-CoA par transfert d'un groupement méthyl par la méthyl-malonyl-CoA-mutase. Cette enzyme exige de la vitamine B12 pour être active.

C- Formation d'autres produits de fermentation.

- Le lactate est vraisemblablement formé par réduction du pyruvate par une lactate-déshydrogénase à NAD.

- Pour former l'acétate, l'acétyl-CoA est tout d'abord synthétisé par décarboxylation oxydative du pyruvate. La flavine réduite par cette réaction étant vraisemblablement utilisée pour réduire le fumarate en succinate.

D- Réactions de phosphorylation oxydative.

L'énergie nécessaire à l'anabolisme peut être générée par des réactions de phosphorylation de substrat par le catabolisme. Mais elle peut également être produite par des réactions de phosphorylation oxydative, par un système primitif transporteur d'électrons mettant en oeuvre NADH, des cytochromes et des quinones.

Jusqu'à présent, seules des preuves indirectes existent pour démontrer que la réduction du fumarate est couplée à des réactions de phosphorylation oxydative (figure 2). Ainsi l'addition d'hémine dans un milieu minimum glucosé augmente la biomasse de *B. fragilis* qui passe de 18 à 47 g par mole de glucose utilisé.

B. ruminicola et *B. fragilis* synthétisent un cytochrome de type b qui possède un noyau porphyrinique contenant un atome de fer. La synthèse de ce groupement

prosthétique nécessiterait l'apport d'hémine dans les milieux de culture.

Le fumarate est réduit par la NADH-fumarate-oxydoréductase en succinate. Le cytochrome b est impliqué dans la formation du succinate. En effet, chez *Bacteroides*, l'acide fumarique est l'accepteur final des électrons provenant du catabolisme. L'enzyme catalysant la réduction forme un complexe au niveau de la membrane cytoplasmique auquel sont associés le cytochrome b et la ménaquinone.

Le donneur d'électrons le plus commun est NADH+H⁺. Chez *B. fragilis* le lactate est également un donneur d'électrons. L'utilisation d'hydrogène moléculaire a été mise en évidence chez *B. ruminicola*. En effet l'incubation de ces bactéries sous une atmosphère de H₂/CO₂ augmente la synthèse du propionate donc l'utilisation du fumarate. Le NAD⁺ peut être réduit par une déshydrogénase seulement si le potentiel redox intracellulaire est bas.

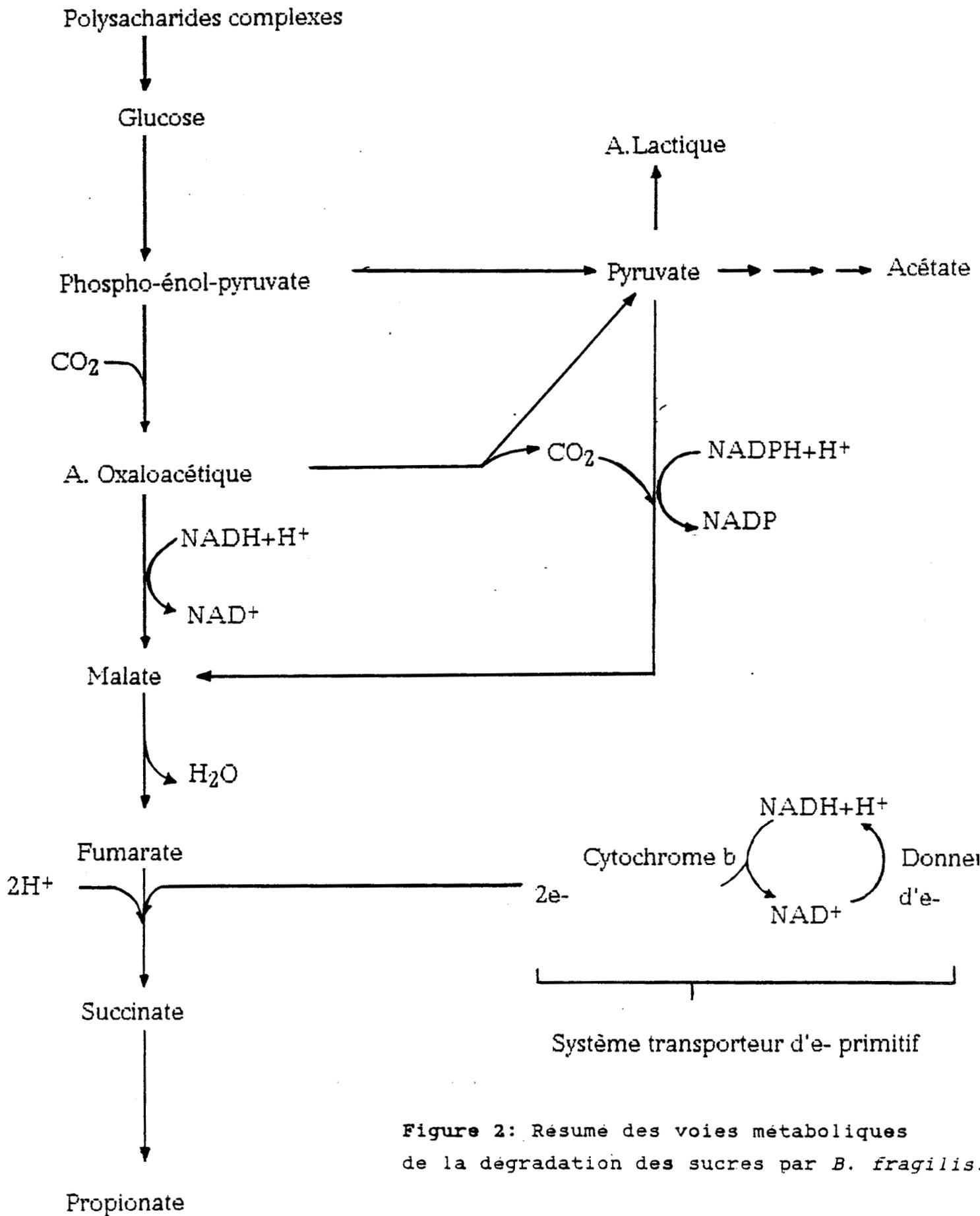


Figure 2: Résumé des voies métaboliques de la dégradation des sucres par *B. fragilis*.

5 RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.

Il est assez difficile d'estimer l'efficacité réelle d'un antibiotique. Ainsi il existe une assez grande différence entre la sensibilité mesurée *in vitro* et celle existant réellement *in vivo*. Pour les bactéries anaérobies la seule méthode de mesure reconnue est basée sur l'étude de la culture de la souche testée sur des dilutions d'antibiotiques en milieux gélosés (1,2).

D'une manière générale, les *Bacteroides* sont résistants à une très grande variété d'antibiotiques, ce qui pose des problèmes dans le traitement des infections dans lesquelles ces bactéries sont impliquées.(33)

Résistance aux aminoglycosides.

Les *Bacteroides* du côlon et de la cavité buccale sont tous naturellement résistants aux aminoglycosides comme la kanamycine, et à l'acide nalidixique. Cette insensibilité à ces antibiotiques est due au fait que la membrane bactérienne est imperméable à ces molécules.

Résistance au chloramphénicol.

La quasi-totalité des souches est sensible au chloramphénicol et au métronidazole (41,9,72); cependant une activité chloramphénicol-acétyl-transférase (CAT) a été mise en évidence dans une souche de *B. uniformis*.(44)

Résistance à la tétracycline.

Jusqu'à 15% des souches sont résistantes à la tétracycline, cette insensibilité est due à l'acquisition d'une imperméabilité vis-à-vis de cet antibiotique. *Bacteroides* est capable de transférer cette résistance de nature chromosomique par conjugaison.(70)

Résistance aux β -lactames.

D'une manière générale, les β -lactamases des bactéries Gram-négatives sont localisées dans l'espace périplasmique et constituent ainsi une barrière à l'entrée de l'antibiotique. La résistance aux β -lactames est le résultat d'une compétition entre le passage de la molécule

d'antibiotique à travers la paroi bactérienne et le taux de synthèse en enzyme permettant de la détruire.(10)

La plupart des *Bacteroides* synthétisent des β -lactamases qui s'avèrent plus actives sur les céphalosporines (41, 69) mais il existe aussi des pénicillinases plus efficaces vis-à-vis de la pénicilline et de ses dérivés. Certaines espèces de *Bacteroides* comme *B. distasonis* synthétisent pas ou peu de β -lactamases; elles présentent néanmoins une résistance assez forte, l'antibiotique ne pouvant pénétrer dans la bactérie (43). Les β -lactamases de *Bacteroides* isolées jusqu'ici ont un poids moléculaire compris entre 28000 et 43000(41), ces enzymes sont localisées dans l'espace périplasmique sous une forme soluble (72).

Environ 8% des *Bacteroides* montrent une résistance plus marquée vis-à-vis de la carbénicilline; il existerait ainsi des carbénicillinases spécifiques moins actives sur les autres β -lactames (9).

Mary et coll. (45) ont montré qu'il semblait exister une étroite relation entre la résistance à la carbénicilline et l'existence de plasmides de petite taille chez *Bacteroides*. Néanmoins, aucun gène porteur de la résistance à cet antibiotique n'a été localisé sur ces plasmides.

De nombreux travaux ont mis en évidence le transfert de la résistance aux β -lactames. Ainsi Cuchural et coll. (14) ont observé qu'une souche de *B. fragilis* TAL4170 pouvait transférer la résistance à la céfoxitine par conjugaison vers d'autres *Bacteroides* à une fréquence de 10^{-6} à 10^{-7} sans qu'aucun plasmide ne semble associé à ce transfert.

Résistance à la clindamycine.

Une grande majorité des *Bacteroides* est sensible à la clindamycine qui est l'antibiotique de choix dans le traitement des infections à *Bacteroides*. Néanmoins, 8% des souches sont résistantes à cet antibiotique, ce nombre apparaît en augmentation (69) et des modes de transfert

conjugatifs, permettant la propagation de ces gènes de résistance qui sont souvent de nature plasmidique, existent.

Chez *Bacteroides*, la résistance à la clindamycine et aux autres macrolides et lincosamides est constitutive, elle serait due à une mono ou une di-méthylation des résidus adénine du rRNA des sous-unités 50S (40).

Résistances des *Bacteroides* du rumen.

Les profils de résistance des *Bacteroides* du rumen présentent de grandes similitudes avec les autres *Bacteroides*. Tous sont résistants à la kanamycine et à l'acide nalidixique, la très grande majorité est sensible à la clindamycine, la tétracycline et l'ampicilline. (21) Néanmoins, Flint et coll. (21) ont mis en évidence une souche de *B. ruminicola* possédant une résistance très forte à la tétracycline et un peu moins marquée vis-à-vis du chloramphénicol. La résistance à la tétracycline est inductible et sa propagation vers d'autres bactéries est possible grâce à l'existence d'un plasmide conjugatif possédé par la souche (22).

6 PLASMIDES CRYPTIQUES.

Un grand nombre de souches de *Bacteroides* possèdent des plasmides. Mais à part quelques rares exceptions tous ces plasmides sont cryptiques, aucun caractère phénotypique n'étant connu.

Environ 35 à 40% des souches de *Bacteroides* contiennent 1 ou plusieurs plasmides dont les tailles sont comprises entre 1,8 et 40 Mégadaltons soit 2,7 à 60 kilopaires de bases.

Il existe des classes d'homologie entre des plasmides contenus par des espèces de *Bacteroides* différentes. Certains plasmides de taille identique, de profils de restriction semblables sont possédés par un grand nombre de *Bacteroides* différents.

En utilisant des méthodes d'hybridation croisées Callihan et coll. ont isolé et identifié 3 classes de petits plasmides d'une taille inférieure à 8 kb (11). la classe I est ainsi constituée de plasmides de 2,7 kb; la classe II contient des plasmides de 4 à 6 kb et enfin la dernière classe d'homologie est constituée de plasmides de 5,6 kb.

Plus récemment Beul et coll. (6) ont analysé 24 souches de *B. fragilis* provenant d'isolats cliniques; onze d'entre elles soit 43 % possèdent un ou plusieurs plasmides. Il a ainsi été possible de définir 6 classes d'homologie correspondant à des molécules de 4,2; 5,25; 5,4; 6,3 et 28,5 kb. Le contenu plasmidique de ces souches semble remarquablement stable. Les plasmides se maintiennent sans aucune pression de sélection et les tentatives de curage se sont toutes soldées par des échecs.

Mary et coll. (45) ont analysé 85 souches de *Bacteroides* provenant d'isolats cliniques; 35% d'entre elles possèdent des plasmides dont les tailles sont comprises entre 2,7 et 46 kb. Des petits plasmides de même taille et présentant le même profil de restriction

existent dans des espèces très différentes. Les résultats sont reportés dans le tableau 4.

SOUCHES	Nbre plasmides	TAILLES kb.
<i>Bacteroides fragilis</i>		
106	3	3.8; 4.8; 7.6
217	1	3.3
344	1	13.5
356	1	6.0
367	1	4.4
373	2	2.8; 4.5
385	2	6.3; 7.8
448	5	2.7; 3.7; 4.5; 9.9 45.7
462	1	3.7
470	2	3.7; 6.0
484	2	3.6; 4.2
517	1	5.8
560	1	5.8
563	1	10.3
565	3	3.7; 6.1; 7.2
648	1	6.0
<i>B. thetaïotaomicron</i>		
102	3	2.7; 3.9; 7.5
107	2	3.8; 7.5
184	2	2.7; 3.7
489	2	3.8; 6.7
643	1	6.7
<i>Bacteroides vulgatus</i>		
154	2	2.7; 46.1
<i>B. distasonis</i>		
419	3	3.9; 9.8; 48.5
<i>B. oralis</i>		
420	2	3.9; 46.0

Tableau 4: Contenu plasmidique de souches de *Bacteroides* (45).

7 Plasmides naturels dont le phénotype est connu.

A cette date, seulement 5 plasmides portent des gènes dont le phénotype est connu. Tous confèrent la résistance aux antibiotiques. Trois plasmides codent pour la résistance à la clindamycine/érythromycine: pBF4, pBFTM10, pBI136. Un pour la résistance au chloramphénicol: pRYC3373 et enfin un plasmide de *B. ruminicola* confère la résistance à la tétracycline: pRRI4.

Seuls les plasmides codant pour la résistance aux lincosamides et macrolides ont été étudiés et sont connus avec précision.

A- pBF4.

C'est en 1979 que Privitera et coll. (42) en France ainsi que Tally et coll. aux Etats-Unis (93) ont mis en évidence qu'une souche de *B. fragilis* pouvait transférer en bloc la résistance à la clindamycine et à l'érythromycine vers un autre *Bacteroides* à la fréquence de 10^{-3} à 10^{-6} .

Cette découverte était d'autant plus importante que les lincosamides comme la clindamycine sont les antibiotiques utilisés contre les infections à *Bacteroides*.

Un peu plus tard , Welch et coll. (103) ont montré que le transfert de cette résistance se faisait par conjugaison, processus auquel était toujours associé un plasmide de 41 kb appelé pIP410 par Privitera et pBF4 par Welch. La taille de la molécule a été déterminée par mesure de la longueur des formes circulaires ouvertes en microscopie électronique ainsi que par électrophorèse en gel d'agarose. Le nombre de copies par molécule de DNA chromosomique est faible puisqu'il est seulement de 1 ou 2 par bactérie.

La figure 3 montre la carte de restriction partielle de pBF4; *EcoRI* coupe le plasmide en 6 fragments A, B, C, D, E, F.

Spontanément, des clones de V479-1(pBF4) sensibles aux macrolides et aux lincosamides apparaissent à la fréquence de 1 à 2% . L'analyse de leur contenu plasmidique a permis de mettre en évidence deux types de dérivés spontanés de délétion notés pBF4 Δ 1 et pBF4 Δ 2 de 32.5 et 38.2kb. Il a ainsi été possible de localiser la région de pBF4 codant pour la résistance à la clindamycine sur le fragment *EcoRI* D de 3.8 kb.

Welch et coll. (103) ont également détecté deux types de séquences inversées répétées sur pBF4 notées IR1 et IR2 de 400 et 75 paires de bases.

De même Magot et coll. (42) ont obtenu un dérivé de délétion de pIP410 ne conférant plus la résistance à la clindamycine et à l'érythromycine. Ce plasmide nommé pIP411, d'environ 22kb, analysé en microscopie électronique, a montré qu'il correspondait à pIP410 ayant subi une délétion au niveau des séquences inversées répétées IR1.

Tous ces résultats semblaient donc indiquer qu'il devait exister une structure de type transposon au niveau de la région codant pour la résistance aux lincosamides et macrolides.

B- pBFTM10.

C'est en 1982 que Tally et coll. ont mis en évidence que *B. fragilis* TMP10, une souche résistante à la tétracycline, l'érythromycine et la clindamycine, possède la propriété de transférer la résistance à ces antibiotiques par conjugaison (93).

Tous les transconjugants clindamycine/érythromycine résistants acquièrent un plasmide de 14.6 kb identique à celui de la souche donatrice appelé pBFTM10.

Ce plasmide est capable de mobiliser de petits plasmides cryptiques de 2,7 kb originaires de la souche donatrice (68, 93). Si les transconjugants sont cultivés en absence de clindamycine et d'érythromycine des mutants de délétion, sensibles à ces antibiotiques, dépourvus du

fragment *EcoRI*-B de 4,2 kb apparaissent à une fréquence de 0,5%. La carte de restriction de ce plasmide est représentée sur la figure 3.

C- pBI136.

pBI136 est le dernier plasmide porteur de la résistance à la clindamycine découvert jusqu'ici. C'est un plasmide conjugatif de 80.6 kb originaire de *Bacteroides ovatus* (82). La carte de restriction est représentée en figure 3. Des variants sensibles à la clindamycine apparaissent spontanément à la fréquence de 0.2% sans que la présence d'agents de curage comme le bromure d'éthidium n'augmente cette fréquence. Tous ces mutants de délétion sont dépourvus du fragment *EcoRI*-C, ce qui permet de localiser la région responsable de la résistance aux antibiotiques (83).

Comme dans le cas de pBF4 et pBFTM10, les gènes conférant la résistance à la clindamycine et à l'érythromycine sont bordés par des séquences inversées répétées de 1.2 kb. De plus, la région du fragment *EcoRI*-C codant pour la résistance aux macrolides et lincosamides présente de grandes homologues de structure avec les régions correspondantes de pBF4 et pBFTM10.

D- pRYC3373.

Martinez-Suarez et coll. (44) ont isolé à partir d'un abcès du péritoine d'une femme non traitée au chloramphénicol une souche de *Bacteroides uniformis* RYC3373 résistante à cet antibiotique.

Cette bactérie est capable de transférer la résistance à l'ampicilline, la clindamycine, la tétracycline et au chloramphénicol à d'autres souches de *Bacteroides*.

Un plasmide conjugatif de 39.5 kb, pRYC3373, est associé au transfert de la résistance au chloramphénicol; la fréquence de conjugaison est de 10^{-6} à 10^{-7} .

La chloramphénicol-acétyl-transférase est du même type et possède les mêmes propriétés que les CAT du groupe II d'*E.*

coli. L'enzyme s'exprime d'une façon constitutive; au cours de la croissance bactérienne, des concentrations sous-inhibitrices en chloramphénicol n'augmentent pas l'activité de l'enzyme.

Ce plasmide a été mis en évidence en 1985 et aucun résultat n'est venu confirmer ou infirmer son existence.

E- pRRI4.

B. ruminicola 223/M2/7 isolé à partir du rumen d'un mouton est fortement résistant à la tétracycline. Cette souche possède plusieurs plasmides de 3.0, 7.0 et 19.5 kb (21). Flint et coll. ont montré que la résistance à la tétracycline peut être transférée par conjugaison vers un mutant rifampicine-résistant de *B. ruminicola* sous-espèce *brevis* B1-4 à la fréquence de 10^{-6} environ. L'acquisition de cette résistance semble être de nature plasmidique puisque tous les transconjugants possèdent un plasmide de 19.5kb, pRRI4, originaire de la souche donatrice (23).

La figure 4 montre la carte de restriction de pRRI4.

Le transfert de la résistance à la tétracycline semble assez spécifique; ainsi aucun transconjugant n'est obtenu lorsque *B. ruminicola* sous-espèce *ruminicola* est utilisé comme souche réceptrice.

De nombreuses souches de *Bacteroides* originaires du côlon sont capables de transférer la résistance à la tétracycline grâce à un déterminant de nature chromosomique (70) mais pRRI4 est le premier plasmide décrit susceptible de conférer cette résistance à d'autres *Bacteroides*. Un tel plasmide pourrait être utilisé pour réaliser un vecteur de clonage permettant d'étudier la génétique des bactéries du rumen.

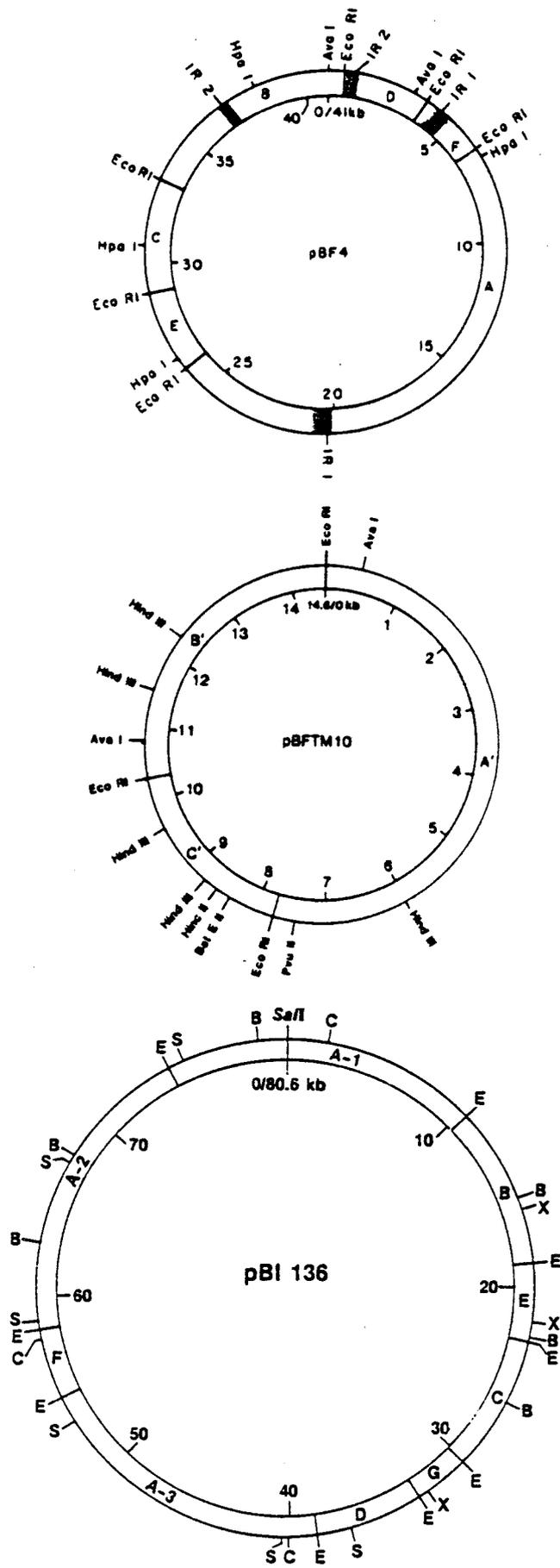


Figure 3: Cartes de restriction de pBFTM10, pBF4, pBI136.

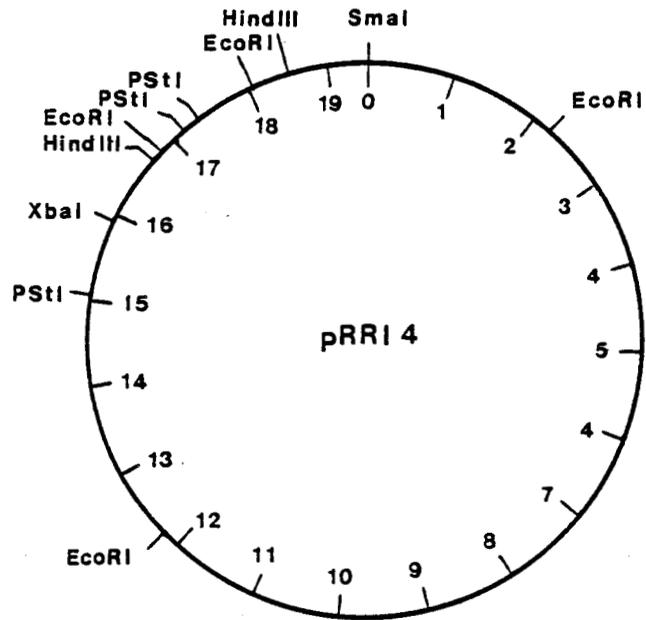


Figure 4: Carte de restriction de pRRI4.

8 Description des gènes responsables de la résistance à la clindamycine.

Une analyse détaillée des plasmides conférant la résistance aux lincosamides et macrolides montre qu'ils présentent de fortes homologues au niveau des séquences directement répétées ainsi qu'au niveau d'une séquence de 0,8 kb.

Cette séquence est située à l'intérieur du gène de résistance à la clindamycine-érythromycine (gènes *ermF*) et possède les sites de reconnaissance pour les enzymes *HindIII*, *AvaI*, et *DdeI*. (voir Figure 5)

La séquence nucléotidique complète du gène *ermF* a été déterminée récemment (40, 65, 66). La protéine codée par ce gène présente une homologie assez forte avec celles transcrites à partir de plasmides ou de transposons originaires de Staphylocoques, Streptocoques ou de bactéries filamenteuses comme *Streptomyces* et *Arthrobacter* (40).

La figure 6 représente le séquençage du déterminant *ermF* et indique les similitudes qui existent avec d'autres genres bactériens. Ces résultats confirmeraient l'hypothèse selon laquelle les gènes conférant la résistance aux antibiotiques auraient une origine commune. Ils proviendraient de la dissémination de gènes ancestraux, véhiculés par divers procaryotes et ayant pour origine des micro-organismes produisant des antibiotiques; ces micro-organismes possédant les gènes de résistance vis-à-vis des antibiotiques qu'ils synthétisent. (40)

Macrina et coll. ont séquencé une grande partie du fragment *EcoRI*-D de pBF4 (65, 66). Il a ainsi été montré que le gène *ermF* est transcrit à partir d'un promoteur présent à l'intérieur de la séquence inversée répétée située en amont du gène. (40, 66)

De plus, il existe une séquence de 6 paires de bases (séquence de Shine-Dalgarno) 5'AAGAAG3' située 5 nucléotides avant le codon de départ du gène *ermF* qui

correspondrait au site de fixation du ribosome sur le RNA messager (figure 7).

La protéine synthétisée à partir du gène *ermF* est un polypeptide de 266 acides aminés; son poids moléculaire est de 30360 Daltons (40). La séquence en amino-acides montre que cette molécule est assez peu différente des autres méthylases bactériennes du rRNA.

La résistance à la clindamycine est constitutive alors que dans les autres genres bactériens elle est inductible. Le % GC du gène codant pour la résistance aux lincosamides et macrolides est très différent de celui du DNA chromosomique de *B. fragilis* (34 contre 46)(53). Par contre, les séquences directement répétées, contenant le promoteur, sont originaires de *B. fragilis*; leur % GC est comparable à celui du DNA chromosomique.

Ces résultats semblent indiquer qu'il était nécessaire que le gène *ermF* s'insère juste après un promoteur de *Bacteroides* pour qu'il soit transcrit dans de bonnes conditions.

Des études de Smith ont également montré que pour pBI136 l'expression de la résistance aux lincosamides et macrolides était dépendante de l'existence des séquences directement répétées situées à proximité du gène.(87)

Le fragment *EcoRI*-B de pBFTM10 est très semblable à celui de pBF4; sa taille est de 4.2 kb contre 3.8 kb. Ce fragment possède une portion de DNA supplémentaire de 200 paires de bases entraînant ainsi l'apparition d'un deuxième site *HindIII*. (voir figure 5)

La présence de séquences directement répétées de part et d'autre des gènes codant pour la résistance à la clindamycine suggère l'existence d'éléments transposables.

Récemment, 3 transposons différents ont été identifiés. Shoemaker et coll. (75, 76) ont montré, qu'un fragment de 5.5 kb contenant le gène *ermF* et les deux séquences directement répétées de pBF4 inséré dans le vecteur navette *E. coli/Bacteroides* pE5-2, pouvait

s'insérer dans le chromosome d'*E. coli* ainsi que dans le plasmide mobilisateur R751 qui avait servi à son transfert. Ce transposon a été nommé Tn4351 et la séquence d'insertion correspondante: IS4351. Lorsqu'il est introduit chez *E. coli* ce transposon exprime en aérobiose la résistance à la tétracycline qui chez *Bacteroides* est cryptique.

De même, les gènes de pBFTM10 codant pour la résistance à la clindamycine et la tétracycline sont situés sur un transposon nommé Tn4400 qui présente 90% d'homologie avec Tn4351.(67)

Smith et coll. (86, 87) ont mis en évidence un troisième transposon: Tn4551 présent dans pBI136; cet élément génétique, plus grand de 3 kb que les 2 précédents, s'insère dans le chromosome de *Bacteroides* à la fréquence de 10^{-4} . Tn4551 ne porte pas de gènes de résistance cryptique à la tétracycline; néanmoins, en y introduisant un déterminant de résistance à la kanamycine, Smith et coll. ont mis en évidence qu'il pouvait également s'insérer dans le chromosome d'*E. coli*.

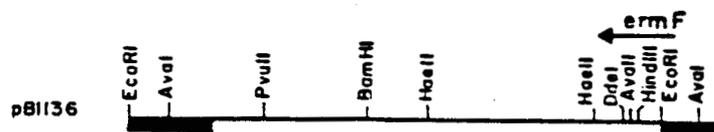
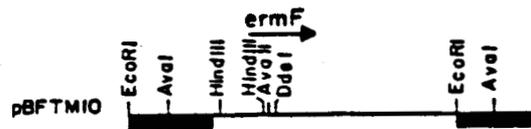
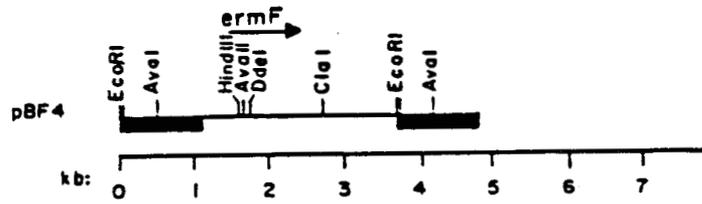


Figure 5: Carte de restriction des fragments *EcoRI* de pBFTM10, pBF4, pBI136.

Les flèches indiquent le sens de transcription des gènes *ermF*. On remarque que le fragment *EcoRI*-B de pBFTM10 possède un site *HindIII* supplémentaire entre le gène *ermF* et la séquence d'insertion située en amont.

80

ATCATAGAAATTCATACCTTTGTTCTCGGTTATATGTTGCTCATCTGCAACTTTTTTTCTTTGGACGGACAATTAA

TthIII 160

AGCAAAGATAGCAAACCTTTATCCATTACAGAGTGAGAGAAAAGGGGACATTGCTCTCTTTCTCTGAAAAATAAATGT

S-D 240

TTTTATTGCTTATTATCCGCACCCAAAAAGTTGCATTTATAAGTTGAAGTCAAGAAGTATTCACCTGTAAAGAAGTTACTA

270 300

ATG ACA AAA AAG AAA TTG CCC GTT CGT TTT ACG GGT CAG CAC TTT ACT ATT GAT AAA GTG
Met Thr Lys Lys Lys Leu Pro Val Arg Phe Thr Gly Gln His Phe Thr Ile Asp Lys Val

SfaNI 330 360

CTA ATA AAA GAT GCA ATA AGA CAA GCA AAT ATA AGT AAT CAG GAT ACG GTT TTA GAT ATT
Leu Ile Lys Asp Ala Ile Arg Gln Ala Asn Ile Ser Asn Gln Asp Thr Val Leu Asp Ile

390 420

GGG GCA GGC AAG GGG TTT CTT ACT GTT CAT TTA TTA AAA ATC GCC AAC AAT GTT GTT GCT
Gly Ala Gly Lys Gly Phe Leu Thr Val His Leu Leu Lys Ile Ala Asn Asn Val Val Ala

450 SfaNI 480

ATT GAA AAC GAC ACA GCT TTG GTT GAA CAT TTA CGA AAA TTA TTT TCT GAT GCC CGA AAT
Ile Glu Asn Asp Thr Ala Leu Val Glu His Leu Arg Lys Leu Phe Ser Asp Ala Arg Asn

510 540

GTT CAA GTT GTC GGT TGT GAT TTT AGG AAT TTT GCA GTT CCG AAA TTT CCT TTC AAA GTG
Val Gln Val Val Gly Cys Asp Phe Arg Asn Phe Ala Val Pro Lys Phe Pro Phe Lys Val

570 600

GTG TCA AAT ATT CCT TAT GGC ATT ACT TCC GAT ATT TTC AAA ATC CTG ATG TTT GAG AGT
Val Ser Asn Ile Pro Tyr Gly Ile Thr Ser Asp Ile Phe Lys Ile Leu Met Phe Glu Ser

630 660

CIT GGA AAT TTT CTG GGA GGT TCC ATT GTC CTT CAA TTA GAA CCT ACA CAA AAG TTA TTT
Leu Gly Asn Phe Leu Gly Gly Ser Ile Val Leu Gln Leu Glu Pro Thr Gln Lys Leu Phe

HindIII 690 720

TCG AGG AAG CTT TAC AAT CCA TAT ACC GTT TTC TAT CAT ACT TTT TTT GAT TTG AAA CTT
Ser Arg Lys Leu Tyr Asn Pro Tyr Thr Val Phe Tyr His Thr Phe Phe Asp Leu Lys Leu

Avall 750 780

GTC TAT GAG GTA GGT CCT GAA AGT TTC TTG CCA CCG CCA ACT GTC AAA TCA GCC CTG TTA
Val Tyr Glu Val Gly Pro Glu Ser Phe Leu Pro Pro Pro Thr Val Lys Ser Ala Leu Leu

810 DdeI 840

AAC ATT AAA AGA AAA CAC TTA TTT TTT GAT TTT AAG TTT AAA GCC AAA TAG TTA GCA TTT
Asn Ile Lys Arg Lys His Leu Phe Phe Asp Phe Lys Phe Lys Ala Lys Tyr Leu Ala Phe

870 900

ATT TCC TAT CTG TTA GAG AAA CCT GAT TTA TCT GTA AAA ACA GCT TTA AAG TCG ATT TTC
Ile Ser Tyr Leu Leu Glu Lys Pro Asp Leu Ser Val Lys Thr Ala Leu Lys Ser Ile Phe

930 960

AGG AAA AGT CAG GTC AGG TCA ATT TCG GAA AAA TTC GGT TTA AAC CTT AAT GCT CAA ATT
Arg Lys Ser Gln Val Arg Ser Ile Ser Glu Lys Phe Gly Leu Asn Leu Asn Ala Gln Ile

BstXI 990 1020

GTT TGT TTG TCT CCA AGT CAA TCG TTA AAC TGT TTT TTG GAA ATG CTG GAA GTT GTC CCT
Val Cys Leu Ser Pro Ser Gln Trp Leu Asn Cys Phe Leu Glu Met Leu Glu Val Val Pro

XmnI FokI

GAA AAA TTT CAT CCT TCG TAG
Glu Lys Phe His Pro Ser End

Figure 7: Séquence nucléotidique complète du gène *ermF* et d'une partie de la séquence d'insertion de *B. fragilis*. La séquence est indiquée dans le sens 5'→3'. La structure primaire de la protéine est indiquée. Le site de Shine-Dalgarno est représenté par les lettres S-D. Les sites de restriction sont indiqués avec les initiales correspondant aux différentes enzymes.

9 Description des gènes responsables de la résistance à la tétracycline.

I Résistance associée au gène *ermF*.

Au cours de l'étude du fragment *EcoRI*-D de 3.8 kb de pBF4, Guiney et coll. (28) ont constaté que celui-ci était également responsable de l'expression d'une résistance non inductible à la tétracycline. Ce déterminant est inactif chez *Bacteroides*; par contre, lorsqu'il est transféré chez *E. coli*, cette résistance s'exprime mais seulement si la souche est cultivée en aérobiose.

Cette résistance, (notée Tc^r) cryptique chez *Bacteroides* ne s'exprime que lorsque qu'*E. coli* est cultivé avec une très forte aération. Les gènes impliqués sont situés sur les fragments *EcoRI*-D de pBF4 et B de pBFTM10; ils sont physiquement associés au gène *ermF*. Bien que ces fragments présentent entre eux près de 90% d'homologie, le gène originaire de pBF4 confère une résistance 10 fois supérieure à celui provenant de pBFTM10 (57). Le mécanisme de la résistance à la tétracycline est double, il met en jeu d'une part des processus de dégradation de la molécule d'antibiotique et d'autre part des processus d'élimination et d'évacuation de la tétracycline en dehors du cytoplasme bactérien. (56, 57, 89, 90).

Ce gène, situé sur les fragments *EcoRI*-B et D de pBFTM10 et pBF4 respectivement, ne présente aucune homologie avec les déterminants de la résistance à la tétracycline des plasmides R100, RK2 et pBR322 des autres bactéries Gram négatives (70).

II Résistance de nature chromosomique.

Tally et coll. (70) ont été les premiers à démontrer que certaines souches de *B. fragilis* étaient capables de transférer une résistance à un antibiotique en l'absence de molécule de DNA plasmidique détectable dans la souche réceptrice.

Ainsi, une souche de *B. fragilis* était capable de transférer en bloc vers un autre *Bacteroides* la résistance à la clindamycine et à la tétracycline si la clindamycine était utilisée pour sélectionner les bactéries réceptrices.

Par contre, si la tétracycline était utilisée comme agent de sélection, seulement 33% de cotransfert des deux résistances était observé.

Privitera et coll. (61) ont par la suite montré que ce mécanisme de transfert de la résistance à la tétracycline n'était possible que lorsque les souches donatrices étaient préalablement incubées en présence de tétracycline.

La fréquence de transfert obtenue est de l'ordre de 10^{-6} . Le transfert n'est pas inhibé par la présence de DNases, un contact physique entre bactéries réceptrices et donatrices est nécessaire, aucun plasmide ne semble impliqué; ce qui suggère l'existence d'un transfert de type conjugatif de nature chromosomique.

La résistance à la tétracycline est inductible. Le gène responsable de l'acquisition de cette résistance est totalement différent de celui situé au niveau des fragments *EcoRI*-D et B de pBF4 et pBFTM10.

Shoemaker et coll. (77, 96) ont également montré que cet élément de nature chromosomique noté ERL était capable de mobiliser le transfert de plasmides non conjugatifs de petite taille comme pB8-51 et pBFTM10.

En fait, il existerait au moins deux types d'éléments conjugatifs chromosomiques, le premier transférant uniquement la résistance à la tétracycline, le

deuxième étant capable de cotransférer la résistance à la tétracycline et à l'érythromycine. Shoemaker et coll. (80) ont cloné ces deux déterminants différents dans le vecteur navette de nature cosmétique pNJR1 conférant à ce plasmide des propriétés d'autotransfert chez *Bacteroides*. Par contre, les gènes de résistance à l'érythromycine et à la tétracycline, ne s'expriment pas lorsqu'ils sont introduits chez *E. coli*.

10 Utilisation des caractères marqueurs de *Bacteroides* existant pour la réalisation de vecteurs de clonage.

L'étude de l'expression de fragments de DNA étranger passe nécessairement par leur insertion dans un vecteur de clonage. Celui-ci doit présenter les qualités suivantes:

1- Etre facile à transférer vers la bactérie réceptrice par conjugaison ou par transformation.

2- Etre de petite taille de façon à permettre l'insertion de fragments de tailles importantes.

3- Exister en un nombre de copies assez important de façon à ce que le produit du DNA inséré soit aisément détectable.

4- Posséder les gènes nécessaires à sa répllication dans la bactérie hôte.

5- Renfermer un ou plusieurs caractères marqueurs de résistance à un antibiotique par exemple pour sélectionner facilement la bactérie ayant reçu le vecteur.

6- Posséder des sites uniques de coupure par des enzymes de restriction permettant d'y insérer des fragments de DNA étranger.

Il existe également des vecteurs navettes qui en plus des propriétés précédentes sont capables de se répliquer dans deux genres bactériens différents.

Ces plasmides possèdent des gènes de résistance et des origines de répllication s'exprimant dans les deux genres.

Plusieurs vecteurs navettes *E. coli/Bacteroides* ont été développés.

1- Vecteurs navettes transférables vers *Bacteroides* à partir d'*E. coli* par mobilisation.

A- pDP1.

Le premier vecteur navette *E. coli/Bacteroides* qui a été construit est pDP1 (28). Ce plasmide a été réalisé par la ligature des produits de la digestion partielle de pCP1 (pBFTM10) par *EcoRI* et de la digestion totale de pDG5 par la même enzyme.

pDG5 est un plasmide dérivé de pBR322, dépourvu des gènes de résistance à la tétracycline et possédant un fragment *HaeII* de 760 paires de bases contenant l'origine de répllication *oriT* de RK2. pDG5 peut ainsi être transféré par mobilisation par pRK231 grâce au système de conjugaison de RK2.

La figure 8 représente la carte de restriction de pDP1. La taille du vecteur navette est de 19 kb. Les gènes de résistance à la clindamycine/érythromycine sont originaires de pBFTM10, la résistance aux β -lactames provient de pBR322.

Ce plasmide peut se répliquer chez *E. coli* grâce à la présence de l'origine de répllication du pBR322, et se maintenir chez *B. fragilis* grâce aux gènes de répllication de pBFTM10.

Des dérivés de délétion de pDP1 ont été réalisés par Guiney et coll. dans le but de localiser l'origine de répllication de pBFTM10 (28).

De plus Guiney et coll. ont découvert que le composant pCP1 de pDP1 est porteur d'une résistance à la tétracycline cryptique chez *Bacteroides*. Le gène impliqué est localisé sur le fragment *EcoRI*-B de pBFTM10, associé au gène *ermF*. La résistance à la tétracycline ne s'exprime que lorsque pDP1 est transféré chez *E. coli* et seulement lorsque la souche est cultivée en aérobiose (28,46).

pDP1 est transféré par conjugaison en utilisant le plasmide mobilisateur pRK231; la fréquence de transfert

d'*E. coli* vers *Bacteroides* est $8 \cdot 10^{-6}$ lorsque *B. fragilis* 638 Rif^r est la souche réceptrice. Ce taux est beaucoup plus faible lorsque d'autres souches réceptrices sont utilisées.

Shoemaker et coll. (77), en construisant des plasmides hybrides avec des fragments de pBFTM10, ont mis en évidence que celui-ci pouvait être mobilisé par des plasmides du groupe d'incompatibilité P comme R751 et pRK231. pDP1 possède ainsi deux régions permettant sa mobilisation par pRK231; une est localisée sur pBFTM10 et l'autre correspond à la région *oriT* de RK2. (voir figure 8)

De plus, pDP1 comme pBFTM10 peuvent être transférés de *Bacteroides* vers *Bacteroides* par un élément Tc^r de nature chromosomique porté par la souche donatrice (77). En effet, aucun plasmide autre que le vecteur n'est détecté dans les transconjugants qui deviennent Tc^r et Clⁱ-Em^r. Ces résultats indiquent que ces plasmides sont transférés par cointégration avec un élément conjugatif de nature chromosomique portant les gènes de résistance à la tétracycline.

B- pE5-2.

pE5-2 est un vecteur de 17 kb, trois plasmides ont servi à sa construction: pB8-51, RSF1010 et pBF4. (75)

- pB8-51 est un plasmide cryptique de 4.4 kb très répandu chez *Bacteroides*; c'est lui qui apporte les gènes permettant la répllication du vecteur chez *Bacteroides*.

- RSF1010 est un plasmide originaire d'*E.coli* du groupe d'incompatibilité Q à large spécificité d'hôte conférant la résistance aux sulfonamides. Ce plasmide est mobilisé par des plasmides du groupe d'incompatibilité P comme le R751.

- Le marqueur s'exprimant chez *Bacteroides* est porté par le fragment *EcoRI*-D de pBF4 qui code pour les résistances à la clindamycine/érythromycine ainsi que pour la résistance à la tétracycline chez *E.coli*.

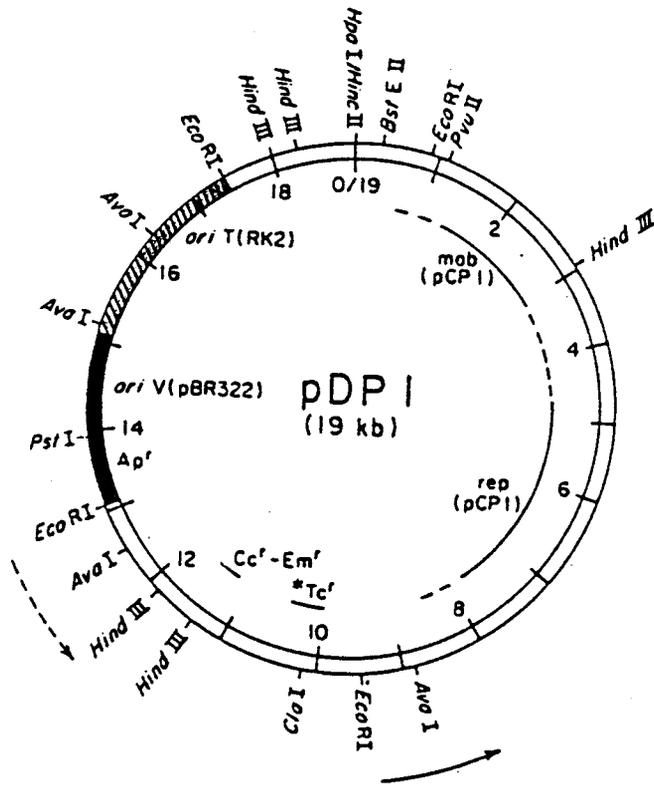


Figure 8: Carte de restriction de pDP1.

mob= Région mobilisée par R751.

rep= Région permettant la répllication chez *Bacteroides*.

Le vecteur construit est très stable chez *E. coli*, il est transféré par conjugaison vers *Bacteroides* à une fréquence de 10^{-6} en utilisant le R751 comme plasmide mobilisateur. Le déterminant sulfanilamide ne s'exprime pas chez *Bacteroides*.

La carte de pE5-2 est représentée en figure 9.

Par la suite, Shoemaker et coll. ont montré que pB8-51 pouvait être mobilisé par les plasmides du groupe d'incompatibilité P comme R751 (77). Malheureusement, pB8-51 ne peut pas permettre la mobilisation de pE5-2, la région essentielle à la mobilisation de pB8-51 étant coupée par l'insertion de ce plasmide au niveau du site *HincII* dans la construction de pE5-2.

C- pVAL-1.

pE5-2 n'étant pas mobilisable par R751 au niveau du pB8-51 inséré, Valentine et coll. (96) ont construit un autre vecteur navette ne présentant pas cet inconvénient.

pVAL1 est un plasmide de 11.0 kb construit par la digestion partielle de pB8-51 par *TaqI* et son insertion dans le site *ClaI* de pBT1 plasmide hybride, constitué de pBR328 et du fragment *EcoRI*-D de pBF4.

La carte de restriction de pVAL1 est représentée en figure 10.

Propriétés de pVAL1.

- Ce plasmide est très stable chez *E. coli*; par contre, chez *Bacteroides*, sans pression de sélection, seulement 60% des souches demeurent *Em^r* après 10 générations.

- pVAL1 est mobilisable par le R751; il est également mobilisé par les éléments conjugatifs de nature chromosomique *ERL Tc^r* et *Tc-Em^r*.

- pBF4 est capable de mobiliser pVAL1 puisqu'un dérivé naturel de délétion *Em^s* noté pBF4ΔE2 transfère le vecteur d'une souche de *Bacteroides* vers une autre à la fréquence de 10^{-4} .

- Valentine et coll. ont également mis en évidence le transfert de pVAL1 de BU1001 vers *E. coli* ou vers une

autre souche de *Bacteroides* alors que BU1001 ne possède aucun élément conjugatif connu permettant cette mobilisation.

D- pNJR1, pNJR5.

Un vecteur navette de nature cosmétique: pNJR1 à été construit par Shoemaker et coll. (80) dans le but de cloner les éléments conjugatifs de nature chromosomique Tc-Em^r de *Bacteroides*. Le vecteur navette ainsi construit est réalisé par l'insertion de pB8-51 digéré par *HincII* au niveau du site *HpaI* du vecteur cosmétique pJRD215. pNJR1 est un plasmide de 14.4 kb ne portant aucun caractère marqueur s'exprimant chez *Bactéroïdes*. Ce vecteur est très stable chez *Bacteroides*, il est mobilisable de *E. coli* vers *E.coli* ou vers *Bacteroides* par les plasmides du groupe d'incompatibilité P; par contre, pB8-51 n'intervient pas dans cette mobilisation. La nature cosmétique de ce vecteur permet d'insérer des fragments de 50 kb environ qu'il est possible ensuite de transférer chez *Bacteroides* par conjugaison. La carte de restriction de pNJR1 est représentée en figure 11.

Un dérivé de pNJR1: pNJR5 a été également réalisé par l'insertion des gènes de résistance à la clindamycine/érythromycine de pBFTM10 au niveau des sites *EcoRI*-*ClaI* de pNJR1. Le vecteur ainsi construit gardant toutes les propriétés du plasmide initial.

II- Vecteurs navettes transférables par transformation.

Smith a réalisé la construction de 3 vecteurs de clonage pFD173, pFD176 et pBI191 (84). Les deux premiers plasmides possèdent un plasmide cryptique de *Bacteroides* de 2.7 kb: pBI143, les gènes de résistance à la clindamycine-érythromycine du segment *HaeII*-*AvaI* du fragment *EcoRI*-D de pBF4. pUC19 apporte les gènes nécessaires à la répllication de ces vecteurs chez *E. coli*.

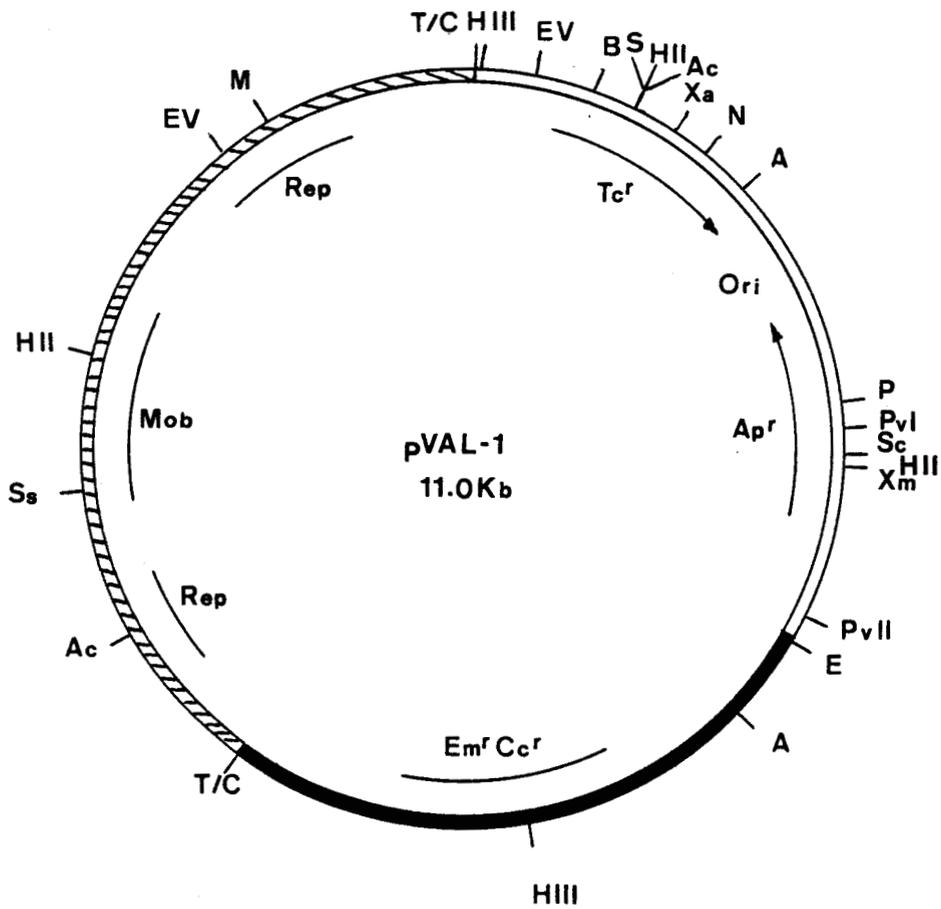


Figure 10: Carte de restriction de pVAL1 (11.0kb).

- = Fragment Clir de pBF4.
- ▨ = pB8-51.
- = pBR328.

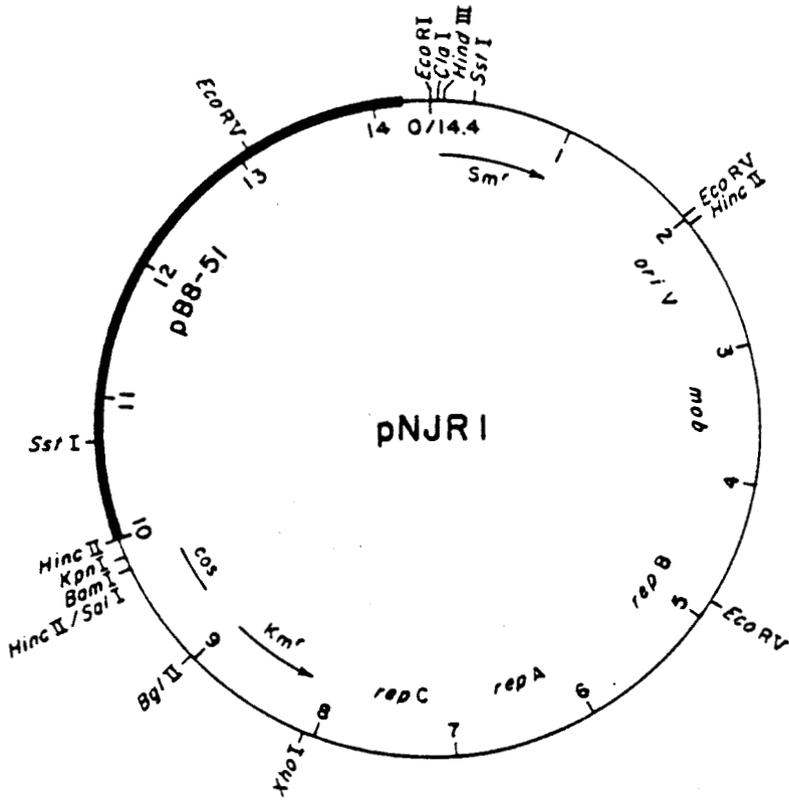


Figure 11: Carte de restriction de pNJR1 (14,4 kb).

█ = pB8-51.

— = pJRD215.

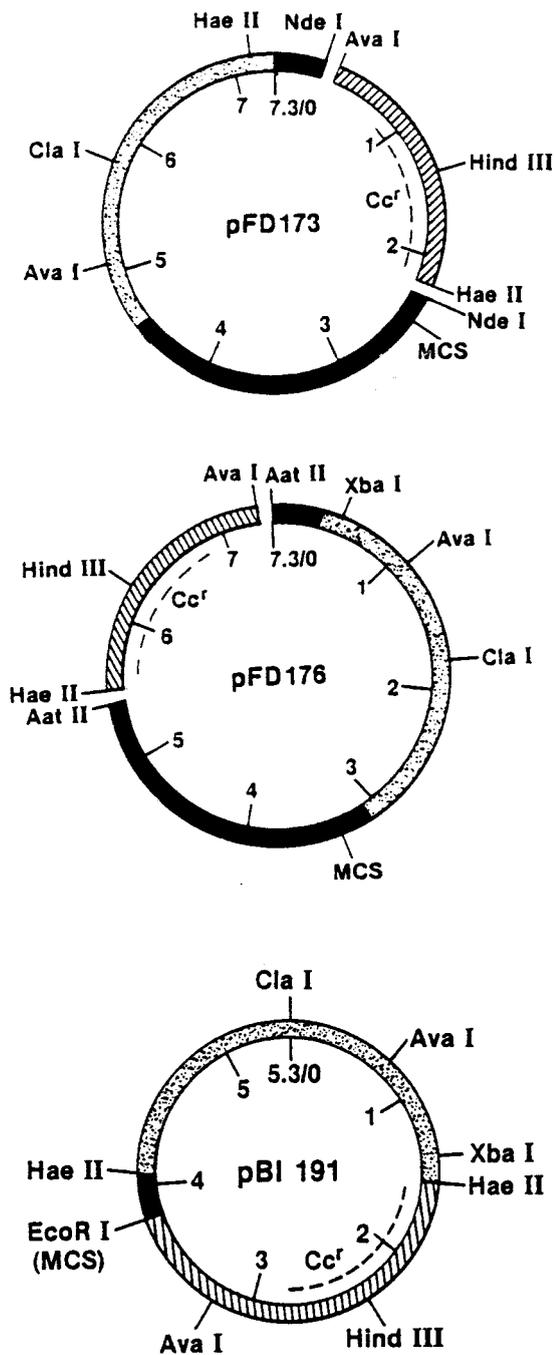


Figure 12: Cartes de restriction de pFD173 (7,3 kb), pFD176 (7,3 kb) et pBI191 (5,3 kb).

- = pUC19.
- ▨ = pBI143.
- ▩ = Fragment Clair de pBF4

pBI191 par contre est un petit plasmide de 5.3 kb se répliquant uniquement chez *Bacteroides*.

Ces vecteurs ont l'avantage d'être de plus petite taille, de posséder le site de clonage multiple de pUC9 (pour pFD173 et pFD176) mais l'énorme inconvénient de devoir être introduits chez *Bacteroides* par transformation (85). Cette technique utilisant du PEG semble en effet limitée à des plasmides de petite taille et à certaines souches réceptrices (70).

Les cartes de restriction de ces plasmides sont représentées en figure 12.

11 Mode transfert de ces vecteurs.

I- Conjugaison.

Les vecteurs construits, dans leur très grande majorité, sont transférés vers *Bacteroides* par mobilisation en utilisant des plasmides du groupe d'incompatibilité P.

Ils peuvent également être transférés par des éléments conjugatifs de nature chromosomique Tcr ou Tc-Emr.

II- Transformation.

Cette méthode semble beaucoup plus intéressante que la conjugaison. En effet, il n'est pas nécessaire que le plasmide à transférer soit conjugatif; il pourra donc être de taille réduite. De plus, l'utilisation de vecteurs navettes se répliquant et s'exprimant dans plusieurs genres bactériens n'est plus indispensable.

La transformation est le passage, l'intégration d'une molécule de DNA exogène libre dans une bactérie. Cette molécule pourra par la suite se répliquer et s'exprimer, intégrée au DNA chromosomique bactérien ou, de façon autonome sous forme plasmidique.

C'est Griffith qui le premier en 1928 mit en évidence chez *Streptococcus pneumoniae* le phénomène de transformation et

ceci bien avant que le DNA ait été reconnu comme le support de l'information génétique.

a- Compétence naturelle.

Certaines bactéries sont naturellement compétentes, elles sont capables de reconnaître, de fixer et d'introduire le DNA extracellulaire sans qu'il soit nécessaire de lui faire subir de traitements physico-chimiques particuliers.

A cette date 14 genres bactériens possédant des systèmes de transformation naturels ont été recensés. Il s'agit d'*Acinetobacter*, d'*Azotobacter*, de *Bacillus*, d'*Haemophilus*, d'*Halobacterium*, de *Pseudomonas*, de *Streptococcus*, de *Streptomyces*, de *Methylobacterium*, de *Micrococcus*, de *Moraxella*, de *Mycobacterium*, de *Neisseria* et de *Synechococcus*. Pour toutes ces bactéries il existe des mécanismes biologiques qui permettent la reconnaissance, l'entrée et l'expression du DNA. Ainsi, chez *Bacillus subtilis*, le DNA est tout d'abord fixé à la cellule puis une nucléase détruit l'un des deux brins; c'est donc du DNA monocaténaire qui est introduit dans la bactérie.

Récemment, il a été mis en évidence chez *Bacillus subtilis* (49) un complexe protéique de 35 kdal., associé à la membrane bactérienne, capable de reconnaître le DNA. Cette protéine constituée de 2 sous-unités de 17 et 18 kdal possède également l'activité nucléasique (49). Néanmoins, le mécanisme de transit du DNA simple brin à travers la membrane demeure obscur (49).

b- Compétence induite artificiellement.

Utilisation de cations divalents.

Malheureusement, un très grand nombre de bactéries comme *Bacteroides* et *Escherichia coli* n'exprime pas de compétence naturelle. Mandel et Higa (49) ont observé que des cellules d'*Escherichia coli* traitées à 4°C avec des solutions de CaCl_2 puis subissant des chocs thermiques répétés deviennent compétentes à l'introduction du DNA. Le

mécanisme avec lequel *E. coli* importe le DNA est inconnu mais le procédé de fixation du DNA sur la bactérie est actif. Les DNA super-hélicoïdaux, circulaires et circulaires simple brin sont introduits plus efficacement que l'ADN linéaire. Cette technique est maintenant considérée comme la méthode de transformation standard d'*E. coli*. Les fréquences obtenues atteignent 10^8 transformants par μg de DNA. Des variations de cette technique ont été appliquées avec succès à la transformation d'un grand nombre de bactéries à Gram négatif.

Malheureusement, jusqu'à présent les tentatives pour transformer *Bacteroides* en utilisant des cations divalents ont toutes échoué.

Transformation avec du polyéthylène-glycol.

Chez les bactéries Gram⁺, le polyéthylène-glycol a été utilisé avec succès pour induire la transformation de protoplastes de *Bacillus subtilis* (13, 32) et de *Clostridium acetobutylicum* (39) notamment.

Récemment une technique utilisant du polyéthylène-glycol a été développée par Klebe (38) pour induire la transformation d'*E. coli* et de *Saccharomyces cerevisiae*. Les fréquences de transformation atteignent $2 \cdot 10^6$ transformants par μg de DNA avec *E. coli* HB101 et pBR322. Une variation de cette méthode a été utilisée avec succès par Smith (84) avec *Bacteroides spp.* Les cellules sont transformées en présence de DNA et de PEG 6000 à 25% à température ambiante à pH 4.5 et en aérobiose. Les bactéries étant au préalable cultivées en présence de MgCl_2 5mM jusqu'au milieu de la phase exponentielle de croissance.

Avec *B. fragilis* 638 et pBFTM10, les fréquences obtenues atteignent $2 \cdot 10^5$ transformants par μg de DNA. Ces résultats sont obtenus lorsque la souche qui a servi pour extraire le plasmide est la même que celle qui servira à la transformation.

La fréquence de transformation dépend énormément de la bactérie réceptrice utilisée (85, 53). Avec d'autres souches que *B. fragilis* 638 le nombre de transformants est très variable et toujours beaucoup plus faible. Plusieurs plasmides pouvant être introduits par transformation chez *Bacteroides* ont été développés (pFD173, pFD176 et pBI191) (84). L'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle semble limitée à l'utilisation d'une seule souche réceptrice; en effet avec d'autres *Bacteroides*, les résultats restent bien décevants (70).

Transformation des bactéries par électroporation.

Beaucoup de souches bactériennes sont résistantes aux traitements chimiques appliqués jusqu'ici. Très récemment, est apparue une nouvelle technique de transformation des bactéries par électroporation ou électrotransformation. Cette méthode semble être une excellente alternative pour les bactéries qui ne peuvent pas être efficacement transformées avec les méthodes chimiques classiques. Bien qu'étant initialement destinée à transformer des cellules eucaryotes, l'électroporation a été, par la suite, appliquée avec succès à un grand nombre de bactéries différentes comme *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Klebsiella pneumoniae*, *Rhizobium meliloti*, etc (49).

Le principe est le suivant:

Les bactéries en suspension dans un tampon de force ionique appropriée sont exposées à un champ électrique puissant. Les constituants membranaires deviennent polarisés. Si le champ électrique atteint un certain seuil, la membrane se rompt en certains endroits localisés ce qui la rend perméable aux molécules exogènes (74). La perméabilité induite est réversible si la tension appliquée ne dépasse pas une valeur limite. Jusqu'à présent le mécanisme exact de l'électroporation n'est pas

connu (74). Deux types de signaux électriques ont été utilisés pour transformer les bactéries:

-Un signal carré où le champ électrique appliqué demeure constant pendant un temps défini.

-Un signal où le voltage appliqué décroît d'une façon exponentielle. C'est ce type d'électroporation qui est le plus utilisé actuellement.

Le signal exponentiel est généré par la décharge d'une capacité à travers la suspension cellulaire. Le voltage varie suivant la formule: $V=V_0 \cdot e^{-t/\tau}$ avec $\tau=RC$. V est la différence de potentiel appliquée, R est la résistance du milieu dans lequel se décharge la capacité C . Le champ électrique doit être très important; ainsi chez *E. coli*, on ne détecte pas de transformants si celui-ci est inférieur à 3 kvolts/cm et la fréquence de transformation augmente linéairement jusqu'à 10kvolts/cm. Le signal est appliqué pendant des temps de 5msec au minimum. Le nombre de transformants atteint $10^{10}/\mu\text{g}$ de DNA, il augmente linéairement avec la concentration en ADN et ceci jusqu'à 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Des plasmides dont la taille varie de 3 à 44kb ont été introduits par électroporation; il ne semble pas qu'une relation très nette entre la taille de ceux-ci et la fréquence de transformation puisse exister. Par contre du DNA linéaire de phage lambda est introduit avec une fréquence beaucoup plus faible que du DNA plasmidique. Le nombre de transformants augmente également en fonction de la concentration cellulaire dans le milieu d'électroporation. La force ionique du milieu de transformation joue un rôle important; c'est elle en effet qui conditionne la durée du signal et l'importance du courant électrique. Les milieux utilisés présentent généralement une faible force ionique; on utilise en général des tampons phosphate 1 à 10 mM pH 7.0.

Si cette technique semble très prometteuse, les résultats obtenus varient fortement selon les souches utilisées

Certains facteurs comme l'existence d'une forte restriction, la présence de nucléases extracellulaires, la

présence d'une capsule, diminuent très notablement la fréquence de transformation. Ainsi il semble nécessaire d'adapter un protocole pour chaque souche à transformer. Cette technique de transformation est très récente et aucun résultat concernant *Bacteroides* n'a encore été publié.

12 PRINCIPAUX GENES CLONES.

I Gènes de *Bacteroides* clonés vers *E. coli*.

Un grand nombre de gènes originaires de *Bacteroides* ont été clonés chez *E. coli*. Pour la plupart d'entre eux il s'agit de gènes métaboliques impliqués dans la dégradation des polysaccharides. Tous ces gènes s'expriment correctement chez *E. coli* bien que les protéines synthétisées subissent très souvent des modifications structurales. Le tableau 5 donne un résumé des principaux gènes clonés chez *E. coli*.

II Expression de gènes originaires de bactéries Gram-négatives comme *E. coli* vers *Bacteroides*.

Jusqu'à présent, aucun gène conférant la résistance à un antibiotique et s'exprimant normalement chez *E. coli* ne s'exprime chez *Bacteroides*. Ainsi, les résistances aux B-lactames et à la tétracycline de pBR322, la résistance au sulfonamide de RSF1010, la résistance au triméthoprime de R751 ainsi que la résistance à la tétracycline de pBF4 et pBFTM10 ne s'expriment pas chez *Bacteroides*.

Les origines de répllication qui sont fonctionnelles chez *E. coli* ne sont pas reconnues par *Bacteroides*. Ainsi, RSF1010 et R751 qui sont des plasmides des groupes d'incompatibilité Q et P sont maintenus dans un grand nombre d'espèces à Gram-négatif différentes, ne se répliquent pas chez *Bacteroides*.

A cette date, aucun gène d' *E. coli* ne s'est avéré capable de s'exprimer chez *Bacteroides*. Ces résultats

peuvent avoir plusieurs explications. En effet, ce phénomène peut être provoqué par l'existence d'une barrière au niveau de la transcription ou de la traduction, par la synthèse de protéines non fonctionnelles ou par l'absence de cofacteurs indispensables à l'expression des enzymes traduites. De plus, peu de gènes originaires d' *E. coli* ont été testés et il est possible que des gènes métaboliques, non associés à des complexes multi-enzymatiques ou membranaires particuliers pourront s'exprimer chez *E. coli*.

Origine	Activité	Remarques	Ref
pBF4, pBFTM10	Résistance à la tétracycline Tc*	Expression en aérobiose seulement	28, 75
<i>B. nodosus</i> footrot du mouton	2 sous-unités de la piline.	Expression chez <i>E. coli</i> et <i>Pseudomonas</i>	17, 18 19
<i>B. succinogenes</i>	Cellodextrinase	Active chez <i>E. coli</i> .	26
<i>B. thetaïotao.</i>	Chondroïtine Lyase II	Protéine active chez <i>E. coli</i> mais de PM plus faible	29
<i>B. gingivalis</i>	2 sous-unités de la piline		
<i>B. fragilis</i>	Glutamine synthétase	Complémente <i>glnA</i> chez <i>E. coli</i>	88
<i>B. succinogenes</i>	Endoglucanase (cellulase)	Active chez <i>E. coli</i> localisée dans l'espace périplasmique.	94
<i>B. ruminicola</i>	Xylanase	Active chez <i>E. coli</i>	104

Tableau 5: Principaux gènes de *Bacteroides* clonés chez *E. coli*.

-MATERIELS ET METHODES-

1- Bactéries utilisés.

I. *Escherichia coli*.

Nous utilisons: La souche HB101 qui présente les caractères F⁻, *hsdS-20* [*hsdM hsdR*] *ara-14*, *lacY1*, *galK12*, *xyl-5*, *proA2*, *leuB6*, *thi-1*, *supE44*, *endoI*, *recA13*, *rps L20*, (Sm^r), λ⁻. (Boyer et Roulland-Dussois 1969). (8)

La souche LE392 F⁻, *hsdR514*, [*r-k*, *m+k*], *lacY1*, Δ(*lacIZY*)6 *galK2*, *galT22*, *metB1*, *trpR55*, *supE44*, *supF58*, λ⁻.

Le mutant Nal^r de la souche W3350 F⁻, Lac⁻, Gal⁻, λ⁻.

II. *Bacteroides*.

Les souches utilisées sont indiquées dans le tableau 6.

2- Plasmides.

Les plasmides utilisés sont décrits dans le tableau 7.

N° Souche	Espèce	Plasmides kbp
7	<i>B. fragilis</i>	
51	<i>B. fragilis</i>	
53	<i>B. fragilis</i>	
69		
101	<i>B. fragilis</i>	
102	<i>B. thetaiotao.</i>	
107	<i>B. thetaiotao.</i>	
130	<i>B. fragilis</i>	
146	<i>B. thetaiotao</i>	
154	<i>B. vulgatus</i>	2.7 - 46.5
178	<i>B. fragilis</i>	
181	<i>B. fragilis</i>	
184	<i>B. thetaiotao.</i>	
191	<i>B. fragilis</i>	
207	<i>B. fragilis</i>	
210	<i>B. fragilis</i>	
214	<i>B. fragilis</i>	
217	<i>B. fragilis</i>	3.3
238	<i>B. fragilis</i>	
256	<i>B. fragilis</i>	
290	<i>B. fragilis</i>	
293	<i>B. fragilis</i>	
344	<i>B. fragilis</i>	13.5
347	<i>B. fragilis</i>	
356	<i>B. fragilis</i>	6.0
367	<i>B. fragilis</i>	4.5
368	<i>B. fragilis</i>	
373	<i>B. fragilis</i>	2.7 - 4.5
385	<i>B. fragilis</i>	6.0 - 7.5
407	<i>B. thetaiotao.</i>	
418	<i>B. capillosus</i>	
419	<i>B. distasonis</i>	3.9-9.75-48.5
420	<i>B. oralis</i>	3.9 - 46.0

Tableau 6: Souches de *Bacteroides* utilisées.

N° Souche	Espèce	Plasmides kbp
440	<i>B. fragilis</i>	
448	<i>B. fragilis</i>	2.7-3.9-4.5-9.
452	<i>B. fragilis</i>	
454	<i>B. fragilis</i>	
455	<i>B. fragilis</i>	
457	<i>B. fragilis</i>	
462	<i>B. distasonis</i>	3.9
463	<i>B. fragilis</i>	
464	<i>B. fragilis</i>	
470	<i>B. fragilis</i>	3.9 - 6.0
484	<i>B. fragilis</i>	3.6 - 4.2
489	<i>B. thetaïotao.</i>	3.9 - 6.75
495	<i>B. fragilis</i>	
503	<i>B. fragilis</i>	
513	<i>B. fragilis</i>	
517	<i>B. fragilis</i>	6.0
519	<i>B. thetaïotao.</i>	
524	<i>B. distasonis</i>	
527	<i>B. fragilis</i>	
560	<i>B. fragilis</i>	6.0
561	<i>B. fragilis</i>	
563	<i>B. fragilis</i>	10.2
565	<i>B. fragilis</i>	3.9-6.0-7.2
611	<i>B. fragilis</i>	
623	<i>B. fragilis</i>	
643	<i>B. thetaïotao.</i>	10.0
648	<i>B. fragilis</i>	6.0
649	<i>B. fragilis</i>	
653		
638	<i>B. fragilis</i>	
638 (pBFTM10)	<i>B. fragilis</i>	
ATTCC19189	<i>B. ruminicola</i> (BR23)	9.5

Tableau 6 (suite): Souches de *Bacteroides* utilisées.

Plasmides	Taille kb	Phénotype Particularités	Ref.
R751	51.4	Tra ⁺ ; Tpr ⁺ ; IncP β	50
pRK2013		Dérivé de ColE1 Tra ⁺ ; Kmr ^r ; IncColE1	20
pKC7	5.89	Apr ^r ; Kmr ^r Construit à partir de pBR322 dont le petit fragment <i>Hind</i> III <i>Bam</i> HI a été remplacé par celui de 1.8kb <i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI du Tn5 Mobilisable par pRK2013. Amplifiable au Cm.	64
pBFTM10	14.6	Ccr ^r ; Emr ^r chez <i>Bacteroides</i> Tcr ^r chez <i>E. coli</i> . mobilisable par R751.	93
pBF367	4.6	Plasmide cryptique originaire de <i>B. fragilis</i> 367.	45
pPRI7	9.5	Plasmide cryptique originaire de <i>B. ruminicola</i> 23.	21

Tableau 7: Plasmides utilisés.

3- Milieux et techniques de cultures.

I. Culture d' *Escherichia coli*.

Milieu de Luria et Burrous. (LB)

C'est un milieu riche, sa composition est la suivante:

- Extrait de levure 5 g
- Tryptone 10 g
- NaCl 10 g
- Eau distillée QSP 1 l.

Le pH est ajusté à 7,2 avec NaOH ou HCl suivant le pH initial.

La stérilisation se fait par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Ce milieu peut être préparé gélifié par adjonction d'agar à 15 g/l

Milieu de Lennox (ML).

Milieu synthétique de composition suivante:

- NH_4Cl 5 g
- NH_4NO_3 1 g
- Na_2SO_4 2 g
- K_2HPO_4 9 g
- $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g
- Source de carbone 0,5 g/l
- H_2O QSP 1 l.

Le pH est ajusté à 7,2.

Selon les besoins, ce milieu est complété par des acides aminés à 20 mg/l et par de la vitamine B1 à 2 mg/l.

Ce milieu peut être gélifié par addition d'agar jusqu'à une concentration de 15g/l; il est stérilisé à l'autoclave à 105°C pendant 30 min.

II. Culture de *Bacteroides*.

A- Bouillon cerveau-coeur (BHI).

Les souches sont cultivées en anaérobiose dans des flacons de 30 ml type pénicilline contenant 10 ml de BHI (Diagnostic Pasteur) complété en hémine, vitamine B12, cystéine utilisée comme agent réducteur, résazurine employée comme indicateur de potentiel Red-Ox.

Le BHI est un milieu riche, il est préparé de la façon suivante:

- 37 g de milieu BHI prêt à l'emploi sont dissous dans 1 l d'eau.

- Ajouter 0,5 ml d'une solution de résazurine à 1 mg/ml.

- Porter à ébullition 15 min pour éliminer l'oxygène dissous.

- Refroidir sous atmosphère d'azote jusqu'à 45°C.

- Ajouter 10 ml de solution d'hémine à 0.5 mg/ml et 0.1 ml de solution de vitamine B12 à 0.1 mg/ml.

- Refroidir ensuite sous atmosphère de N_2/CO_2 (85/15, v/v) jusqu'à 35°C.

- Dissoudre 0,5 g de cystéine.

- Ajuster le pH à 7.2 avec du $KHCO_3$.

- Le milieu est ensuite conditionné en flacon sous atmosphère de N_2/CO_2 ; il peut également être préparé gélosé par adjonction d'agar à une concentration finale de 15g/l.

La stérilisation se fait à l'autoclave à 120°C pendant 20 min.

Le BHI est également utilisé glycérolé à 20% pour conserver les souches à -20°C.

B- Culture de *Bacteroides ruminicola*.

Bacteroides ruminicola est cultivé sur milieu RCM (Oxoid). Ce milieu est complété et préparé comme le BHI.

C- Conditions de culture de *Bacteroides*.

Bacteroides est une bactérie anaérobie stricte. Les boîtes de Petri sont ensemencées et incubées en station anaérobie à 35°C sous une atmosphère de N₂/CO₂/H₂ (75/15/10, v/v/v). L'hydrogène a pour rôle de se combiner aux traces d'oxygène éventuellement présentes pour former de l'eau au niveau d'un catalyseur au palladium. Celui-ci est régénéré toutes les 3 semaines environ à 160°C pendant deux heures.

III. Antibiotiques utilisés pour la réalisation des milieux sélectifs.

Les antibiotiques employés pour la sélection des souches sont utilisés aux concentrations finales suivantes à partir de solutions mères stérilisées sur unités de filtration de 0.22µm de porosité.

Ampicilline	Ap; Sigma	100 µg/ml.
Carbénicilline	Cb; Serva	150 µg/ml.
Clindamycine	Cc; Upjohn	10 µg/ml.
Erythromycine	Em; Boehringer	10 µg/ml.
Kanamycine	Km; Sigma	50 à 100 µg/ml.
Sel de sodium de l'acide nalidixique	Nal; Sigma	100µg/ml.
Tétracycline-HCl	Tc; Sigma	10 µg/ml.
Triméthoprime	Tp; Sigma	100 µg/ml.

Le triméthoprime est ajouté au milieu de culture juste avant autoclavage.

4- Méthodes d'extraction du DNA plasmidique.

I. Technique rapide selon Grosveld et coll.(27)

Cette méthode est utilisée pour les extractions rapides de petites quantités de DNA plasmidique. Elle permet d'obtenir en une journée du DNA assez pur permettant son analyse par électrophorèse ou sa digestion par des enzymes de restriction.

Cette technique donne de bons résultats avec *E. coli*; elle est par contre très peu appropriée à l'extraction de plasmides de *Bacteroides*.

10 ml d'une culture d'*E. coli* cultivée à 30°C et parvenue en fin de phase exponentielle de croissance sont centrifugés à 6000 g pendant 15 min. Le culot est ensuite remis en suspension dans 400 µl de tampon Tris-HCl 25mM, glucose 50 mM, EDTA 10mM pH 8.0 (TE Glucose).

La lyse alcaline est effectuée par addition de 800 µl d'une solution de NaOH/SDS (NaOH 0.2N, SDS 1% p/v), préparée juste avant emploi, et homogénéisation douce pendant 5 min à température ambiante. On introduit ensuite 400 µl d'acétate de potassium 3M pH 4,8 pour précipiter l'ADN chromosomique.

Après homogénéisation par retournement du tube, le mélange est placé 5 min dans la glace puis on centrifuge 10 min à 10000 g. Le surnageant est prélevé, déprotéinisé par un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1), saturé en TE Glucose.

Après homogénéisation pendant 10 min., la phase aqueuse est séparée par centrifugation à 10000 g pendant 5 min puis prélevée et traitée deux fois par un volume du mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1).

La déprotéinisation terminée, on ajoute 3/7 de volume d'une solution de NaCl 1M. L'ADN est ensuite précipité par 2 volumes d'éthanol à 95°. Le tube est ensuite placé à -20°C pendant 2 heures au minimum. Le DNA est récupéré

par centrifugation à 10000 g pendant 25 min à 0°C. Le culot obtenu est séché sous vide puis remis en solution dans 100 µl d'eau distillée stérile. La solution est ensuite traitée à la RNase A par l'adjonction de 2 µl de RNase A à 1 mg/ml dans l'acétate de sodium 40 mM pH 4.0. La solution de RNase A étant préalablement chauffée à 100°C pendant 10 min pour éliminer toute contamination par des DNases. Le tube est incubé 2 heures à 37°C, le DNA obtenu peut ensuite être précipité par l'éthanol/NaCl ou être utilisé tel quel sans manipulations supplémentaires.

II. Méthode de préparation de plasmides selon Ish-Horowicz et Burke.(35)

Cette méthode est utilisée pour la préparation de plasmides d'*E. coli* amplifiables au chloramphénicol. Une culture d'*E. coli* est réalisée dans les conditions suivantes:

250ml de milieu LB additionné d'antibiotiques choisis selon les résistances conférées par le plasmide à extraire sontensemencés par 10 ml de préculture. L'incubation est poursuivie à 30°C avec agitation. Lorsque la densité optique à 570 nm devient comprise entre 0.7 et 0.9 on ajoute 1.25 ml d'une solution de chloramphénicol à 30 mg/ml dans l'éthanol à 95°. La culture est ensuite maintenue sous agitation pendant 16 à 21 heures à 30°C avant d'être centrifugée à 5000 g pendant 15 min. à 4°C. Le culot bactérien est remis en suspension dans 9 ml de T/E/Glucose pH 8.0 (Tris 25 mM, EDTA 10 mM, Glucose 50 mM). On ajoute alors 1 ml de lysozyme à 10 mg/ml dissous dans du TE Glucose. Le mélange est incubé pendant 10 min. à température ambiante.

La lyse alcaline est effectuée par l'addition de 20 ml de NaOH 0.2N, SDS 1%, cette solution étant préparée extemporanément à partir d'une solution de NaOH 10N et d'une solution de SDS à 10%. Après homogénéisation et incubation 5 min. dans la glace, on ajoute 10 ml d'acétate

de potassium 3 M pH 4.8 à 4°C pour précipiter l'ADN chromosomique. Au bout de 15 min dans la glace, le mélange est centrifugé à 6000 g 10 min, après avoir ajouté 2.5ml d'eau. Le surnageant est versé à travers une seringue contenant de la fibre de verre pour retenir les agrégats résiduels.

Le DNA plasmidique est précipité par 0.6 volume d'isopropanol glacé à -20°C pendant 25 min. avant d'être centrifugé à 10000 g pendant 20 min. Le culot est séché sous vide et repris par 25 ml de tampon T10E10 pH 8.0 (Tris 10mM, EDTA 10mM). Le pH de la solution est ajusté à 7.0 par addition de 100 µl environ de Tris base 2 M. On ajoute 50 µl d'une solution de RNaseA à 2 mg/ml préalablement chauffée 10 min à 100°C; puis on laisse incuber le tube 2 heures à 37°C.

Avec la solution plasmidique obtenue, il est possible de réaliser une purification en gradient de chlorure de césium.

On procède de la façon suivante:

4.2 g de chlorure de césium sont dissous dans 2.4 ml de la solution de DNA plasmidique précédente. Puis on ajoute 0.4 ml d'une solution de bromure d'éthidium à 1 mg/ml dans du T10E10. Le mélange obtenu est ensuite introduit dans un tube d'ultracentrifugation Beckman de 13 ml en polyallomère.

Une solution de CsCl dans du T10E10 dont l'indice de réfraction est de 1.3780 (soit une masse volumique de 1.470 g/l) est introduite délicatement à la surface du mélange précédent. Le tube à centrifuger est complété à 11.5 ml on obtient ainsi un gradient préformé constitué de 2 couches de CsCl de densités différentes.

La centrifugation est réalisée en 17 H à 50000 tr/mn soit 170000 g dans un rotor du type 70.1 Ti à 20°C.

La centrifugation terminée, sous un éclairage UV à 302 nm, on recueille dans un tube Eppendorf, à l'aide d'une pipette automatique la bande fluorescente inférieure

correspondant au DNA plasmidique sous forme super-hélicoïdale.

Le bromure d'éthidium est extrait plusieurs fois par un volume d'isopropanol saturé en CsCl et en T10E10. Après inversion et décantation du tube, la fraction d'isopropanol enrichie en bromure d'éthidium est éliminée. Cette opération est répétée 5 à 10 fois jusqu'à disparition complète de toute fluorescence en UV de la solution de DNA plasmidique. Les traces d'isopropanol présentes dans la phase aqueuse sont ensuite extraites par un volume d'éther éthylique. Le chlorure de césium est dilué par adjonction de 3 volumes d'eau distillée. L'addition de 2 volumes d'éthanol à -20°C permet de précipiter le DNA.

Après 2 heures au minimum d'incubation à -20°C , le tube est centrifugé à 10000 g pendant 20 min. Puis le précipité est séché sous vide et remis en solution dans le tampon approprié à l'utilisation ultérieure du plasmide.

La concentration en DNA est évaluée par électrophorèse en gel d'agarose par rapport à du DNA de phage lambda de concentration connue.

- Adaptation de la méthode de Ish-Horowicz et Burke à l'extraction de plasmides de *Bacteroides*.

Bacteroides est cultivé dans 100 ml de BHI+antibiotiques, en flacons étanches de 500 ml, sous une atmosphère de $\text{N}_2/\text{CO}_2/\text{H}_2$ (75/15/10). Le protocole est le même que précédemment si ce n'est qu'après filtration sur fibre de verre, on réalise une déprotéinisation supplémentaire par un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1) suivie d'un traitement au chloroforme/alcool isoamylique (24/1). Le DNA est ensuite précipité à l'isopropanol comme précédemment

5- Extraction de DNA total de *Bacteroides*.

La méthode utilisée dérive de celle décrite par Dhaese et coll. (15).

10 ml de culture bactérienne en BHI parvenue en fin de phase exponentielle de croissance sont centrifugés à 6000 g pendant 10 min. Le culot est remis en suspension dans 3 ml de T50E20 pH 8.0 (Tris 50 mM, EDTA 20 mM).

On ajoute ensuite 1 ml de sarkosyl à 5% p/v dans le même tampon et 1 ml de pronase à 2.5 mg/ml de tampon T50E20.

Pour parfaire l'homogénéisation, le lysat est passé plusieurs fois à travers une seringue sans aiguille puis le mélange est laissé une heure au moins à l'étuve à 37°C. 1 ml de lysat est ensuite prélevé et traité par un volume de phénol saturé en Tris 100 mM pH 8.0 puis centrifugé à 5000 g. pendant 10 min. Cette déprotéinisation est effectuée deux fois. La phase aqueuse est ensuite extraite 4 fois par un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1). La solution chloroformique est ensuite centrifugée une dernière fois, le surnageant est prélevé et le DNA est précipité par 2 volumes d'éthanol à 95° à -20°C.

Après centrifugation à 10000 g pendant 20 min, le culot est séché sous vide et remis en solution dans 200 µl de T5 E0.5 S5 pH 8.0 (Tris 5 mM, EDTA 0.5 mM, NaCl 5mM).

Le DNA purifié ainsi obtenu pourra alors éventuellement subir un traitement à la RNaseA, une électrophorèse en gel d'agarose par rapport à du DNA de phage lambda pour déterminer sa concentration ou une digestion par des endonucléases de restriction.

6- Méthodes électrophorétiques.

Plusieurs types d'électrophorèse en gel d'agarose peuvent être réalisés.

I. Electrophorèse horizontale.

Ce type d'électrophorèse est destiné à estimer la pureté, la concentration ou la taille du DNA chromosomique, plasmidique ou de fragments de restriction.

On procède de la façon suivante:

-Préparation du gel d'agarose.

L'agarose est préparé à une concentration variant de 0.6 à 1.2 % p/v dans du tampon T.B.E. pH 8.3 (Tris 89 mM, acide orthoborique 89 mM, EDTA 2.5 mM). L'ensemble est porté à ébullition puis maintenu en surfusion à 55-60°C prêt à être utilisé. La solution est ensuite versée dans un support en plastique muni d'un peigne à 8, 10 ou 15 dents. Après solidification, le peigne est retiré, le gel présente alors des alvéoles dans lesquelles seront effectués les dépôts. Le gel est ensuite placé dans la cuve à électrophorèse et immergé dans le tampon T.B.E.

-Dépôt des échantillons.

Dans chaque alvéole formée par le retrait du peigne, on dépose 25 à 60 µl d'échantillon contenant 2/3 de solution de DNA et 1/3 de tampon d'arrêt pH 7 (Saccharose 50 % p/v, EDTA 50 mM, urée 4 M, bleu de bromophénol 0.1 %)

-la migration se fait avec une différence de potentiel de 100 à 130 volts à pH 8.3; le DNA est chargé négativement et migre vers l'anode. Le bleu de bromophénol permet de suivre le déroulement de l'électrophorèse.

-Coloration et observation du gel.

Le gel est ensuite placé dans un bac contenant 300 ml d'eau distillée et quelques gouttes d'une solution de bromure d'éthidium à 1 mg/ml. Selon l'épaisseur du gel, la coloration est réalisée en 15 à 30 min. Après décoloration

30 min. dans l'eau distillée, les bandes sont visualisées sous éclairage UV à 302 nm.

II. Lyse directe sur gel par électrophorèse verticale.

Cette méthode dérivée de celle d'Eckhardt (16) modifiée par Pühler et coll. (63) permet d'analyser le contenu plasmidique des transformants ou des transconjugants de souches d'*E. coli*. Elle n'est pas utilisable pour des bactéries du genre *Bacteroides*.

- Préparation du gel.

On utilise un gel d'agarose à 0.8 % p/v dans du T.B.E. pH 8.3 que l'on coule entre deux plaques en verre dépoli séparées par des espaceurs de 1.5mm. Les puits sont réalisés par un peigne en téflon à 15 dents introduit lorsque le gel est encore en surfusion.

- Préparation de l'échantillon.

A 500 μ l d'une culture bactérienne incubée à 35°C dans du LB jusqu'à DO=0.3 à 600 nm, on ajoute 1 volume de T50 E20 pH 8.0 (Tris 50 mM, EDTA 20 mM). Après homogénéisation, les cellules sont centrifugées 5 minutes à 6000 g, le surnageant est rapidement éliminé puis le culot est placé dans la glace et remis en suspension dans 60 μ l de tampon de lyse constitué de T.B.E. contenant 25 % de saccharose, 12 % de Ficoll 400, 5 U/ml de RNaseA et 1 mg/ml de lysozyme. Les deux enzymes sont ajoutées au tampon juste avant emploi. Après une rapide homogénéisation, le mélange est immédiatement transféré dans un puits du gel. Une fois que toutes les alvéoles sont remplies, chaque échantillon est recouvert de 90 μ l de T.B.E. contenant 1 % de SDS, 0.05 % de bleu de bromophénol et 0.4 % d'agarose. Après solidification, les alvéoles sont complètement remplies avec de l'agarose à 0.8 % maintenu en surfusion.

- Migration.

Les plaques de verre contenant le gel et l'échantillon sont transférées dans une cuve à électrophorèse Biorad.

La migration est de 1H15 à 30 volts, ce qui permet au SDS de migrer et de lyser les bactéries. Puis le voltage est porté à 130 volts pendant 2H30. Une fois l'électrophorèse terminée, le gel est coloré et décoloré comme en I.

III. Electroélution.

Ce type d'électrophorèse permet d'isoler avec un assez bon rendement des fragments de DNA de taille déterminée.

Protocole:

Dans chaque puits d'un gel d'agarose horizontal on dépose 60 μ l de solution de DNA digéré contenant 1/3 de volume de tampon d'arrêt. Le premier puits est constitué d'un témoin de DNA de phage Lambda digéré par *EcoRI* et *HindIII*. Après migration pendant 4H30 à 110 Volts, le gel est découpé au niveau des puits 1 et 2 sur une longueur de 8 cm environ. Cette bande témoin est prélevée, colorée de façon à localiser la position des fragments de taille intéressante (Fragments de DNA compris entre 3 et 8 kb). On découpe alors dans le gel d'agarose une alvéole de 4 mm de large, sur toute la longueur des puits restants, au niveau des fragments de 3.0 kb.

Après introduction de T.B.E. dans le puits ainsi réalisé, on rétablit la tension à 110 volts, le DNA de taille supérieure à 3.0 kb migre en direction du puits. Au bout de 5 minutes d'électrophorèse, le tampon est prélevé puis on remplit à nouveau l'alvéole par du T.B.E.. Cette opération est répétée pendant 5 à 6 heures de façon à ce que tous les fragments compris entre 3.5 et 8.0 kb soient récupérés. Le DNA en solution dans du T.B.E. est ensuite précipité par 3/7 de volume de NaCl 1 M puis 2 volumes d'éthanol à 95% à -20°C. Après centrifugation et remise en solution, une partie aliquote est soumise à une électrophorèse en gel d'agarose pour déterminer les tailles des fragments récupérés et la quantité de DNA ainsi obtenu.

7- Méthodes de transfert du DNA.

I. Transformation.

Protocole utilisé pour *E. coli*.

100 ml d'une culture d'*E. coli* incubée à 30°C en milieu LB agité jusqu'à une densité optique de 0.6 sont placés 15 min. dans la glace puis centrifugés à 7000 g pendant 10 min. à 0°C. Les cellules sont doucement remises en suspension dans 50 ml de CaCl₂ 0.1 M glacé. La suspension est laissée ainsi 30 min. à 0°C dans la glace avant d'être de nouveau centrifugée à 7000 g pendant 5 min à 0°C. Le culot est remis très doucement en suspension dans 5 ml de CaCl₂ 0.1 M glacé puis les bactéries sont transférées dans un tube 16/160 en verre et placées 3 heures à 0°C en homogénéisant de temps en temps.

Dans un tube en verre 16/160 placé à 0°C, on introduit 50 µl de la solution contenant le DNA à transférer (soit 10 à 500 ng de DNA dans 50 µl) et 100 µl de suspension cellulaire. L'ensemble est incubé 30 minutes à 0°C puis placé rapidement au bain-marie à 42°C pendant 2 min avant d'être de nouveau transféré 10 min dans la glace. Les bactéries sont ensuite diluées au dixième en ajoutant du milieu LB préchauffé à 37°C. La suspension est ensuite incubée pendant 120 min à 37°C sans agitation avant d'être diluée et étalée sur milieux sélectifs.

II. Conjugaison.

La méthode utilisée est celle employée par Shoemaker et coll. (75, 76)

Le protocole est le même pour *E. coli* et *Bacteroides*. Les plasmides à transférer ne sont pas conjugatifs; on utilise donc 3 souches différentes, l'une possédant le plasmide à transférer, une autre possédant un plasmide conjugatif capable de mobiliser le premier, et une souche réceptrice. Chaque bactérie est cultivée sur milieu nutritif jusqu'à l'obtention d'une DO de 0.6 à 600 nm.

Dans un tube à hémolyse stérile, on introduit 1 ml de chacune des cultures; l'ensemble est centrifugé à 5000 g pendant 10 min et le culot est repris par 100 µl de milieu liquide.

Après remise en suspension, le mélange est déposé sur un filtre Millipore stérile de 0.22 µm préalablement placé sur une boîte de Petri contenant du LB gélosé. Après 12 à 18 heures d'incubation à 37°C en aérobiose, les bactéries sont remises en suspension dans un milieu nutritif avant d'être diluées et étalées sur milieux sélectifs.

8- Utilisation des enzymes.

I. Enzymes de restriction.

Toutes les enzymes de restriction sont utilisées conformément aux indications décrites par les fournisseurs.

II. Ligase.

La ligase est utilisée à température ambiante à raison de 1 unité par μg de DNA selon les indications de King et coll. (37).

III. Phosphatase alcaline.

1 μg de DNA plasmidique est dissous dans 100 μl de T50 EO.1 pH 8.0. On ajoute 1 unité de phosphatase alcaline à la solution qui est incubée pendant 4 heures à 37°C. L'enzyme est ensuite inactivée par l'adjonction de 10 μl d'EGTA 50 mM pH 8.0 et chauffage à 65°C pendant 10 min. Le DNA déphosphorylé est alors déprotéinisé par 2 fois 1 volume de Phénol/Chloroforme (1/1 v/v) puis par 2 fois 1 volume de Chloroforme/Alcool isoamylique (24/1 p/v) avant d'être précipité à l'éthanol/NaCl.

IV. Nucléase S1.

L'enzyme utilisée est à la concentration de 300 unités par μl ; elle est donc diluée au 5/6000 dans le tampon CH_3COONa 75 mM, NaCl 150 mM, ZnSO_4 0.15 mM pH 4.5 pour atteindre une concentration finale de 0.25 unité par μl . A 80 μl de solution contenant 5 μg de DNA on ajoute 20 μl de la dilution d'enzyme préalablement préparée. Après 30 minutes d'incubation à 37°C la réaction est stoppée par l'adjonction de 20 μl de Tris-HCl 1M pH 8.0. Le DNA est ensuite déprotéinisé au phénol/chloroforme puis précipité à l'éthanol/NaCl.

-RESULTATS-
ET
-DISCUSSIONS-

Au début de 1985, les travaux du laboratoire consistaient en une étude systématique des plasmides de *Bacteroides* et la recherche d'une corrélation entre contenu plasmidique et résistance aux antibiotiques. Une relation semblait exister entre résistance à la carbénicilline et la présence de petits plasmides de 2.7 kb environ. Mais malheureusement, la mise en évidence de plasmides portant des caractères marqueurs était difficile puisque les possibilités de transfert de ceux-ci vers des souches sensibles étaient quasiment impossibles. Il n'existait pas en effet de systèmes génétiques permettant le transfert de fragments de DNA et de plasmides vers *Bacteroides*. Néanmoins, C. J. Smith (85) avait développé une technique de transformation de *Bacteroides* au polyéthylène-glycol mais cette méthode était limitée à de petits plasmides et à un nombre réduit de souches réceptrices.

Il était donc nécessaire de développer des vecteurs de clonage permettant d'analyser et d'étudier le DNA de *Bacteroides*.

1 REALISATION DE pKBF367-1.

I Généralités.

Le vecteur à réaliser devait présenter les caractéristiques suivantes:

- Posséder les gènes permettant sa répllication chez *E. coli* et chez *Bacteroides*. En effet, il semblait plus logique de construire un vecteur navette; toutes les techniques de clonage pouvant ainsi être réalisées chez *E. coli*; le vecteur étant par la suite retransféré vers *Bacteroides*.
- Le plasmide devait posséder un grand nombre de sites uniques de coupure par des enzymes de restriction, être de petite taille tout en étant transmissible par conjugaison.

A- Choix du plasmide originaire de *Bacteroides*.

Bacteroides possède de nombreux plasmides. Il semblait judicieux de choisir une molécule de DNA plasmidique largement représentée ce qui ne pouvait que garantir le maintien et la stabilité du futur vecteur. De plus, cette molécule devait être de petite taille, être coupée par des enzymes de restriction ne reconnaissant pas les gènes nécessaires à sa répllication.

Sur les 70 souches dont nous disposons, 21 soit 30 % possèdent un ou plusieurs plasmides cryptiques. Nous avons choisi une molécule de 4.4 kb originaire de *B. fragilis* 367. Ce plasmide, nommé pBF367, coupé en deux points par *BstEII*, semble être présent dans 6 souches différentes au moins, exister en un nombre de copies assez important. *B. fragilis* 367 possède un seul plasmide, son extraction et sa digestion n'en sont que plus aisées.

B- Choix du plasmide originaire de *E. coli*.

Parmi les nombreux vecteurs d'*E. coli* utilisables, nous avons choisi pKC7 (64). pKC7 est un plasmide dérivé de pBR322 auquel on a ajouté le fragment *HindIII*-*BamHI* du transposon Tn5. Le vecteur obtenu mesure 5.9 kb, il est amplifiable au chloramphénicol, transférable par mobilisation par le pRK2013, porte les gènes de résistance à l'ampicilline et à la kanamycine, il est coupé en un point par *BstEII* (voir figure 13).

C- Choix des caractères marqueurs s'exprimant chez *Bacteroides*.

Les seuls caractères marqueurs connus codent pour la résistance à la clindamycine/érythromycine, ils sont situés sur des fragments *EcoRI* de pBFTM10, pBF4 et pBI136. Nous avons choisi d'insérer le fragment *EcoRI*-B de pBFTM10; en effet, ce plasmide est connu avec précision, pBFTM10 est le plasmide le plus petit des trois donc le plus facile à extraire et donnant le moins de fragments par *EcoRI*.

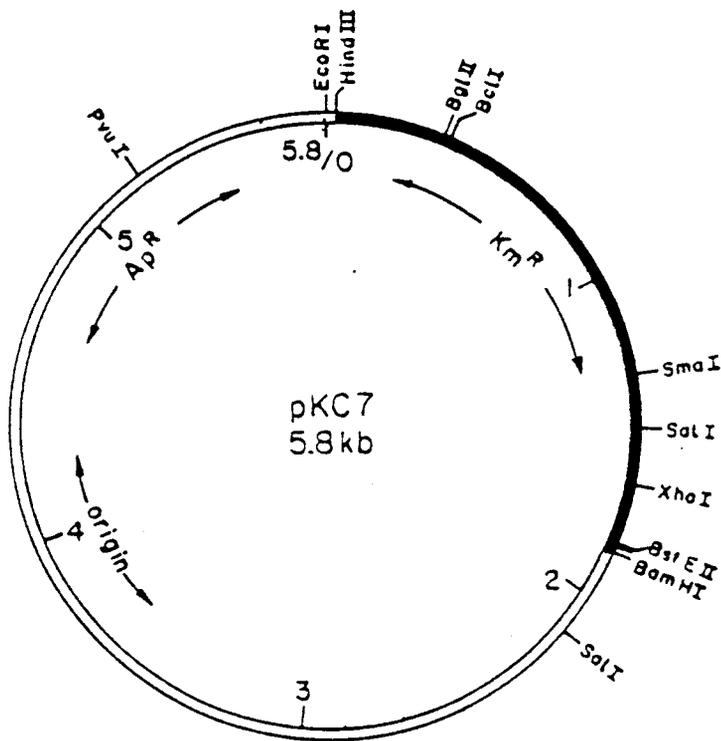


Figure 13: Carte de restriction de pKC7 (64).

█ = Segment de 1,8 kb du Tn5.

▭ = pBR322.

II Construction.

A- 1^{ere} Etape: Insertion de pBF367 au site *BstEII* de pKC7.

pKC7 a été extrait à partir d'une souche d'*E. coli* HB101 après amplification au chloramphénicol. Le plasmide est obtenu par la méthode de Ish-Horowicz et Burke, puis purifié par ultracentrifugation en gradient de CsCl selon le protocole décrit page 79.

pBF367 a été extrait avec la même méthode; néanmoins, après action de l'isopropanol, un précipité insoluble persistait; c'est pourquoi nous avons par la suite effectué une déprotéinisation supplémentaire au phénol puis au phénol/chloroforme-alcool isoamylique selon les indications données en page 80.

Les deux plasmides ont été digérés par *BstEII* (pBF367 étant digéré partiellement) puis pKC7 a ensuite été traité à la phosphatase alcaline et déprotéinisé. La ligature a été réalisée avec une quantité en pBF367 4 fois supérieure à celle de pKC7. Le produit de la ligature a ensuite été utilisé pour transformer *E. coli* HB101 selon la méthode décrite page 85. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu de Luria gélosé contenant 50 µg/ml de kanamycine.

pBF367 ne possède pas de caractères marqueurs permettant sa mise en évidence. Les clones obtenus ont donc été analysés par lyse directe sur gel d'agarose selon la méthode d'Eckhardt décrite page 82. Le DNA plasmidique des clones possédant des plasmides plus lourds que pKC7 a été extrait; les plasmides ont ensuite été digérés par *BstEII* puis les produits de digestion obtenus ont été comparés par électrophorèse aux témoins pKC7 et pBF367 linéarisés. Ce qui nous a permis de sélectionner un clone possédant un plasmide hybride pBF367/pKC7 noté pKBF367.

Remarque: *BstEII* reconnaît une séquence hexanucléotidique GGTNACC renfermant un nucléotide quelconque; il y avait

donc potentiellement une chance sur quatre pour que l'appariement des deux séquences soit possible.

B- 2^{ème} Etape: Insertion du caractère marqueur.

Le fragment *EcoRI*-B de pBFTM10 possède un gène de résistance à la tétracycline qui s'exprime en aérobiose chez *E. coli* ce qui nous permet de sélectionner facilement les transformants ayant reçu ce fragment.

Le plasmide hybride et pBFTM10 ont été extraits comme précédemment puis digérés totalement par *EcoRI*. pBF367/pKC7 a ensuite été déphosphorylé puis, les produits de digestion obtenus ont été déprotéinés et ligaturés. Après transformation d'*E. coli* HB101, les bactéries ont été ensemencées sur milieux sélectifs contenant 20 µg/ml d'Ap, 50 µg/ml de Km et 10 µg/ml de Tc. Les clones Ap^rTc^rKm^r obtenus ont été analysés par lyse directe en présence de témoins de poids moléculaire connu.

C- 3^{ème} Etape: Analyse des plasmides des transformants.

Le plasmide hybride attendu devait faire 14.7 kb environ. Le DNA plasmidique des clones suspects a été extrait par la méthode de Grosveld selon le protocole indiqué page 76 puis digéré par *AvaI*, *DdeI* et *HindIII*. Les profils de digestion obtenus ainsi que le schéma de la construction du vecteur sont représentés en figure 14. L'analyse des profils de digestion nous a permis de mettre en évidence deux types de plasmides hybrides notés pKBF367-1 et pKBF367-2 différant par l'orientation du fragment *EcoRI*-B

D- Propriétés attendues.

Le vecteur ainsi construit mesure 14.7 kb, possède les résistances à l'ampicilline, la kanamycine et la tétracycline qui s'expriment chez *E. coli* ainsi que la résistance à la clindamycine/érythromycine qui s'exprime chez *Bacteroides*. Tout comme pKC7, ce vecteur devait être mobilisable par pRK2013. Par contre, il était possible que les gènes nécessaires à la répllication chez *Bacteroides* soient situés au niveau du site *BstEII*. D'après Shoemaker

et coll. (77), des plasmides cryptiques comme pB8-51 peuvent être mobilisés par des plasmides conjugatifs du groupe d'incompatibilité P comme R751; il était donc vraisemblable que notre vecteur, grâce à l'existence de pBF367, soit également mobilisable par ce même plasmide.

III Transfert de pKBF367-1 et -2 par conjugaison.

A Transfert vers *E. coli*.

La souche réceptrice utilisée était *E. coli* W3350 Nal^r. Nous avons utilisé deux plasmides mobilisateurs potentiels: pRK2013 possédé par une souche d'*E. coli* HB101 et R751 présent dans une souche d'*E. coli* LE392. La conjugaison a été réalisée conformément au protocole décrit page 85.

Les transconjugants issus du croisement HB101(pKBF367-1)/HB101(pRK2013)/W3350 et du croisement HB101(pKBF367-1)/LE392(R751)/W3350 ont été sélectionnés sur milieu de Luria contenant 10 µg/ml de Tc et 100 µg/ml de Nal; les bactéries réceptrices ont été dénombrées sur Luria avec 100 µg/ml de Nal, les souches donatrices ont été sélectionnées sur luria contenant 20 µg/ml d'Ap et 10 µg/ml de Tc.

Les résultats sont réunis dans le tableau 8. La fréquence de conjugaison est définie comme étant le nombre de transconjugants divisé par le nombre de bactéries réceptrices. Les deux plasmides hybrides pKBF367-1 et pKBF367-2 sont mobilisés à la même fréquence aussi bien avec R751 et pRK2013.

Tout comme pB8-51, pBF367 est donc mobilisable par des plasmides du groupe d'incompatibilité P; la coupure au niveau du site *BstEII* ne gênant absolument pas les propriétés de transfert.

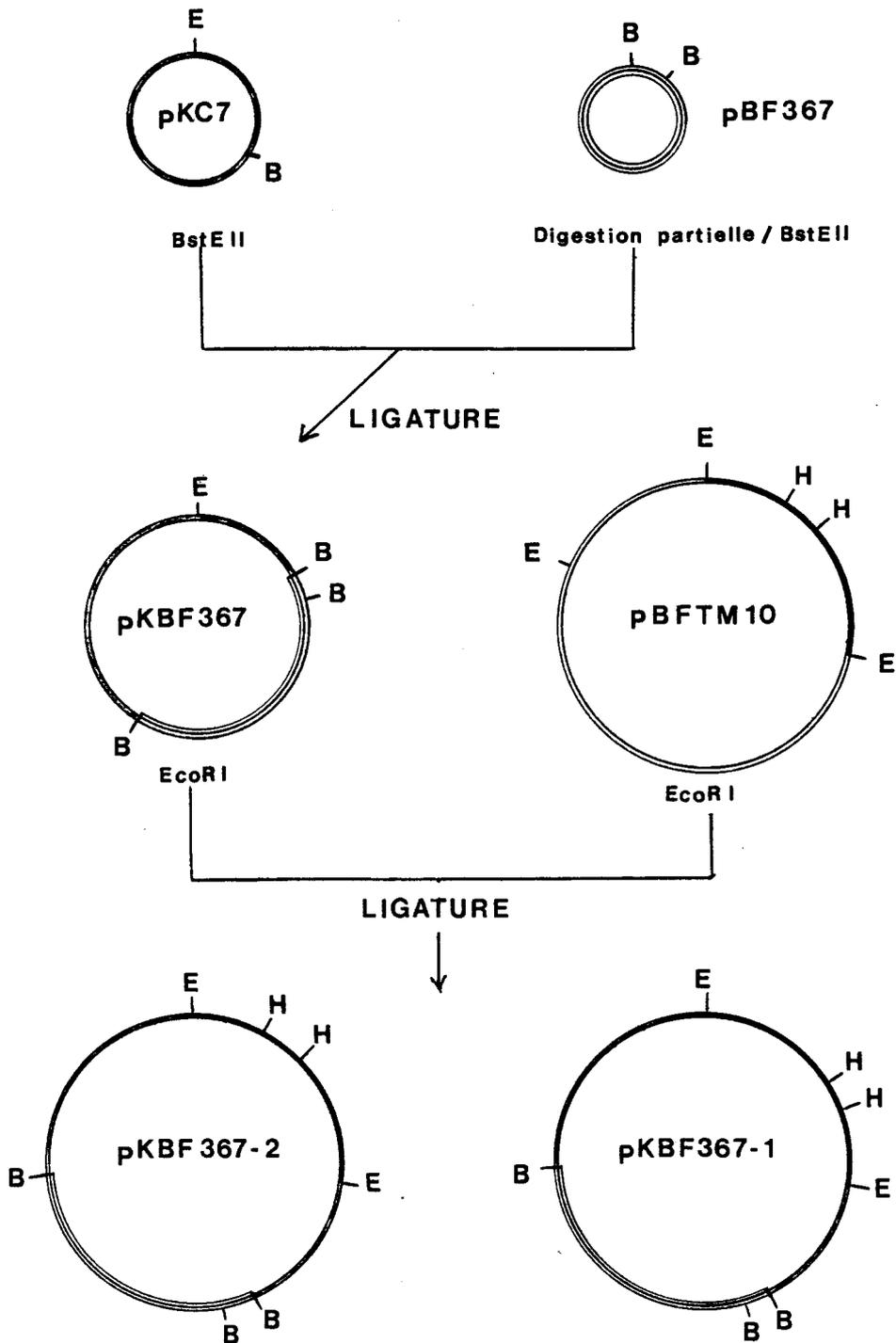


Figure 14: Schéma montrant la construction de pKBF367-1 et pKBF367-2.

B= *BstEII*, E= *EcoRI*, H= *HindIII*,

Souches réceptrices.			<i>E. coli</i>	<i>B. fragilis</i>	
			W3350	367 Tcr Rifr	638 Rifr
HB101 (pKBF367-1)	HB101	Tjt	10 ⁵	0	0
	(pRK2013)	Don	10.7*10 ⁷	9.0*10 ⁷	10.4*10 ⁷
		Rec	17.2*10 ⁷	7.2*10 ⁷	9.3*10 ⁷
		F	#10 ⁻²	0	0
HB101 (pKBF367-1)	LE392	Tjt	10 ⁵	0	0
	(R751)	Don	11.2*10 ⁷	10.3*10 ⁷	9.2*10 ⁷
		Rec	12.0*10 ⁷	8.4*10 ⁷	7.2*10 ⁷
		F	#10 ⁻²	0	0
HB101 (pKBF367-2)	HB101	Tjt	10 ⁵	0	0
	(pRK2013)	Don	10.0*10 ⁷	9.5*10 ⁷	8.3*10 ⁷
		Rec	16.0*10 ⁷	7.5*10 ⁷	7.8*10 ⁷
		F	#10 ⁻²	0	0
HB101 (pKBF367-2)	LE392	Tjt	10 ⁵	0	0
	(R751)	Don	13.2*10 ⁷	8.9*10 ⁷	10.3*10 ⁷
		Rec	11.1*10 ⁷	8.1*10 ⁷	9.1*10 ⁷
		F	#10 ⁻²	0	0

Tableau 8: Résultats des conjugaisons de HB101(pKBF367-1).

HB101(pKBF367-2) vers *E. coli* W3350, *B. fragilis* 638, 367 en utilisant les souches mobilisatrices HB101(pRK2013) et HB101(R751).

Les transconjugants *E. coli* sont sélectionnés sur Luria Tc10 et Nal100. Les transconjugants *B. fragilis* 367 et 638 sont sélectionnés sur BHI Cl10 et Nal100.

Les souches donatrices sont dénombrées sur Luria Tc10 et Ap100.

Les souches mobilisatrices HB101(pRK2013) et HB101(R751) sont sélectionnées respectivement sur Luria Km50 et Luria Tp100.

La fréquence de transfert F est calculée comme étant le nombre de transconjugants divisé par le nombre de bactéries réceptrices.

B Transfert vers *Bacteroides*.

Deux souches réceptrices ont été utilisées: *B. fragilis* 367 Rifr Tcr qui est la souche dont est originaire pBF367, et *B. fragilis* 638 Rifr qui est la souche réceptrice utilisée avec succès par Guiney et coll. (28) pour transférer pDP1.

Les deux plasmides mobilisateurs pRK2013 et R751 ont été utilisés. Les croisements ont été réalisés en aérobiose selon le protocole décrit page 85.

Les transconjugants dérivés de *B. fragilis* 367 ont été sélectionnés sur BHI gélosé contenant 10 µg/ml de Tc et 10 µg/ml de Cli.

Les transconjugants issus de Bf.638 ont été sélectionnés sur BHI renfermant 100 µg/ml de Nal et 10 µg/ml de Cli.

Dans les deux cas, les bactéries réceptrices ont été dénombrées en anaérobiose sur BHI contenant 100 µg/ml de Nal, et les souches donatrices ont été numérées en aérobiose, sur Luria gélosé possédant 10 µg/ml de Tc.

Les résultats sont réunis dans le tableau 1 et montrent que: *Bacteroides* résiste parfaitement bien à l'incubation sur filtre en aérobiose puisqu'au bout de 18 heures le nombre de bactéries réceptrice est de 70×10^7 /ml environ. Aucun transconjugant n'est mis en évidence et ceci quel que soit le plasmide hybride, le plasmide mobilisateur, la souche réceptrice ou le milieu de sélection utilisé. Ces résultats pouvaient avoir trois explications:

1- L'insertion au niveau du site *BstEII* avait inactivé les gènes nécessaires à la répllication chez *Bacteroides*.

2- Les souches réceptrices utilisées étant toutes restriction +; il est possible qu'aucune d'entre elles ne puisse permettre de mettre en évidence le transfert du plasmide hybride à une fréquence décelable.

3- Le protocole utilisé pour la conjugaison devait être amélioré, en augmentant notamment le temps de contact des bactéries entre elles.

C'est les raisons pour lesquelles nous avons construit un plasmide hybride témoin pKC7/pBFTM10. En effet pBFTM10 est coupé en un point par *BstEII*, il est transférable par mobilisation avec R751 (77). De plus, les gènes nécessaires à sa répllication sont très éloignés du site *BstEII*.

2 REALISATION DE pKC7-pBFTM10.

I Construction.

2 µg de pKC7 et de pBFTM10 préalablement extraits par la méthode d'Ish-Horowicz et Burke ont été digérés par *BstEII* puis déprotéinisés. Les plasmides linéarisés ont ensuite été ligaturés, puis introduits dans *E. coli* HB101 par transformation. Les bactéries ont ensuite été étalées sur milieu de Luria gélosé contenant 50 µg/ml d'Ap et 10 µg/ml de Tc (marqueur possédé par pBFTM10).

Le DNA des colonies Ap^r et Tc^r a ensuite été analysé par lyse directe sur gel d'agarose. Tous les clones analysés possédaient un plasmide de 20 kb environ correspondant à la taille attendue du vecteur navette. (Fig 15 et 17)

Le DNA plasmidique de deux clones a été extrait par la méthode de Grosveld (27) puis digéré par *HindIII* et *AvaI* avant de subir une électrophorèse. Les résultats représentés figures 15 et 16 montrent qu'il s'agit bien, dans les deux cas, de plasmides hybrides pKC7/pBFTM10; pBFTM10 étant inséré dans pKC7 dans les deux orientations.

II Transfert de pKC7/pBFTM10 par conjugaison.

Comme précédemment, les souches réceptrices utilisées ont été *E. coli* W3350, *B. fragilis* 367 et 638. Les souches contenant le plasmide mobilisateur étant *E. coli* LE392(R751) et *E. coli* HB101(pRK2013). La conjugaison a été réalisée selon le protocole décrit page 85.

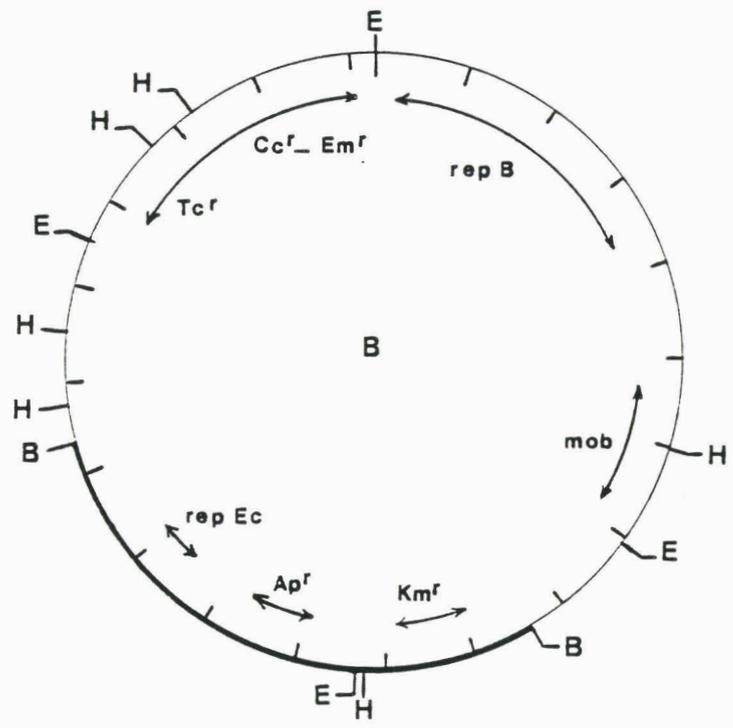
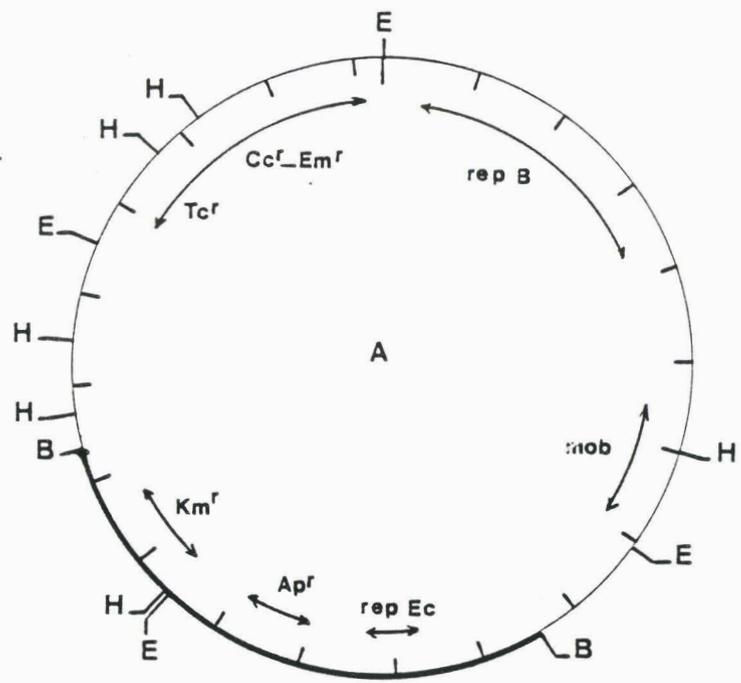


Figure 15: Cartes de restriction de pKC7/pBFTM10-1: A et pKC7/pBFTM10-2: B.

——— Partie correspondant à pKC7.

- Rep Ec = Gènes nécessaires à la répliation chez *E. coli*.
- Ap^r = Gènes de résistance à l'ampicilline.
- Km^r = gènes de résistance à la kanamycine.

——— Partie correspondant à pBFTM10.

- Mob = Région permettant la mobilisation par R751.
- Rep B. = Région nécessaire à la répliation chez *Bacteroides*.
- Cc^r-Em^r = Gène codant pour la résistance à la clindamycine/érythromycine.
- Tc^r = Gène codant pour la résistance à la tetracycline en aérobiose.
- H = *Hind*III, E = *Eco*RI, B = *Bst*EII.

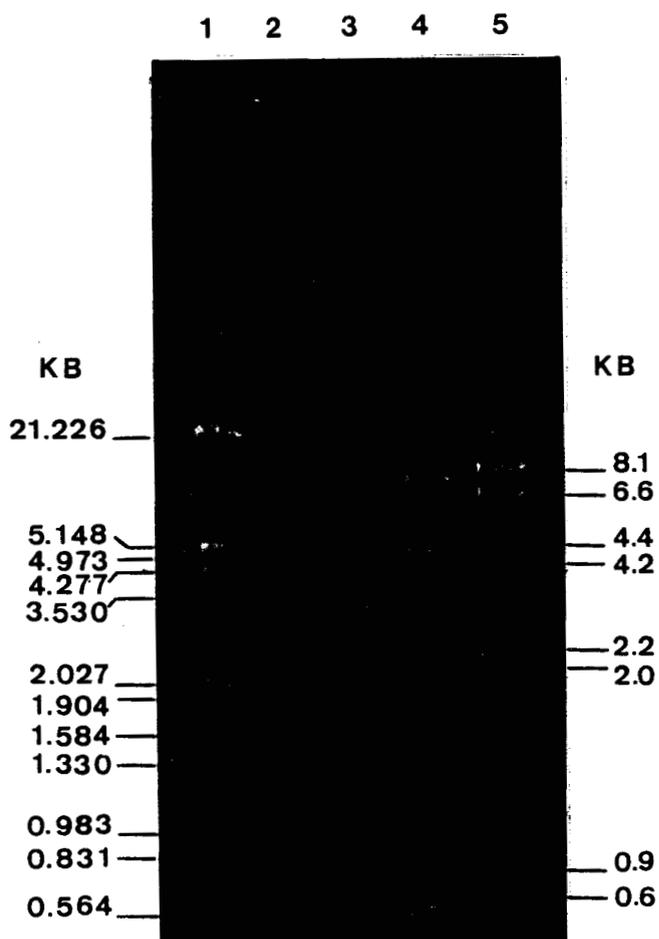


Figure 16: Profils de digestion de pKC7/pBFTM10-1 et -2 par *HindIII*.

- 1: DNA de phage lambda digéré par *EcoRI* et *HindIII*.
- 2: pBFTM10 digéré par *HindIII*.
- 3: pKC7 digéré par *HindIII*.
- 4: pKC7/pBFTM10-2 digéré par *HindIII*.
- 5: pKC7/pBFTM10-1 digéré par *HindIII*.

Les transconjugants d'*E. coli* ont été sélectionnés en aérobiose sur milieu de Luria gélosé contenant Tc et Nal (W3350 est Nal^r).

Les transconjugants *Bacteroides* ont été sélectionnés sur BHI contenant Cli/Nal pour *B. fragilis* 638 et Cli/Tc pour *B. fragilis* 367 (la clindamycine ne permettant pas de contre-sélectionner *E. coli* à elle seule).

Les transconjugants *E.coli*(pKC7/pBFTM10) sont apparus au bout de 24 heures d'incubation à la fréquence de 10⁻² environ.

Après 96 heures d'incubation en anaérobiose, aucun transconjugant *B.fragilis* 638, et 367 n'est apparu sur milieu sélectif.

Il était donc nécessaire de rechercher dans la collection dont nous disposons les souches de *Bacteroides* les plus aptes à recevoir les vecteurs navettes qui avaient été construits.

3- Recherche des souches réceptrices acceptant le vecteur.

Toutes les souches de *Bacteroides* de la collection (Tableau 6) dont nous disposons ont été utilisées à l'exception de Bf 638(pBFTM10) et ATCC19189 et des souches naturellement résistantes à la clindamycine. Le plasmide à transférer utilisé était pKC7/pBFTM10 puisque nous étions sûrs qu'il pouvait se répliquer chez *Bacteroides* et qu'il était mobilisable par pRK2013 et R751. *Bacteroides* est naturellement résistant à l'acide nalidixique; c'est donc cet antibiotique qui à chaque fois a été utilisé pour contre-sélectionner *E. coli*. Les transconjugants ont été sélectionnés sur BHI gélosé contenant de la clindamycine et de l'acide nalidixique aux concentrations de 10 et 100 µg/ml respectivement. Les temps de contact sur filtre Millipore ont été portés à 24 heures; à chaque fois, des numérations sur BHI + acide

nalidixique ont été réalisées afin d'estimer le degré de survie de *Bacteroides* en aérobiose.

Après 48 heures d'incubation, quelques colonies Cl^{r} Nal^{r} sont apparues aux dilutions 10^0 et 10^{-1} lorsque la souche de *B. distasonis* 419 était utilisée comme bactérie réceptrice et ceci aussi bien lorsque R751 et pRK2013 étaient employés comme plasmides mobilisateurs.

Aucune colonie Cl^{r} et Nal^{r} n'a été observée avec les autres souches de *Bacteroides*; pourtant, dans tous les cas, le degré de survie des bactéries réceptrices était important puisqu'aux dilutions de 10^{-6} environ 50 colonies Nal^{r} se développaient.

Ces résultats encourageants nous ont poussé à effectuer une deuxième expérience en utilisant seulement *B. distasonis* 419 comme souche réceptrice, les deux plasmides mobilisateurs et pKBF 367-1 et -2 ainsi que pKC7/pBFTM10-2 comme plasmides à transférer. Des transconjugants Nal^{r} , Cl^{r} sont apparus dans tous les cas; les résultats sont reportés dans le tableau 9.

Le DNA de quelques colonies a été extrait par la méthode de Ish-Horowicz, puis le contenu plasmidique a été analysé par électrophorèse et comparé aux témoins pKBF367-1, -2 et pKC7/pBFTM10-2. Les résultats partiels sont représentés sur la figure 20. L'interprétation est rendue difficile par le grand nombre de plasmides naturellement présents dans *B. distasonis* 419; néanmoins on distingue clairement, un plasmide hybride de la taille attendue.

Les plasmides introduits semblent n'avoir subi aucune modification. De plus, les plasmides indigènes de *B. distasonis* 419 restent présents dans les transconjugants; ils sont donc totalement compatibles avec les deux vecteurs introduits.

De toutes les souches testées, seule *B. distasonis* 419 a donné des transconjugants et ceci à une fréquence de 10^{-5} environ alors que la limite de détection se situe à 10^{-9} . Ces résultats sont donc au moins 10^4 fois

supérieurs à ceux obtenus avec les autres souches. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène.

1- Le vecteur transféré est originaire d'*E. coli*; toutes les souches testées proviennent d'isolats cliniques; il est donc possible que le degré de restriction vis-à-vis du plasmide introduit soit très important sauf en ce qui concerne *B. distasonis* 419.

2- *B. distasonis* 419 est résistante à la tétracycline or il est connu (79) que des éléments chromosomiques porteurs de la résistance à la tétracycline peuvent mobiliser de petits plasmides comme pBFTM10 (dont pKC7/pBFTM10 est issu). On aurait ainsi transfert par conjugaison d'*E. coli* vers *Bacteroides* à une fréquence à peine décelable puis transfert de *Bacteroides* vers *Bacteroides* à une fréquence plus forte et ainsi amplification du nombre de transconjugants. Mais il est à noter que d'autres souches de *Bacteroides* résistantes à la tétracycline ont été testées (*B. fragilis* 367 notamment) sans le moindre résultat.

Plasmide transféré	LE392(R751)	HB101(pRK2013)
pKBF367-1	$0.9 \cdot 10^{-5}$	$0.7 \cdot 10^{-5}$
pKBF367-2	$0.6 \cdot 10^{-5}$	$0.6 \cdot 10^{-5}$
pKC7/pBFTM10-2	$0.4 \cdot 10^{-5}$	$0.4 \cdot 10^{-5}$

Tableau 9: Fréquences de transfert de pKBF367-1 et pKC7/pBFTM10 vers Bd419. La sélection des transconjugants est réalisée avec 10µg/ml de clindamycine et 100µg/ml d'A. nalidixique.

Le taux de mutation spontanée de Bd 419 vis à de la clindamycine est inférieur à 10^{-9} .

4 Localisation de la région de pKBF367-1 mobilisée par R751.

R751 mobilise le vecteur à une fréquence de 10^{-2} chez *E. coli* et de 10^{-5} vers *B. distasonis* 419. La région permettant cette mobilisation peut être située sur pKC7, le fragment *EcoRI*-B de pBFTM10 ou sur pBF367.

Pour déterminer où se situait cette région, nous avons construit un troisième plasmide possédant uniquement le fragment *EcoRI*-B de pBFTM10 inséré au site *EcoRI* de pKC7. Ce plasmide nommé pKC71 pouvait ainsi se répliquer chez *E. coli* et exprimer la résistance à la tétracycline originaire de *Bacteroides*.

La carte de restriction de pKC71 est indiquée figure 18.

Nous avons ensuite essayé de transférer pKC7, pKC71, et pKBF367-1 vers *E. coli* W3350, par conjugaison, en utilisant R751. L'analyse des transconjugants indique que seul pKBF367-1 est mobilisé par R751 ce qui démontre que la mobilisation du vecteur est uniquement due à la présence de pBF367.

5. Réduction de la taille de pKBF367-1.

Toutes les manipulations suivantes ont été effectuées sur pKBF367-1 uniquement.

pKBF367-1 mesure 14.7kb alors que pDP1 et pE5-2 font respectivement 19 et 17 kb. Néanmoins il semblait possible de réduire très fortement la taille de pKBF367-1 tout en conservant l'essentiel de ses propriétés.

En effet, si l'on regarde la carte de restriction de pKBF367-1 de la figure 18, on constate que:

1- La région délimitée par les sites *NdeI*-*BamHI* n'est pas indispensable.

2- L'intégralité du fragment *EcoRI*-B de pBFTM10 n'est pas nécessaire. En effet il est tout à fait possible de retirer la région codant pour la résistance à la tétracycline en aérobiose sans nuire à l'expression de la

résistance à la clindamycine/érythromycine chez *Bacteroides*. Le vecteur ainsi construit garderait la résistance à la kanamycine permettant d'assurer sa sélection chez *E. coli*.

I Réalisation des dérivés de délétion.

A- 1^{ère} Etape. Délétion *NdeI*-*BamHI*.

pKBF367-1 est coupé en un seul point par *NdeI*; ce site est situé juste après l'origine de réplication du pBR322 (3). Sur pKC7, le site *BamHI* est localisé juste après celui reconnu par *BstEII* (4) (figure 13). La délétion *NdeI*-*BamHI* permettait de réduire pKBF367-1 de 1.9kb. Néanmoins, les sites de restriction de ces deux enzymes sont incompatibles; c'est la raison pour laquelle, après digestion par *NdeI* et *BamHI*, nous avons réalisé un traitement à la nucléase S1. La nucléase S1 possède en effet une activité exonucléasique sur le DNA monocaténaire; transformant ainsi les extrémités incompatibles en extrémités franches qu'il est possible de ligaturer.

pKBF367-1 a été traité à la nucléase S1 conformément au protocole décrit page 86; après ligature et transformation de HB101, quelques clones Ap^r et Tc^r ont été analysés en lyse directe. 10 clones ayant une taille plus faible que le témoin pKBF367-1 ont été extraits par la méthode de Grosveld puis soumis à une digestion par *BstEII*.

En effet, la nucléase S1 possède également une activité exonucléasique sur le DNA double brin; il était donc indispensable de vérifier que cette enzyme n'avait pas coupé plus loin que les sites *NdeI* et *BamHI*.

Le vecteur ainsi construit se réplique chez *E. coli* alors que le réplicon est très proche du site *NdeI*, il est digéré en 3 points par *BstEII* en donnant des fragments de la taille attendue alors que le site *BstEII* est situé 60 nucléotides plus loin que le site *BamHI*; ces résultats indiquent que pBF367-11 est exactement conforme au vecteur désiré.

La carte de restriction de pKBF367-11 est indiquée figure 18.

B- 2^{ème} Etape: Délétion par *ScaI*.

pKBF367-11 est coupé en deux points par *ScaI*; un site est localisé au niveau des gènes de résistance à l'ampicilline, l'autre est situé dans le fragment *EcoRI*-B de pBFTM10, entre les gènes de résistance à la tétracycline et ceux codant pour la résistance à la clindamycine. La digestion par *ScaI* n'altère pas l'expression de la résistance à la clindamycine. En effet, si l'on analyse la séquence du gène *ermF* de pBF4 (fig 7) qui possède 90% d'homologie avec pBFTM10, aucun site *ScaI* n'est présent. L'enzyme coupe donc vraisemblablement le fragment après l'acide aminé C-terminal.

Après digestion par *ScaI*, ligature et transformation, nous avons obtenu des clones Km^r possédant un plasmide de 12.8 kb nommé pKBF367-12. Ce plasmide possède l'essentiel des propriétés de pKBF367-1; en effet, il est mobilisable par R751 et pRK2013, il se réplique toujours dans les 2 genres bactériens puisque les 2 réplicons sont toujours intacts, confère la résistance à la kanamycine chez *E. coli* et à la clindamycine/érythromycine chez *Bacteroides*. La carte de restriction de pKBF367-12 est représentée figure 18.

C- 3^{ème} Etape: Déletion par *Hind*III.

Rasmussen et coll. (65) ont mis en évidence que le gène *ermF* était transcrit à partir d'un promoteur situé 230 nucléotides en amont, dans la séquence d'insertion IS4351.

pKBF367-1 a été construit à partir du fragment *Eco*RI-B de pBFTM10; ce fragment possède 400 nucléotides de plus que le fragment *Eco*RI-B de pBF4, 200 paires de bases supplémentaires étant situées entre la séquence IS4400 et le gène *ermF* (Figure5). Il était donc possible qu'un promoteur permettant l'expression de la résistance à la clindamycine soit situé dans cette région supplémentaire. A partir du vecteur pKBF367-12 nous avons réalisé une digestion partielle par *Hind*III; après ligature et transformation d'*E. coli* HB101, les colonies *Km^r* ont été sélectionnés. L'extraction du DNA plasmidique de quelques clones par la méthode de Grosveld et la digestion des plasmides obtenus par *Hind*III nous a permis de sélectionner un dérivé de délétion de pKBF367-12 de 9.3kb nommé pKBF367-13.

II Réalisation des cartes de restriction des différents vecteurs.

Tous ces plasmides ont été extraits par la méthode de Ish-Horowicz et Burke, puis digérés par différentes enzymes de restriction.

Les profils de digestion sont représentés en figure 17. L'analyse des fragments de restriction obtenus nous a permis de réaliser les cartes de restriction de la figure 18.

III Transfert des vecteurs réalisés.

A- Transfert vers *E. coli*.

Les vecteurs qui ont été transférés sont respectivement: pKBF367-1, pKBF367-11, pKBF367-12 et pKBF367-13; ils

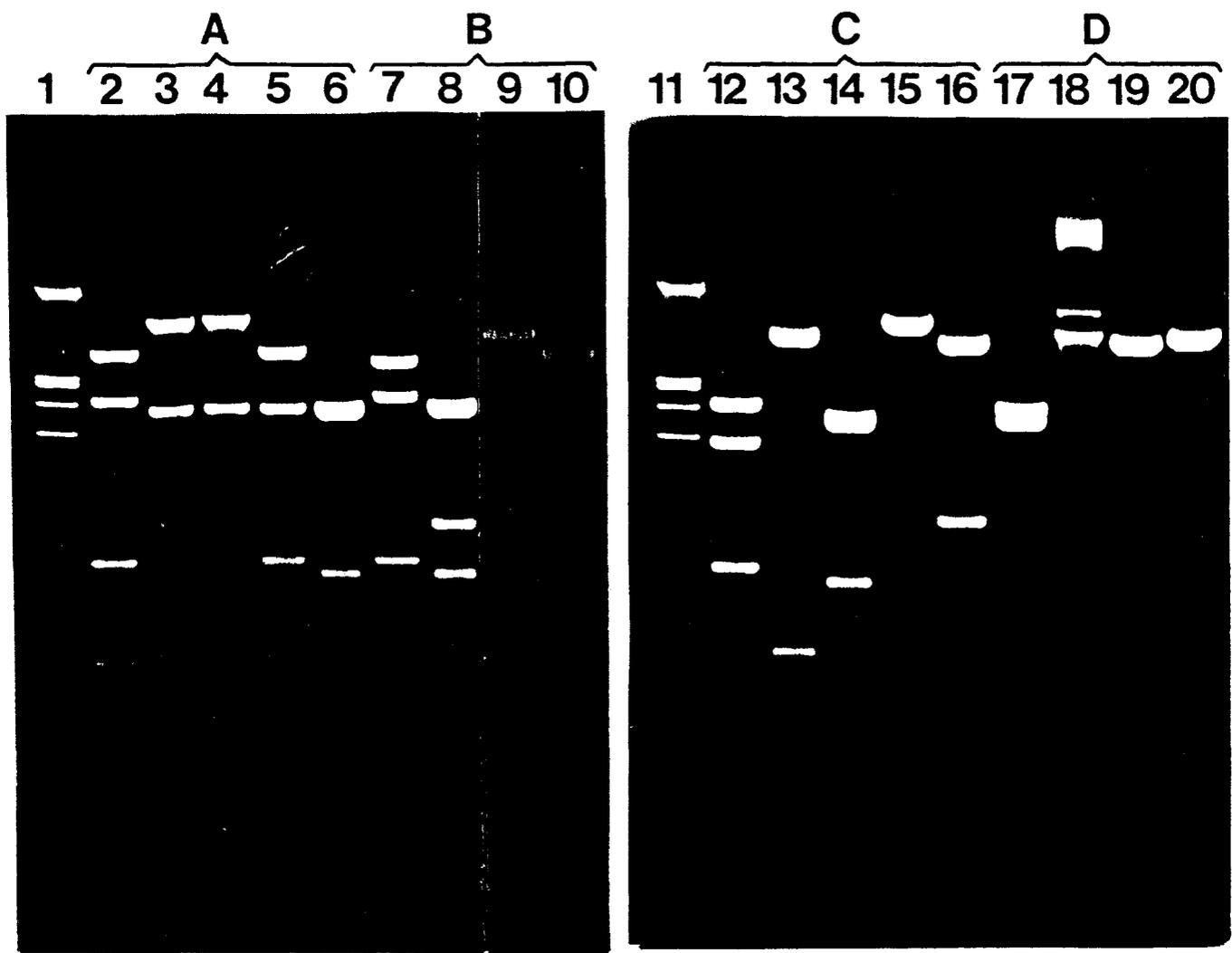


Figure 17: Profil de digestion des dérivés de délétion.
 1 et 11: DNA de phage lambda digéré par *HindIII* et *EcoRI*.
 A: pKBF367-1 digéré avec: 2, *AvaI*; 3, *BstEII*; 4, *EcoRI*; 5, *AvaI* + *BstEII*; *EcoRI* + *BstEII*.
 B: pKBF367-11 digéré avec: 7, *AvaI*; 8, *EcoRI* + *BstEII*, 9, *ScaI*; 10, *EcoRI* + *ScaI*.
 C: pKBF367-12 digéré avec: 12, *AvaI*; 13, *HindIII*; 14, *EcoRI* + *BstEII*; 15, *ScaI*; 16, *EcoRI* + *ScaI*.
 D: pKBF367-13 digéré avec: 17, *AvaI*; 18, *EcoRI*; 19, *HindIII*; 20, *ScaI*.

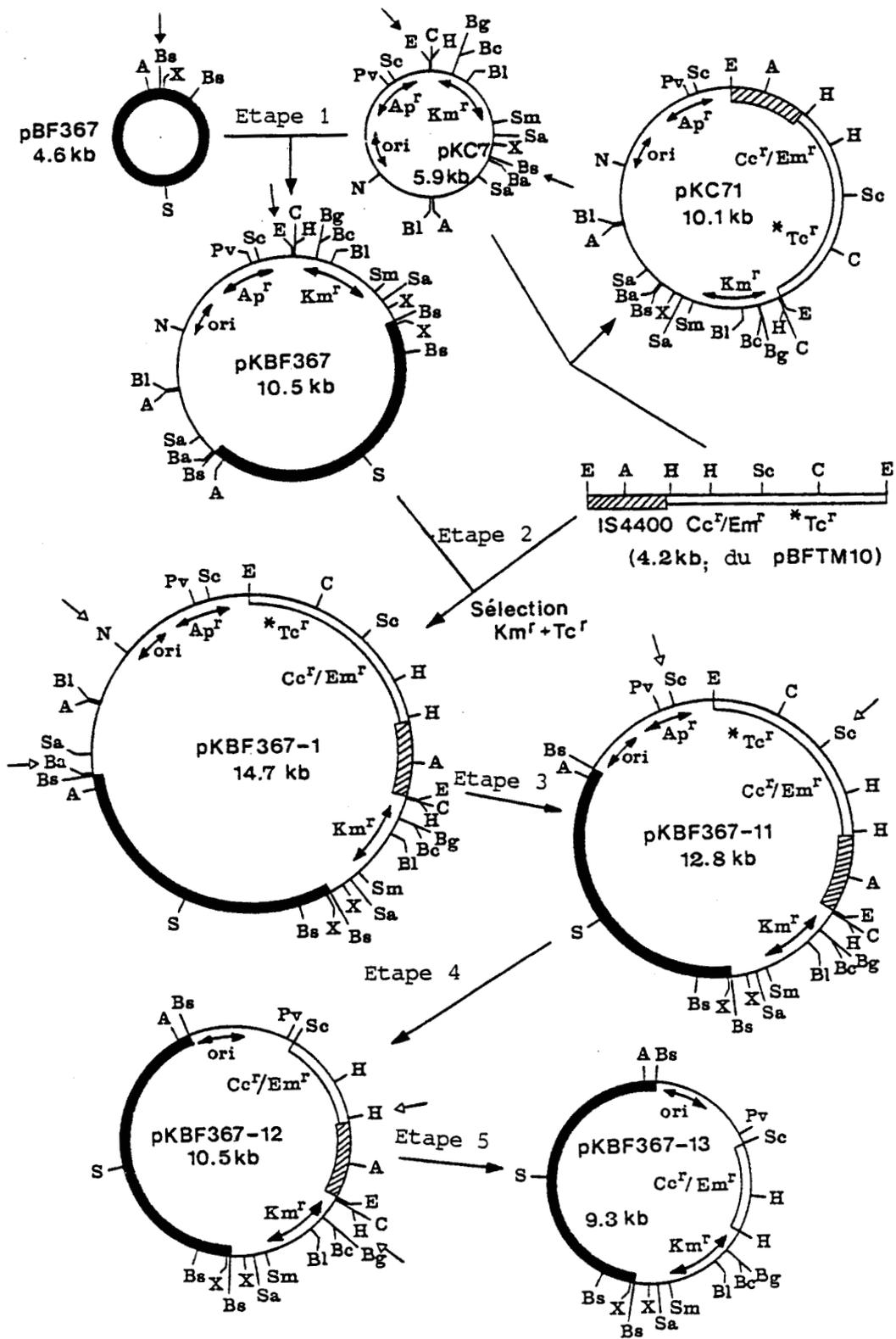


Figure 18: Schéma de la construction de pKBF367, pKBF367-11, pKBF367-12, pKBF367-13 et pKC71.

étaient tous contenus dans *E. coli* HB101. Nous avons employé également pKC7 et pKC71 qui nous ont servi de témoins de conjugaison. Les deux plasmides mobilisateurs R751 et pRK2013 respectivement portés par *E. coli* LE392 et *E. coli* HB101 ont été utilisés. Dans tous les cas la souche réceptrice était *E. coli* W3350. Afin de pouvoir comparer les différentes fréquences de conjugaison, avant d'être placées sur filtre, toutes les souches étaient préalablement cultivées sur Luria contenant 50 µg/ml de streptomycine jusqu'à une densité optique de 0.6 à 600nm.

Le résultats de ces conjugaisons sont indiqués dans le tableau 10.

Conformément aux résultats précédents, on constate que pKC7 et pKC71 ne sont pas mobilisés par R751.

Le seul marqueur phénotypique des vecteurs pKBF367-12 et pKBF367-13 s'exprimant chez *E. coli* est la résistance à la kanamycine. Cet antibiotique était inutilisable dans la sélection des transconjugants des croisements où pRK2013 était impliqué puisque ce plasmide confère également la résistance à cet antibiotique. Il nous était donc impossible d'estimer la fréquence de conjugaison de ces plasmides avec pRK2013.

Les résultats du tableau 10 indiquent également que la fréquence de transfert semble augmenter au fur et à mesure que la taille des vecteurs diminue; ainsi pKBF367-13 est transféré à une fréquence 20 fois plus forte que pKBF367-1 lorsque R751 est utilisé comme plasmide mobilisateur. Néanmoins, dans tous les cas cette fréquence est comprise entre 10^{-3} et 10^{-4} .

Les fréquences de transfert obtenus avec R751 et pRK2013 semblent comparables bien que pKBF367-1 soit mobilisé à une fréquence 10 fois plus grande avec pRK2013 qu'avec R751. Dans chaque cas, le DNA plasmidique a été analysé, les résultats montrent que tous les transconjugants possèdent un plasmide de la taille attendue (fig 19).

Plasmides transférés	HB101(pRK2013)	LE392(R751)
pKC7	9.8*10 ⁻³ Ap75+Nal100	<3.4*10 ⁻⁸ Ap75+Nal100
pKC71	7.5*10 ⁻⁴ Ap75+Nal100	<2.2*10 ⁻⁸ Ap75+Nal100
pKBF367-1	1.6*10 ⁻³ Tc10+Nal100	1.8*10 ⁻⁴ Tc10+Nal100
pKBF367-11	8.7*10 ⁻⁴ Tc10+Nal100	6.8*10 ⁻⁴ Tc10+Nal100
pKBF367-12	sélection impossible	3.0*10 ⁻³ Km100+Nal100
pKBF367-13	sélection impossible	4.3*10 ⁻³ Km100+Nal100

Tableau 10: Fréquences de transfert de pKC7, pKC71, pKBF367-1, pKBF367-11, pKBF367-12 et pKBF367-13 obtenus avec R751 et pRK2013. La souche réceptrice utilisée est *E. coli* W3350 Nal^r. Les antibiotiques employés pour la sélection des transconjugants sont indiqués entre parenthèses.

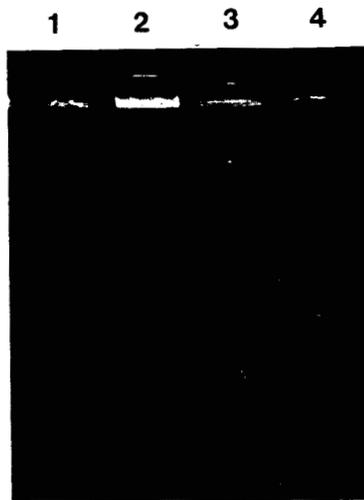


Figure 19 : Contenu plasmidique des transconjugants d'*E. coli* HB101.

1: pKBF367-1 14,7 kb.

2: pKBF367-11 12,8 kb.

3: pKBF367-12 10,5 kb.

4: pKBF367-13 9,3 kb.

Plasmides transférés	HB101(pRK2013)	LE392(R751)
pKBF367-1 14.7 kb	$8.6 \cdot 10^{-6}$	$1.2 \cdot 10^{-5}$
pKBF367-11 12.8 kb	$5.9 \cdot 10^{-6}$	$4.2 \cdot 10^{-5}$
pKBF367-12 10.5 kb	$1.4 \cdot 10^{-6}$	$2.2 \cdot 10^{-5}$
pKBF367-13 9.3 kb	$1.8 \cdot 10^{-6}$	$3.2 \cdot 10^{-5}$

Tableau 11: Fréquences de transfert vers *Bd419* de pKBF367-1, pKBF367-11, pKBF367-12, pKBF367-13, obtenues avec R751 et pRK2013. Les antibiotiques utilisés pour la sélection des transconjugants sont la tétracycline 10 µg/ml et la clindamycine 10µg/ml. La souche réceptrice est naturellement résistante à la tétracycline.

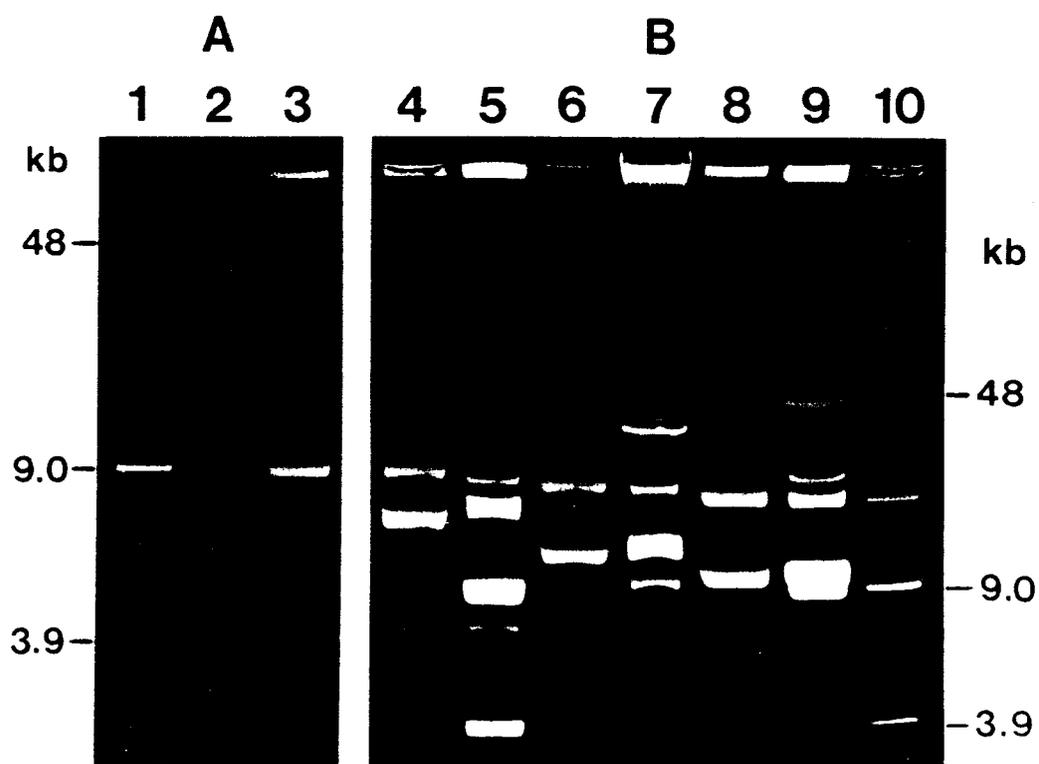


Figure 20: Contenu plasmidique des différents transconjugants de *Bacteroides distasonis* 419.

3: pKBF367-1; 5 pKBF367-11; 7 pKBF367-12 et 9 pKBF367-13.

Témoins: 1 et 10 *B. distasonis* possédant 3 plasmides de 3.9; 9.0; 48 kb.

2 HB101(pKBF367-1); 4 HB101(pKBF367-11);

6 HB101(pKBF367-12); 8 HB101(pKBF367-13)

B- Transfert vers *B. distasonis* 419.

Tous les vecteurs ont été utilisés ainsi que les deux plasmides mobilisateurs. Bd419 a été précultivé sur BHI jusqu'à une DO de 0.6 à 600 nm. La conjugaison a été effectuée en aérobiose pendant 18 heures. Les bactéries ont ensuite été incubées en anaérobiose sur BHI gélosé contenant les antibiotiques.

Les résultats de ces transferts sont indiqués dans le tableau 11 et montrent que la résistance à la tétracycline conférée par les vecteurs à *E. coli* ne s'exprime pas en anaérobiose; c'est pourquoi il est possible d'utiliser cet antibiotique pour contre-sélectionner les bactéries donatrices.

Les fréquences de conjugaison sont presque 10 fois supérieures avec R751 qu'avec pRK2013.

Les transconjugants sont apparus sur milieux sélectifs gélosés au bout de 48 heures à l'exception des transconjugants mettant en jeu pKBF367-13 qui étaient visibles après 96 heures d'incubation.

Quelques colonies issues de chaque transfert ont ensuite été réisolées plusieurs fois afin d'éliminer toutes traces éventuelles d'*E. coli*.

Le contenu plasmidique de chaque colonie a alors été analysé après extraction par la méthode de Ish-Horowicz et Burke et électrophorèse.

Le résultat de ces électrophorèses représentées figure 20 nous montrent que:

B. distasonis 419 possède naturellement trois plasmides de 3.9, 9.1 et 48.5 kb qui, dans le gel d'agarose existent sous forme super-hélicoidale, circulaire ouverte et linéaire, ce qui gêne assez fortement la mise en évidence du plasmide transféré. Néanmoins, dans tous les cas, on distingue clairement que tous les plasmides indigènes de la souches sont présents et ne semblent avoir subi aucune délétion. Un plasmide supplémentaire apparaît, d'une taille semblable à celle du témoin.

Cas particulier des transconjugants obtenus avec pKBF367-13.

Les bactéries issus des croisements Bd419, HB101(pKBF367-13) et HB101(pRK2013) ou LE392(R751) possèdent également un plasmide supplémentaire assez difficile à mettre en évidence puisqu'il est presque confondu avec le plasmide indigène de 9.8 kb. Ce résultat indique que malgré la délétion $\Delta HindIII$, le gène de résistance à la clindamycine/érythromycine du fragment *EcoRI*-B de pBFTM10 demeure fonctionnel. Cette résistance conférée par pKBF367-13 est néanmoins plus faible que celle apportée par les autres vecteurs; les bactéries se développant plus lentement en présence de clindamycine. Le gène de la résistance à la clindamycine du fragment *EcoRI*-D de pBF4 est transcrit à partir d'un promoteur situé dans la séquence d'insertion de Tn4351 (40, 65). La région équivalente de Tn4400 est absente dans pKBF367-13 alors que le gène est néanmoins transcrit. Ce résultat indique ainsi que la séquence de 200 paires de bases supplémentaires située sur le fragment *EcoRI*-B de pBFTM10 par rapport au fragment *EcoRI*-D de pBF4, possède vraisemblablement un promoteur permettant l'expression du gène de résistance à la clindamycine.

6. Recherche des régions nécessaires à la mobilisation et à la réplication de pBF367.

I Construction des dérivés de délétion de pKBF367-12

La réalisation des vecteurs a été réalisée par l'insertion de l'intégralité de pBF367 dans pKC7. Si ce plasmide cryptique permet la réplication chez *Bacteroides* et la mobilisation par R751 des vecteurs construits, par contre, la position même approximative des régions conférant ces propriétés est inconnue. De plus, si nous envisageons d'améliorer encore les possibilités de transfert de ces vecteurs en diminuant

leur taille, il est tentant de réduire les dimensions du pBF367 inséré. pBF367 mesure 4.6 kb; malheureusement, il est coupé en très peu de points par les enzymes testées (figure 18). En effet, seules *XhoI*, *BstEII*, *AvaI* et *SacI* reconnaissent des séquences de pBF367.

L'enzyme *SacI* coupe le pBF367 inséré dans pKC7 approximativement en son milieu; de plus, ce site est le seul de pKBF367-12. *XhoI* coupe pKBF367-12 en deux points très proches séparés par 200 nucléotides environ. La délétion *XhoI-SacI* enlèverait environ 2.0 kb de pBF367 et supprimerait un site *BstEII*.

Malheureusement les extrémités *SacI-XhoI* ne sont pas compatibles; c'est la raison pour laquelle, après digestion partielle par les deux enzymes un traitement à la nucléase S1 a été effectué conformément au protocole décrit page 86.

Après ligature et transformation, nous avons obtenu 120 colonies *Km^r* dont 60% possédaient des plasmides d'une taille inférieure à pKBF367-12.

Le DNA des clones suspects a ensuite été extrait par la méthode de Grosveld (page 77), ce qui nous a permis de sélectionner 4 types de plasmides de tailles différentes notés pKBF367-12-5, pKBF367-12-6, pKBF367-12-7 et pKBF367-12-11.

Les cartes de restriction de ces différents plasmides ainsi que leurs profils de digestion par *AvaI* sont représentés en figure 22 et 23.

Remarque sur l'action de la nucléase S1.

A de faibles concentrations ioniques, avec de fortes concentrations en enzymes la nucléase S1 acquiert une activité nucléasique s'exerçant sur la DNA bicaténaire.

II Transfert des dérivés de délétion.

Les quatre dérivés de délétions ont été utilisés avec les deux plasmides mobilisateurs; pKBF367-12 a été utilisé comme témoin. Les souches réceptrices étaient *E. coli* W3350 *Nal^r* et *B. distasonis* 419.

L'analyse des transconjugants montre que tous les plasmides, quand ils sont mobilisés et qu'ils se répliquent, sont transférés à une fréquence semblable au témoin soit $2.0 \cdot 10^{-2}$ chez *E. coli* et $1.0 \cdot 10^{-5}$ chez *Bacteroides*. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 12.

Les petits plasmides ne sont pas mobilisés par R751 et ne se répliquent pas chez *Bacteroides*. Les gènes nécessaires à la répllication et la région impliquée dans la mobilisation sont donc localisés dans la partie restante de pBF367 de pKBF367-12-11, commençant en bordure de cette zone puisqu'une délétion supplémentaire de 600 paires de bases entraîne la perte de ces 2 propriétés.

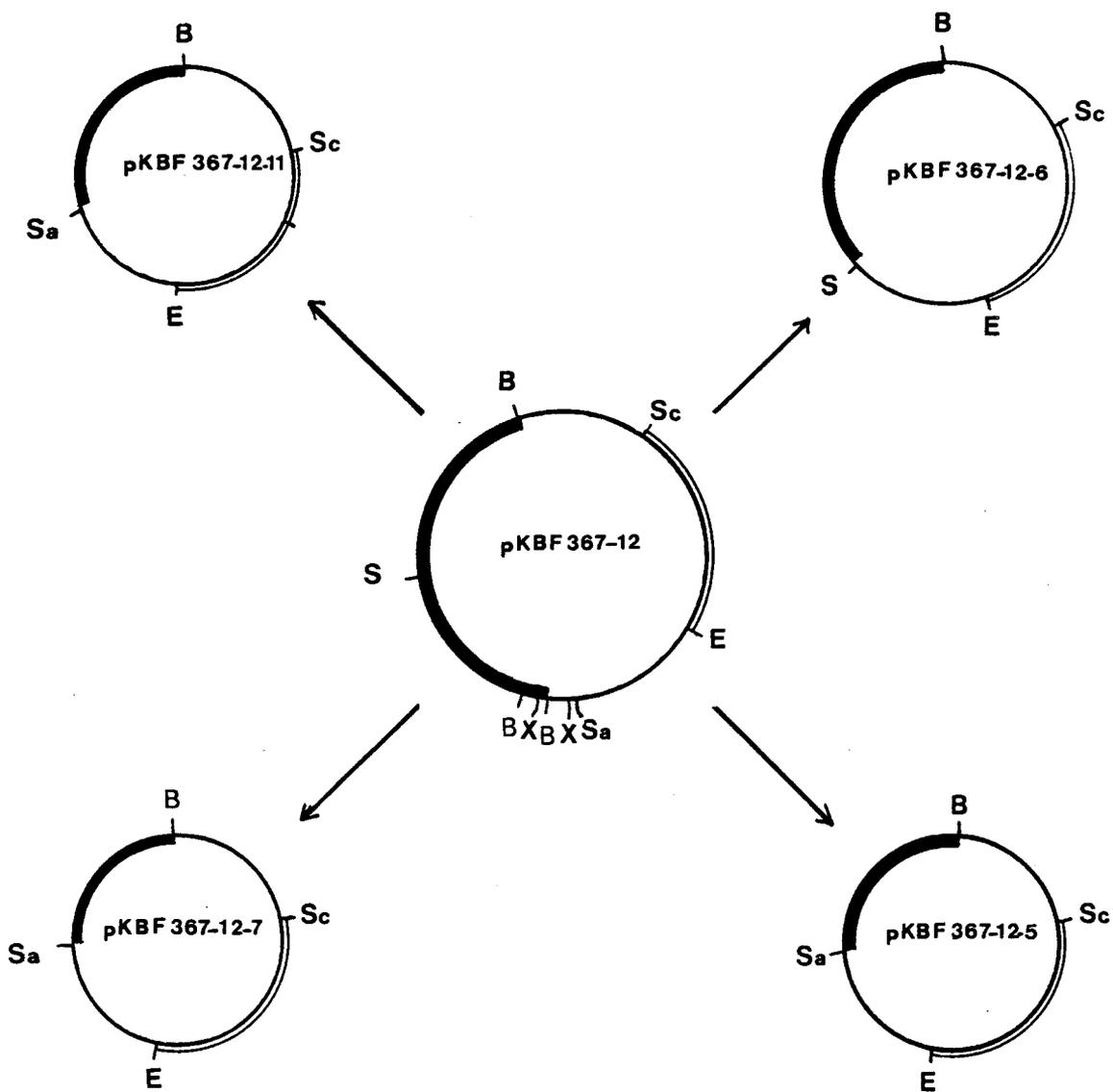


Figure 21: Schéma des différents dérivés de délétion de pKBF367-12.

B= *Bst*EII, E= *Eco*RI, S= *Sac*I, Sa= *Sal*I, Sc= *Sca*I, X= *Xho*I.

- █** = Fragment dérivé du pBF367.
- ▭** = Fragment *Eco*RI-*Sca*I du Tn4400.
- = Partie originale de pK07.

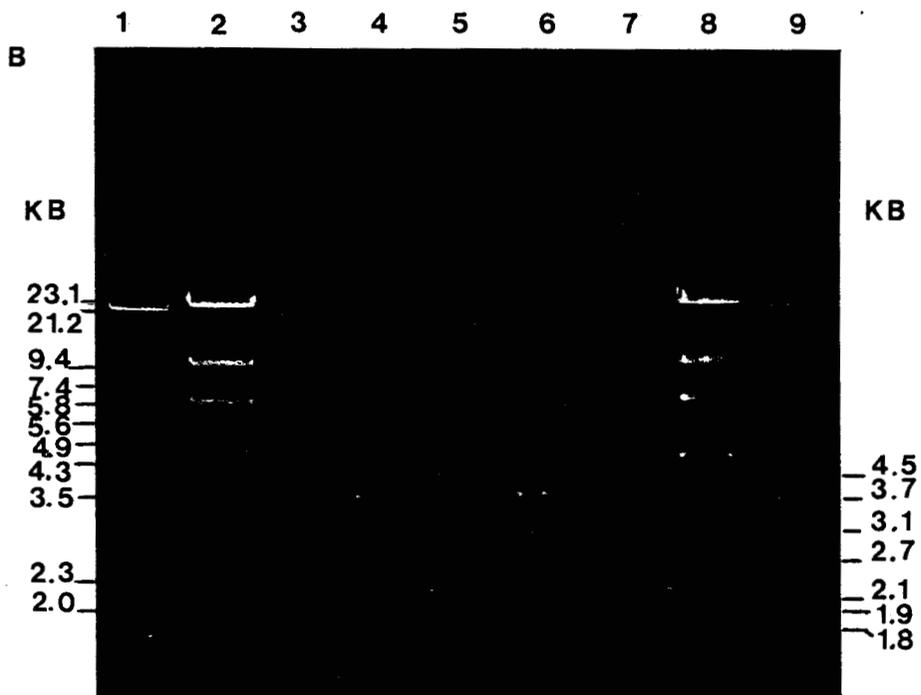
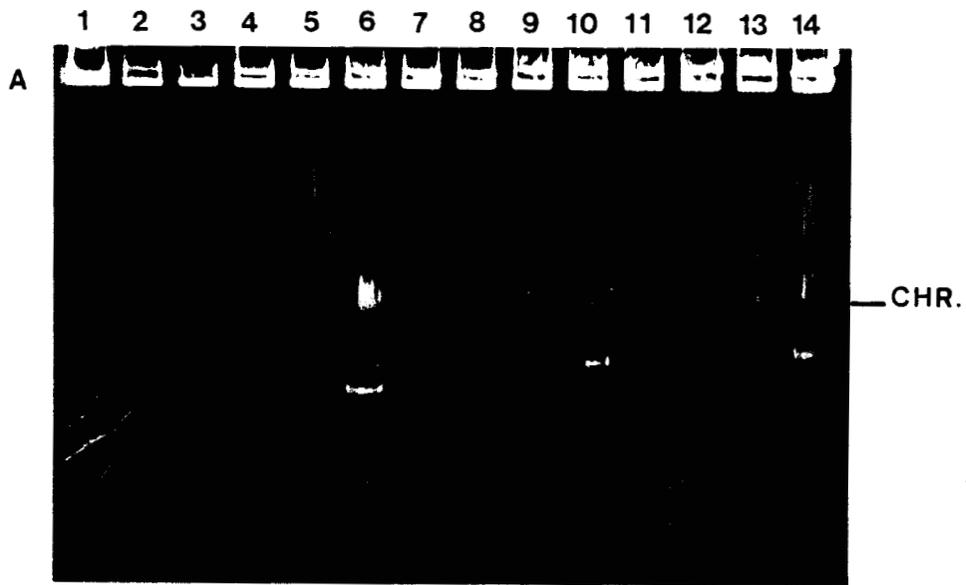


Figure 22: A- Analyse du contenu plasmidique des transformants. 1 à 13 Différents transformants.

14: Témoin pKBF367-12.

B- Profil électrophorétique des différents dérivés de délétion de pKBF367-12 digérés par *AvaI*.

1 et 9: λ /*EcoRI*.

2 et 8: λ /*HindIII*.

3: Témoin pKBF367-12/ *AvaI*.

4: pKBF367-12-5.

5: pKBF367-12-6.

6: pKBF367-12-7.

7: pKBF367-12-11.

Bactérie réceptrice	E. coli W3350 Nal ^r	
plasmides	HB101(pRK2013)	LE392(R751)
pKBF367-12 10.5 kb	Mob+ Rep+	Mob+ Rep+
pKBF367-12-6 8.7 kb	Mob+ Rep+	Mob+ Rep+
pKBF367-12-11 8.2 kb	Mob+ Rep+	Mob+ Rep+
pKBF367-12-5 7.6 kb	Mob+ Rep+	Mob- Rep+
pKBF367-12-7 7.5 kb	Mob+ Rep+	Mob- Rep+

Bactérie réceptrice	<i>B. distasonis</i> 419	
plasmides	HB101(pRK2013)	LE392(R751)
pKBF367-12 10.5 kb	Mob+ Rep+	Mob+ Rep+
pKBF367-12-6 8.7 kb	Mob+ Rep+	Mob+ Rep+
pKBF367-12-11 8.2 kb	Mob+ Rep+	Mob+ Rep+
pKBF367-12-5 7.6 kb	Mob+ Rep-	Mob- Rep-
pKBF367-12-7 7.5 kb	Mob+ Rep-	Mob- Rep-

Tableau 12: Récapitulatifs des différentes propriétés de transfert des dérivés de délétion.

Rep+ =capable de se répliquer dans la bactérie réceptrice indiquée. Mob+ =pouvant être mobilisé par le plasmide mobilisateur indiqué.

7. Transfert des vecteurs construits vers d'autres membres du genre *Bacteroides*.

I- Transfert de pKBF367-12 vers *Bacteroides ruminicola*.

Tous les vecteurs s'exprimant chez *Bacteroides* construits jusqu'à présent se répliquent et s'expriment chez les *Bacteroides* apparentés à *B. fragilis*. Il était intéressant de tester l'expression de ces vecteurs vers des bactéries génétiquement et écologiquement plus éloignées: Les *Bacteroides* du rumen.

Les *Bacteroides* du rumen jouent un rôle fondamental dans l'assimilation et l'utilisation des dérivés cellulolytiques par les ruminants; l'existence de vecteurs génétiques permettant d'étudier l'expression du DNA de ces souches est donc d'un intérêt primordial.

Plusieurs éléments nous permettaient de penser que ces vecteurs pouvaient être utilisés.

1- Les *Bacteroides* du rumen possèdent les mêmes profils de résistance aux antibiotiques que les autres *Bacteroides*. En effet, ils sont tous sensibles à la clindamycine et résistants aux aminoglycosides.

2- Bien que génétiquement assez éloignés, ils appartiennent néanmoins au même genre.

I. Choix de la souche.

Les *Bacteroides* du rumen sont beaucoup plus difficiles à cultiver que ceux issus du tractus digestif de l'homme; leurs exigences métaboliques sont importantes et mal connues.

De plus, ces bactéries constituent un groupe assez hétérogène; ainsi *Bacteroides succinogenes* diffère énormément de l'autre espèce prédominante du rumen: *Bacteroides ruminicola*.

Nous avons choisi d'essayer de transférer pKBF367-12 vers *Bacteroides ruminicola* 23; en effet, cette souche est l'espèce type du groupe (ATCC 19189), elle est assez bien connue, facile à identifier grâce à la présence de son

unique plasmide, et cultive très bien sur milieu RCM et BHI avec des temps de génération semblables à ceux de *Bacteroides fragilis*.

De plus, cette souche est sensible à la clindamycine et à l'érythromycine qui sont les seuls marqueurs utilisables.

II- Conjugaison.

La souche réceptrice utilisée pour ce transfert a donc été *B. ruminicola* 23. Le vecteur à transférer était PKBF367-12 possédé par *E. coli* HB101. Les deux plasmides mobilisateurs R751 et pRK2013 ont été utilisés. *B. distasonis* 419 était utilisé comme souche réceptrice témoin. Le transfert a été effectué comme précédemment, pendant 18 heures en aérobiose, sur filtre d'acétate de cellulose déposé sur Luria. Ensuite, les bactéries ont été remises en suspension et sélectionnées sur milieux BHI et RCM contenant de la clindamycine et de l'acide nalidixique aux concentrations de 10 et 100 µg/ml respectivement.

Après 48 heures d'incubation, des transconjugants issus de *B. distasonis* 419 sont apparus à la fréquence habituelle de 10^{-5} alors qu'aucun transconjugant originaire de *B. ruminicola* 23 n'a été mis en évidence.

Ce résultat pouvait avoir plusieurs explications:

- *B. ruminicola* 23 n'est peut être pas la souche réceptrice idéale. En effet, très peu de souches acceptent le vecteur à une fréquence décelable et il était possible que la seule souche de *B. ruminicola* utilisable soit dans ce cas.

- Les gènes permettant la répllication du vecteur et ceux conférant la résistance à la clindamycine ne sont peut-être pas fonctionnels chez *B. ruminicola*.

C'est pourquoi nous avons ensuite réalisé un nouveau vecteur navette à partir d'un plasmide cryptique originaire de *B. ruminicola*.

8. Construction du vecteur pKBR23.

I. Choix du plasmide s'exprimant chez *E. coli*.

Nous avons utilisé pKC71 qui possède le fragment *EcoRI*-B de pBFTM10 inséré au niveau du site *EcoRI* de pKC7. La carte de restriction de ce plasmide de 10.1 kb est indiquée page 110.

II. Choix du plasmide originaire de *B. ruminicola*.

Bacteroides ruminicola 23 possède un plasmide cryptique de 9.5 kb nommé pRRI-7.

Après action des enzymes de restriction *AvaI*, *BstEII*, *ClaI*, *BamHI*, *PvuII*, *SacI* et *SmaI*, il s'est avéré que seules *BstEII* et *ClaI* coupaient ce plasmide et ceci en un seul point. Nous avons donc choisi d'insérer la totalité de ce plasmide au niveau des sites *ClaI* ou *BstEII* de pKC71 en formant ainsi un plasmide hybride de 19.6 kb. pKC71 est coupé en deux points par *ClaI*, juste au niveau du gène codant pour la résistance à la tétracycline, c'est pourquoi une digestion partielle par cette enzyme était nécessaire.

III. Construction.

B. ruminicola 23(pRRI-7) a été cultivé sur BHI puis le DNA plasmidique a été extrait par la méthode de Ish-Horowicz et Burke avec les modifications apportées à l'extraction des plasmides de *Bacteroides*. Deux fractions différentes de ce plasmide ont ensuite été digérées séparément par *BstEII* et par *ClaI*.

De même, pKC71 a été extrait, puis séparément digéré par *BstEII* et *ClaI* (la digestion par *ClaI* étant partielle), et déphosphorylé.

Après déprotéinisation, les plasmides issus de la digestion par *ClaI* ont été mis en présence et ligaturés, la quantité de pRRI-7 étant trois fois plus importante

que celle de pKC71. On a procédé de même avec les fractions digérées par *BstEII*.

Après transformation de *E. coli* HB101 par 500 ng du produit de la ligature, selon le protocole standard décrit page 86, les bactéries ont été sélectionnées sur milieu de Luria contenant 10 µg de Tc et 50 µg de Km.

Après 36 heures d'incubation, aucun transformant n'a été obtenu avec les produits de la digestion par *BstEII*; les extrémités des fragments de DNA sont donc vraisemblablement incompatibles.

Par contre, 89 transformants ont été obtenus avec les plasmides linéarisés par *ClaI*. Ces transformants étaient tous résistants à la tétracycline, ils possédaient donc tous le petit fragment *ClaI* situé au niveau de ce caractère marqueur.

Le DNA des colonies Tc^r et Km^r a été analysé en lyse directe indiquant que 50% d'entre elles possédaient un plasmide d'une taille plus importante que pKC71.

la Figure 23. montre les profils de DNA plasmidique des transformants obtenus en lyse directe.

Le DNA de quelques clones a été extrait par la méthode de Grosveld puis digéré par différentes enzymes de restriction, de façon à isoler avec certitude deux plasmides de 19.5 kb nommés pKBR23-1 et pKBR23-2 différant entre eux par l'orientation du pBR23 inséré. (voir Figure 23)

IV. Transfert de pKBR23-1 et pKBR23-2 par conjugaison.

Les gènes nécessaires à la répllication de ces vecteurs sont originaires de *B. ruminicola*, par contre, les gènes d'antibiorésistance proviennent de *E. coli* et de *B. fragilis*. Il était donc intéressant de tester le transfert et l'expression de ces 2 vecteurs chez *B. distasonis* 419 et chez *B. ruminicola* 23.

Pour ces transferts conjugatifs par mobilisation les deux plasmides mobilisateurs R751 et pRK2013 ont été utilisés. La conjugaison a été effectuée selon le procédé standard décrit page 86, les transconjugants éventuels ont été incubés en anaérobiose sur milieux BHI et RCM contenant 10 µg/ml de Cl_i et 100 µg/ml de Nal pour assurer leur sélection.

Les résultats de ces transferts reportés dans le tableau 13 indiquent que:

- pKBR23 se réplique chez *B. distasonis*; les gènes nécessaires à la répllication de pRRI-7 s'expriment donc dans des bactéries du groupe *B. fragilis*. Des plasmides originaires de *B. ruminicola* peuvent donc être naturellement transférés et s'exprimer dans des bactéries du tractus digestif de l'homme. Ainsi, il semble qu'il existe une relation génétique assez étroite entre les *Bacteroides* du rumen d'une part, et ceux des organismes monogastriques d'autre part, alors que ces bactéries vivent sans aucune relation, dans des habitats très différents.

- Par contre, à la différence de pBF367 et pB8-51, pBR23 n'est pas mobilisé par le R751. Il est néanmoins possible que la région permettant cette mobilisation soit située au niveau du site reconnu par *Cla*I. Il serait nécessaire d'insérer le pRRI-7 en un site éloigné de celui de *Cla*I pour vérifier cette hypothèse.

- pKBR23-2 est transféré vers *B. ruminicola* 23 à une fréquence de $7 \cdot 10^{-7}$, uniquement lorsque le plasmide

mobilisateur pRK2013 est utilisé. Ce résultat indique que les gènes conférant la résistance aux macrolides et lincosamides s'expriment parfaitement chez *B. ruminicola*. Il est à noter que cette fréquence de conjugaison est environ 100 fois moindre que celle obtenue avec pKBF367-1 et ses dérivés chez *B. distasonis* 419. Il est donc possible que ces derniers puissent être transférés et s'exprimer à une fréquence plus faible, non décelable, vers *B. ruminicola*.

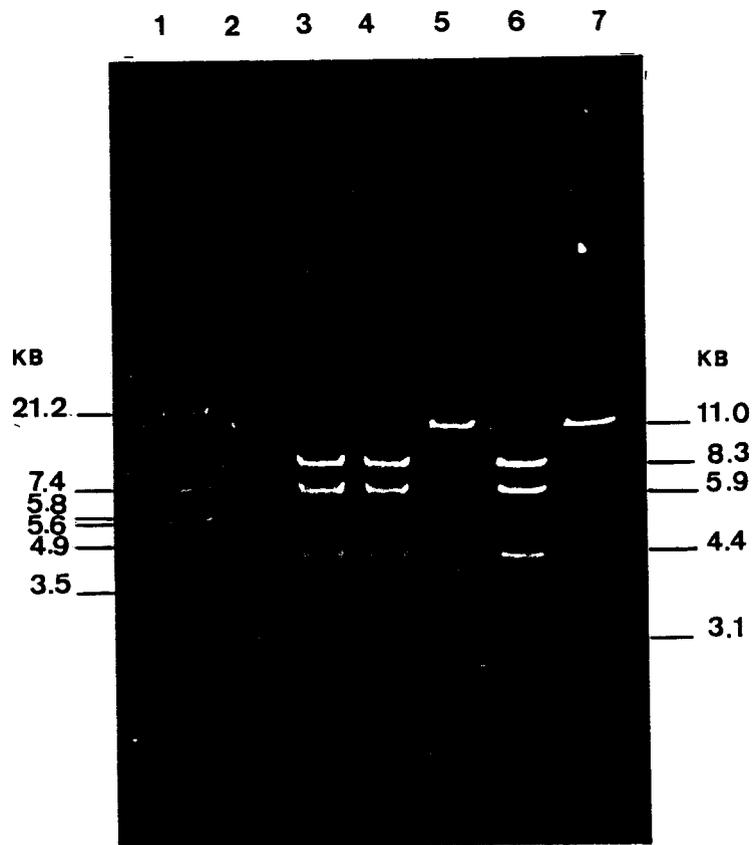
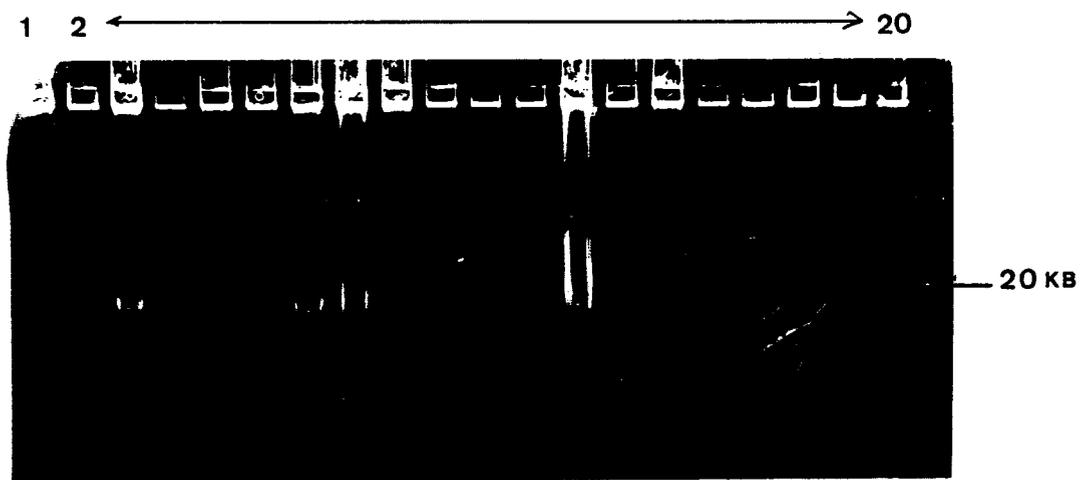


Figure 23: A: Contenu plasmidique des transformants.

1= Témoin HB101(pKC71).

2 à 20= Transformants E. coli.

B: Profils de digestion de différents transformants par *EcoRI* montrant les deux orientations de pRRI-7 dans pKC71.

1= Témoin 1 digéré par *EcoRI*. 4= Clone N° 11

2= Clone N° 3 (pKBR23-1) 5= Clone N° 12

3= Clone N° 7 (pKBR23-2) 6= Clone N° 13

7= Clone N° 14

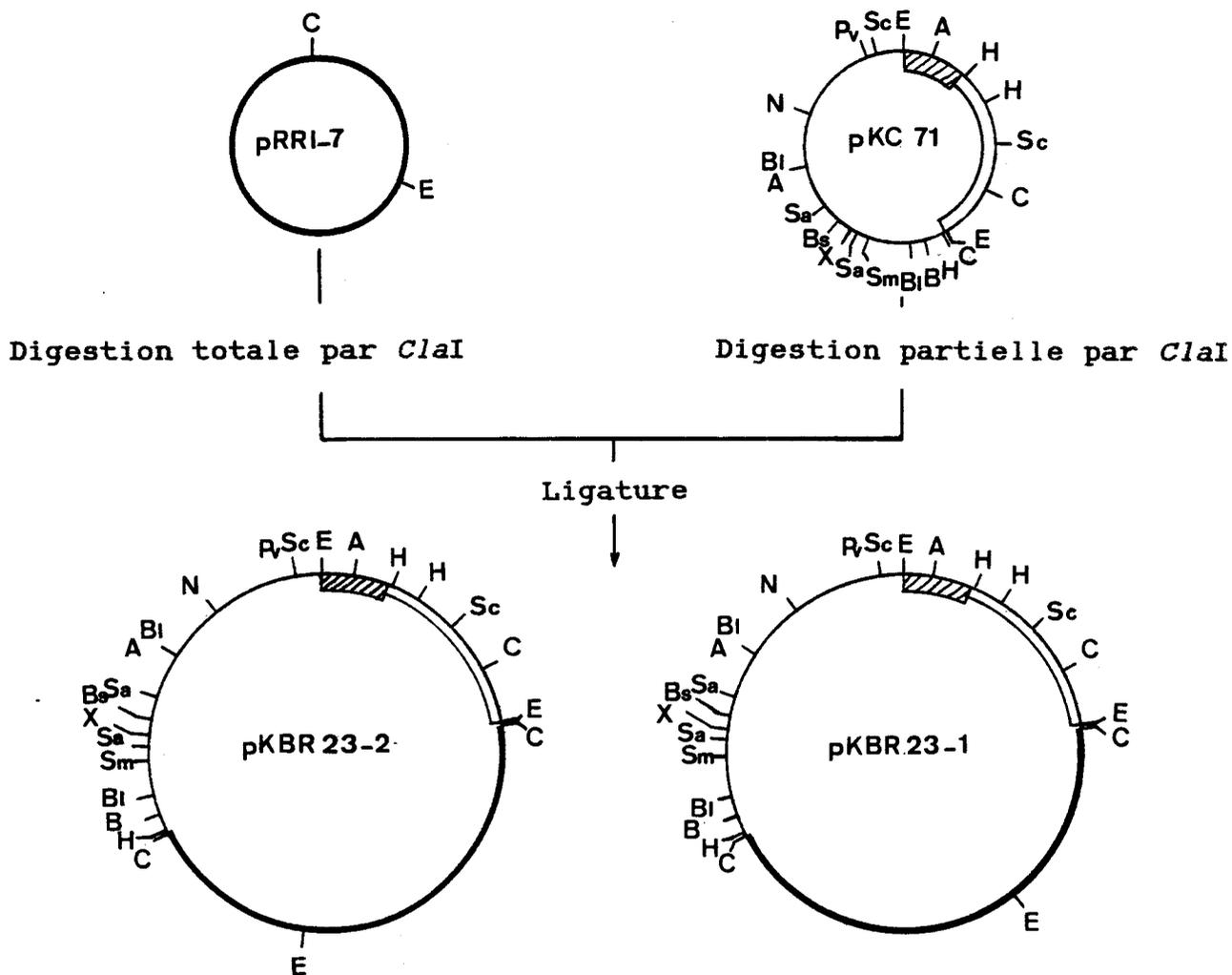
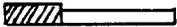


Figure 24: Schéma de la construction de pKBR23-1 et -2.

 = Fragment EcoRI-B de pBFTM10.

 = pKC7.

 = pRRI-7.

A= *Ava*I, Bs= *Bst*EII, B= *Bcl*I, Bl= *Bal*I, C= *Cla*I, E= *Eco*RI, H= *Hind*III, N= *Nde*I, Pv= *Pvu*I, Sa= *Sal*I, Sc= *Sca*I, Sm= *Sma*I, X= *Xho*I.

		Souches réceptrices	
plasmides mob	Vecteurs	<i>B.ruminicola</i> 23	<i>B.distasonis</i> 419
pRK2013	pKBF367-12	$<10^{-8}$	$3.2 \cdot 10^{-5}$
	pKBR23-1	$2.7 \cdot 10^{-7}$	$1.7 \cdot 10^{-5}$
	pKBR23-2	$7.0 \cdot 10^{-7}$	$0.8 \cdot 10^{-5}$
R751	pKBF367-12	$<10^{-8}$	$2.4 \cdot 10^{-5}$
	pKBR23-1	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$
	pKBR23-2	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$

Tableau 13: Fréquences de conjugaison obtenues lors des transferts de pKBF367-12, pKBR23-1 et pKBR23-2 vers Bd419 et Br23.

9- Utilisation des vecteurs construits dans l'étude de l'insertion de fragments de DNA.

I Clonage de gènes de *Bacteroides*.

Le seul marqueur de nature plasmidique actuellement utilisable chez *Bacteroides* est celui codant pour la résistance à la clindamycine/érythromycine. Pourtant, la disponibilité d'un deuxième caractère marqueur rendrait des services appréciables; il serait ainsi possible par exemple d'introduire dans une même bactérie, 2 fragments de DNA portés par des plasmides différents.

C'est pourquoi nous avons décidé de cloner chez *E. coli*, dans le but de le retransférer vers *Bacteroides*, un gène impliqué dans une résistance aux antibiotiques. De plus, le clonage d'un tel caractère, facile à mettre en évidence, nous permettrait de tester l'efficacité des vecteurs construits.

A- Choix du caractère marqueur.

Le fragment de DNA à cloner devait être de petite taille et susceptible de s'exprimer chez *E. coli*.

La seule souche réceptrice de *Bacteroides* disponible devait être sensible à l'antibiotique dont la résistance est codée par ce gène.

Nous avons donc choisi de cloner le gène impliqué dans la résistance à la carbénicilline. En effet, la protéine synthétisée est d'une taille comparable à celle de la β -lactamase codée par le pBR322; soit 15000g. environ. De plus, *B. distasonis* 419 est très sensible à la carbénicilline puisque des concentrations de 10 μ g/ml inhibent sa croissance.

B- Choix du vecteur.

Le vecteur utilisé devait être de petite taille, pouvoir s'exprimer chez *Bacteroides*, ne porter aucun gène codant pour la synthèse de β -lactamases. C'est pourquoi nous avons choisi pKBF367-12 qui réunissait toutes ces

conditions. Ce plasmide de 10.5 kb, coupé en un point par *ClaI* et *Sall* a donc été utilisé pour le clonage.

C- Choix de la souche résistante à la carbénicilline.

Nous avons choisi *B. fragilis* 344 qui est la plus résistante à la carbénicilline de tous les *Bacteroides* testés. Cette bactérie prolifère à des concentrations en carbénicilline atteignant 400 µg/ml sans diminution apparente de son temps de génération.

D- Clonage.

Le DNA chromosomique de *B. fragilis* 344 a été extrait et purifié selon la méthode de Dhaese et coll. (15) puis séparé en deux fractions. Un échantillon a été partiellement digéré par *Sall*, l'autre par *ClaI*. Le DNA chromosomique issu de ces digestions a ensuite été électro-élué selon le protocole de la page 84 afin de conserver uniquement les fragments de DNA d'une taille comprise entre 8000 et 3000 paires de bases.

Parallèlement, deux fractions de pKBF367-12 ont été séparément digérées par ces mêmes enzymes. Chaque échantillon contenant les fragments linéarisés par *Sall* ou *ClaI* du vecteur a été déphosphorylé puis mis en présence avec le DNA chromosomique partiellement digéré par les mêmes enzymes. La quantité de DNA chromosomique était 3 fois supérieure à celle de vecteur (1.5 µg contre 0.5).

Après ligation selon le protocole de King et coll., le DNA de chaque échantillon a été transféré par transformation vers une souche d'*E. coli* HB101.

Les bactéries issues de la transformation ont ensuite été incubées pendant 6 heures sur Luria contenant 20 µg/ml de carbénicilline afin d'amplifier le nombre de transformants éventuels. La culture bactérienne a ensuite été directement étalée sur milieu sélectif renfermant 100 µg/ml de Cb et 50 µg/ml de Km; quelques boîtes contenant uniquement Km étaient utilisées comme témoin de transformation.

Après 48 heures d'incubation aucun, transformant $Cb^r Km^r$ n'est apparu. Ce résultat négatif pouvait avoir plusieurs explications:

1- Les gènes conférant la résistance à la carbénicilline chez *Bacteroides* ne s'expriment pas chez *E. coli*. Ceci est néanmoins assez peu probable puisque jusqu'à présent, la très grande majorité des gènes originaires de *Bacteroides* sont actifs chez *E. coli* (Tableau 5).

2- La préincubation des souches dans du Luria avec 20 $\mu\text{g/ml}$ de Cb a été létale pour la grande majorité des transformants, y compris ceux ayant reçu le gène recherché.

En effet, le nombre de transformants se développant ensuite sur Km est seulement de 50 à la dilution 10^0 .

3- Le gène recherché est coupé par les deux enzymes utilisées. Pour éviter cet inconvénient nous avons employé deux enzymes différentes, chaque digestion étant partielle.

II. Clonage de gènes de bactéries aérobies.

Parallèlement à ce résultat négatif, le clonage de gène de bactéries aérobies vers *Bacteroides* a été réalisé.

En effet, jusqu'à présent, aucun fragment de DNA originaire de bactéries aérobies ne s'exprime chez *Bacteroides*. C'est pourquoi nous avons entrepris le clonage des gènes du transposon Tn501 conférant la résistance aux sels de mercure.

Ce travail a été réalisé par Y. Tierny (60, 95). La totalité du pUB781 (5), plasmide constitué de ColE1 et du Tn501 a été insérée au niveau du site *Sma*I de pKBF367-1 et pKBF367-12.

Les transformants *E. coli* ayant reçu ce plasmide hybride présentaient une résistance au HgCl_2 à une concentration de 20 $\mu\text{g/ml}$. Malheureusement, ce plasmide, une fois transféré chez *B. distasonis* 419 par conjugaison ne conférait pas la résistance au mercure à cette souche. Ce

plasmide hybride n'avait pourtant subi aucune délétion lors de son transfert vers *B. distasonis* puisqu'une fois extrait des transconjugants et retransféré vers *E. coli*, il conférait à nouveau la résistance au sels de mercure aux transformants.

Ce résultat démontrait néanmoins que les vecteurs de clonage dérivés de pKBF367-1 étaient parfaitement capables de transférer des fragments de DNA de *E. coli* vers *Bacteroides* et vice-versa.

-CONCLUSION -

Jusqu'à présent, la génétique de *Bacteroides* est principalement limitée à l'étude des différents transposons possédant les gènes de la résistance à la clindamycine, ainsi qu'à la recherche du mode de transfert conjugatif de la résistance à la tétracycline.

La seule méthode actuellement utilisable qui permette de transférer du matériel génétique vers *Bacteroides* est basée sur l'utilisation de vecteurs navettes transmis par conjugaison ou par transformation.

Les vecteurs que nous avons réalisés possèdent des qualités au moins égales à ceux construits par Guiney et coll. (28), Salyers et coll. (75, 96), et Smith (84).

En effet, les vecteurs de la série pKBF367 ont une taille comprise entre 14.7 kb (pKBF367-1) et 8.2 kb (pKBF367-12 7) alors que pDPI (28) et pE5-2 (71) mesurent 19 et 17 kb respectivement. Or il est connu que la fréquence de transfert est d'autant plus grande que le matériel génétique transféré est de petite taille (70).

Ces vecteurs sont mobilisés par deux types de plasmides de groupes d'incompatibilité différents: R751 et pRK2013. Les fréquences de conjugaison sont voisines dans les deux cas et atteignent 10^{-5} vers *Bacteroides*.

Les plasmides sont maintenus d'une façon stable puisque jamais nous n'avons pu mettre en évidence de dérivés de délétion dans les souches ayant reçu les vecteurs.

Malgré leur taille, les plasmides réalisés possèdent un grand nombre de caractères marqueurs dans lesquels il est possible de cloner; ainsi, pKBF367-1 code pour les résistances à la tétracycline, l'ampicilline et la kanamycine qui s'expriment chez *E. coli* ainsi que la résistance à la clindamycine qui s'exprime chez *Bacteroides*.

pKBF 367-12 possède encore 8 sites uniques de coupures.

pKBF367-12-11, un des plus petits plasmides construits porte encore 2 caractères marqueurs: les résistances à la kanamycine et à la clindamycine.

Comme pBFTM10 et pB8-51, pBF367 est mobilisé par R751. Chez pBFTM10, la région *mob* est très éloignée des gènes intervenant dans sa réplication (Figure 8). Par contre, les délétions réalisées à partir de pKBF367-12 ont permis de mettre en évidence que chez pBF367, ces deux régions sont très proches voir même contigües. En effet, pKBF367-12-11 est mobilisable par R751 et se réplique chez *Bacteroides* alors que pKBF367-12-5 ne possède plus ces deux propriétés bien qu'il mesure 600 paires de bases de moins seulement.

Malheureusement, très peu de souches réceptrices sont capables de recevoir ces vecteurs. Ces résultats quoique surprenants ne sont pas exceptionnels puisque pE5-2 est transféré à une fréquence satisfaisante de 10^{-5} à 10^{-4} uniquement vers *B. uniformis* 1004 (75). De même, Guiney utilise uniquement *B. fragilis* 638 et ses dérivés pour transférer pDPI (28).

Nous obtenons des transconjugants à une fréquence décelable uniquement avec *B. distasonis* 419. Ainsi, aucun transconjugant n'a été mis en évidence lorsque la souche dont est originaire pBF367 était utilisée. Pourtant, nous avons employé plusieurs variantes de la méthode de conjugaison décrite, en augmentant les temps de contact, les concentrations cellulaires, les conditions d'incubation, en ajoutant des quantités sous-inhibitrices de clindamycine ou de tétracycline, sans observer une augmentation notable de la fréquence de transfert.

Toutes les bactéries utilisées sont des souches sauvages provenant d'isolats cliniques, elles sont toutes restriction +, ce qui explique que les fréquences de transfert demeurent toujours assez faibles. Néanmoins, aucune étude génétique de transfert de DNA de *Bacteroides* vers *Bacteroides* ou de *E. coli* vers *Bacteroides* ne pourra être entreprise sans résoudre le problème du faible nombre de souches réceptrices potentiellement utilisables.

La transformation décrite par Smith (85), basée sur l'utilisation de PEG, reste limitée à un faible nombre de souches et à de petits plasmides. La transformation des bactéries par électroporation semble beaucoup plus universelle et applicable à *Bacteroides* en ajustant la puissance et la durée du champ électrique appliqué. Cette technique a déjà été utilisée avec succès pour transférer du DNA vers des bactéries réfractaires aux méthodes classiques de transformation.

L'idéal serait de disposer d'un vecteur capable de se répliquer et de s'exprimer dans toutes les bactéries du genre *Bacteroides*. Mais le genre est mal défini, il existe d'assez grandes différences génétiques entre les bactéries du tractus digestif de l'homme et celles du rumen par exemple (Figure 1A).

Les gènes originaires de *Bacteroides* s'expriment parfois assez difficilement chez *E. coli*; c'est pourquoi il serait intéressant d'étudier leur expression vers d'autres souches de *Bacteroides*. pKBF367-12 ne semble pas s'exprimer vers les bactéries du rumen comme *Bacteroides ruminicola*. Nous avons donc construit pKBR-23 à partir d'un plasmide cryptique pRRI-7 contenu dans la souche type du genre: ATCC 19189.

Ce plasmide se réplique chez *B. distasonis* et peut également être transféré, se répliquer et s'exprimer chez *B. ruminicola*. Un tel vecteur pourrait ainsi permettre de transférer des gènes de bactéries du rumen, s'exprimant difficilement chez *E. coli*, vers des bactéries du genre *Bacteroides*.

Nous avons également tenté de cloner les gènes conférant la résistance à la carbénicilline sans succès. Les carbénicillinases sont très spécifiques des molécules apparentées à cet antibiotique, elles dégradent plus difficilement les autres β -lactames. Il est possible que que cette résistance ne s'exprime pas chez *E. coli*

puisque la résistance à la clindamycine ne s'exprime pas chez cette bactérie(28).

Jusqu'à présent, aucun gène de bactéries aérobies ne s'exprime chez *Bacteroides*. Nous avons tenté de cloner le Tn501 porteur de la résistance au mercure originaire de *Yersinia enterocolitica*. Celui-ci, une fois introduit dans Bd419, n'augmente pas de façon significative la résistance aux sels de mercure. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène.

1- Le gène n'est peut être pas transcrit ou incomplètement. Il est à noter en effet que le gène conférant la résistance à la clindamycine des transposons Tn4351, Tn4400, Tn4551 est transcrit par un promoteur de *Bacteroides* alors qu'il est vraisemblablement originaire d'autres genres bactériens (40). Il est donc possible que seul un promoteur de *Bacteroides* permette l'expression de la résistance aux sels de mercure de Tn501.

2- Il est possible que le produit du gène reste localisé dans des compartiments cellulaires ne permettant sa mise en évidence.

3- Les protéines synthétisées peuvent également être détruites par des protéases au fur et à mesure de leur formation.

C'est pourquoi, il serait intéressant de vérifier ces hypothèses en recherchant parmi les *Bacteroides* possédant le pUB781, le mRNA correspondant aux gènes conférant la résistance au mercure ce qui permettrait de savoir si ceux-ci sont transcrits.

Développements actuels et futurs.

Nous avons également inséré dans pKBF367-12 l'opéron lactose Tn951. En effet, cet opéron est très connu ce qui ne peut que faciliter l'étude de sa transcription chez *Bacteroides*. Mais la seule souche réceptrice: Bd419, est lactose +; c'est pourquoi il est indispensable d'isoler un mutant lactose- de Bd419 ou de

trouver une autre souche réceptrice ne métabolisant pas le lactose. Ce travail est en cours de réalisation.

Les bactéries du genre *Bacteroides* possèdent un métabolisme complexe permettant d'hydrolyser les polysaccharides. Nous avons cloné chez *E. coli*, à partir de *Bacteroides thetaïotaomicron*, des enzymes intervenant dans l'hydrolyse du dextran. Ce travail a été réalisé par J. C. Joncquiert. Il semble qu'il existe une grande quantité d'enzymes différentes puisque 10 clones possédant des plasmides hybrides ayant des inserts différents ont été isolés. Ces gènes s'expriment très mal chez *E. coli* ce qui rend leur étude très difficile voir impossible; il serait intéressant de les retransférer, vers un *Bacteroides* n'hydrolysant pas le dextran, grâce à un vecteur navette, comme ceux déjà réalisés.

Les *Bacteroides* du rumen participent activement à l'hydrolyse des dérivés cellulolytiques ainsi, *Bacteroides ruminicola* a une activité hémicellulolytique *B. succinogenes* (nouvellement renommé *Fibrobacter succinogenes*) est une des bactéries les plus cellulolytiques du rumen. Malheureusement, ces micro-organismes sont difficiles à cultiver, leur croissance nécessite l'adjonction de 40% de jus de rumen, ce qui rend le clonage des enzymes potentiellement intéressantes d'autant plus nécessaire.

-BIBLIOGRAPHIE -

- 1- Aldridge, K. E., and C. V. Sanders. 1987. Antibiotic- and methode-dependent variation in susceptibility testing results of *Bacteroides fragilis* group isolates. J. Clin. Microbiol. 25:2317-2321.
- 2- Baker, P. J., R. T. Evans, J. Slots, and R. J. Genco. 1985. Susceptibility of human oral anaerobic bacteria to antibiotics suitable for topical use. J. Clin. Periodont. 12:201-208.
- 3- Balbas, P., X. Soberon, E. Merino, M. Zurita, H. Lomeli, F. Valle, N. Flores, and F. Bolivar. 1986. Plasmid vector pBR322 and its special purpose-derivatives. Gene 50:3-40.
- 4- Beck, E., G. Ludwig, E. A. Auerswald, B. Reiss and H. Schaller. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin-phosphotransferase gene from transposon Tn5. Gene 19:327-336.
- 5- Bennett, P.M., J. Grinsted, C. L. Choi, and M. H. Richmond. 1978. Characterisation of Tn501, a transposon determining resistance to mercuric ions. Mol. Gen. Genet. 159:101-106.
- 6- Beul, H. A., C. von Eichel-Streiber, M. Schreiner, F. P. Schwindling, D. Weinblum, E. J. Zöllner, and M. Dierich. 1985. Characterization of cryptic plasmids in clinical isolates of *Bacteroides fragilis*. J. Med. Microbiol. 20:39-48.
- 7- Boulanger, M. 1923. Les fermentations, l'oeuvre industrielle de Pasteur. Conférence du 27 janvier 1923 à l'université de Lille.
- 8- Boyer, H. B., and D. Roulland-Dussoix. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 41:459-472.
- 9- Braga, A., F. Bernieri, M. Mandelli, P. Mosconi, A. Rossi. 1985. Studio comparativo *in vitro* sull'attività di sette antibiotici nei confronti di batteri anaerobi di isolamento ospedaliero. Boll. Ist. sieroter. Milan. 64:294-301.
- 10- Bush, K., and R. B. Sykes. 1984. Interaction of B-lactam antibiotics with B-lactamases as a cause for resistance. In: Antimicrobial drug resistance. Edited by L. E. Bryan. Academic Press. Orlando, pp.1-31.

- 11- Callihan, D. R., F. E. Young, and V. L. Clark. 1984. Presence of two unique genes encoding macrolide-lincosamide-streptogramin resistance in members of the *Bacteroides fragilis* group as determined by DNA-DNA homology. *J. Antimicrob. Chemother.* 14:329-338.
- 12- Caspari, D., and J. M. Macy. 1983. The role of carbon dioxide in glucose metabolism of *Bacteroides fragilis*. *Arch. Microbiol.* 135:16-24.
- 13- Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, and L. Hsu. 1972. Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110-2114.
- 14- Cuchural, G. J., F. P. Tally, J. R. Storey, and M. H. Malamy. 1986. Transfer of B-lactamase-associated cefoxitin resistance in *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29:918-920.
- 15- Dhaese, P., H. De Greve, H. Decraemer, J. Schell and M. Van Montagu. 1979. Rapid mapping of transposon insertion and deletion mutations in the large Ti-plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *Nucl. Acids Res.* 7:1837-1849.
- 16- Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid.* 1:584-588.
- 17- Elleman, T. C., and P. A. Hoyne. 1984. Nucleotide sequence of the gene encoding pilin of *Bacteroides nodosus*, the causal organism of ovine footrot. *J. Bacteriol.* 160:1184-1187.
- 18- Elleman, T. C., P. A. Hoyne, N. M. McKern, and D. J. Stewart. 1986. Nucleotide sequence of the gene encoding the two-subunit pilin of *Bacteroides nodosus* 265. *J. Bacteriol.* 167:243-250.
- 19- Elleman, T. C., P. A. Hoyne, D. J. Stewart, N. M. McKern, and J. E. Peterson. 1986. Expression of pili from *Bacteroides nodosus* in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 168:574-580.
- 20- Figurski, D. H. and D. R. Helinski. 1979. Replication of an origin containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:1648-1652.

- 21- Flint, H. J., and C. S. Stewart. 1987. Antibiotic resistance patterns and plasmids of ruminal strains of *Bacteroides ruminicola* and *Bacteroides multiacidus*. 1987. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26:450-455.
- 22- Flint, H.J., H. Duncan, J. Bisset, and C. S. Stewart. 1988. The isolation of tetracycline-resistant strains of strictly anaerobic bacteria from the rumen. Lett. Appl. Microbiol. 6:113-115.
- 23- Flint, H. J., A. M. Thomson, and J. Bisset. 1988. Plasmid-associated transfer of tetracycline resistance in *Bacteroides ruminicola*. Appl. Environ. Microbiol. 54:855-860
- 24- Forsberg, C. W., and D. Groleau. 1981. Stability of the endo- β -1,4-glucanase and β -1,4-glucosidase from *Bacteroides succinogenes*. Can. J. Microbiol. 28:144-148.
- 25- Forsberg, C. W., B. Crosby and D. Y. Thomas. 1986. Potential for manipulation of the rumen fermentation through the use of recombinant DNA techniques. J. Anim. Sci. 63:310-325.
- 26- Gong J., R. Y. C., Lo and C. W. Forsberg. 1989. Molecular cloning and expression in *E. coli* of a cellodextrinase gene from *Bacteroides succinogenes* S85. Appl. Environ. Microbiol. 55:132-136.
- 27- Grosveld, F. G., T. Lund, E. J. Murray, A. L. Mellor, H. H. M. Dahl and R. A. Flawell. 1982. The construction of cosmid libraries which can be used to transform eucaryotic cells. Nucl. Acids Res. 10:6715-6728.
- 28- Guiney, D. G., P. Hasegawa, and C. E. Davis. 1984. Plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Bacteroides fragilis*: Differential expression of antibiotic resistance phenotypes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:7203-7206.
- 29- Guthrie, E. P., N.B. Shoemaker, and A. A. Salyers. 1985. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a gene coding for a chondroitin lyase from *Bacteroides thetaiotaomicron*. J. Bacteriol. 164:510-515.
- 30- Holdeman, L. V., R. W. Kelly, and W. E. C. Moore. 1984. Family I *Bacteroidaceae* in Bergey's Manual. Edited by N. R. Krieg, J. G. Holt, R. G. E. Murray, D. J. Brenner, M. P. Bryant, J. W. Moulder, N. Pfennig, P. H. A. Sneath, J. T. Staley. Williams and Wilkins Baltimore/London pp 602-662.

- 32- Hopwood, D. A. 1981. Genetic studies with bacterial protoplasts. *Ann. Rev. Microbiol.* 35:237-272.
- 33- Horn, R., A-M. Bourgault, and F. Lamothe. 1987. Disk diffusion susceptibility testing of the *Bacteroides fragilis* group. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:1596-1599.
- 34- Hungate, R. E. 1985. Anaerobic biotransformations of organic matter. In: *Bacteria in nature*. Edited by E. R. Leadbetter and J. S. Poindexter. Plenum Publishing Corporation. Vol. 1 pp.39-95.
- 35- Ish-Horowicz, D. and J. F. Burke. 1981. Rapid and efficient cosmid vector cloning. *Nucl. Acids. Res.* 9:2989-2998.
- 36- Jensen, N. S., and E. Canale-Parola. 1986. *Bacteroides pectinophilus* sp. nov. and *Bacteroides galacturonicus* sp. nov.: Two pectinolytic bacteria from the human intestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:880-887.
- 37- King, P. V., and R. W. Blakesley. 1986. Optimizing DNA ligations for transformation. *Focus* 8:1-3.
- 38- Klebe, R. J., J. V. Harriss, Z. D. Sharp, and M. G. Douglas. 1983. A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* 25:333-341.
- 39- Lin, Y. L., and H. P. Blaschek. 1984. Transformation of heat-treated *Clostridium acetobutylicum* protoplasts with pUB110 plasmid DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:737-742.
- 40- Macrina, F. L., J. L. Rasmussen, W. H. Tinnel, and D. A. Odelson. 1986. Molecular genetics of clindamycin resistance in *Bacteroides*. *Biology of anaerobic bacteria*, edited by H. C. Dubourguier et al. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 165-173.
- 41- Macy, J. M, and I. Probst. 1979. The biology of gastrointestinal *Bacteroides*. *Ann. Rev. Microbiol.* 33:561-594.
- 42- Magot, M., F. Fayolle, G. Privitera, and M. Sebald. 1981. Transposon-like structures in the *Bacteroides fragilis* MLS plasmid pIP410. *Mol. Gen. Genet.* 181:559-561.

- 43- Malouin, F., and F. Lamothe. 1986. The role of β -lactamase and the permeability barrier on the activity of cephalosporins against members of the *Bacteroides fragilis* group. *Can. J. Microbiol.* 33:262-266.
- 44- Martinez-Suarez, J. V., F. Baquero, M. Reig, and C. Perez-Diaz. 1985. Transferable plasmid-linked chloramphenicol-acetyltransferase conferring high-level resistance in *Bacteroides uniformis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28:113-117.
- 45- Mary, P., P. Pheulpin, M. Béchet, and J. B. Guillaume. 1986. Plasmids and antibiotic resistance in clinical isolates of *Bacteroides* spp. *Biology of Anaerobic Bacteria*, edited by H. C. Dubourguier et al. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 165-173.
- 46- Matthews, B. G., and D. G. Guiney. 1986. Characterization and mapping of regions encoding clindamycin resistance, tetracycline resistance, and a replication function on the *Bacteroides* R plasmid pCP1. *J. Bacteriol.* 167:517-521.
- 47- Mayrand, D., and S. C. Holt. 1988. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol. Rev.* 52:134-152.
- 48- McCarthy, R. E., and A. A. Salyers. 1986. Evidence that polygalacturonic acid may not be a major source of carbon and energy for some colonic *Bacteroides* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:9-16
- 49- Mercenier, A., and B. M. Chassy. 1988. Strategies for the development of bacterial transformation systems. *Biochimie* 70:503-517.
- 50- Meyer, R. J., and J. A. Shapiro. 1980. Genetic organisation of the broad-host-range IncP-1 plasmid R751. *J. Bacteriol.* 143:1362-1373.50.
- 51- Montgomery, L., B. Flesher, and D. Stahl. 1988. Transfer of *Bacteroides succinogenes* (Hungate) to *Fibrobacter* gen. nov. as *Fibrobacter succinogenes* comb. nov. and description of *Fibrobacter intestinalis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38:430-435.
- 52- Naito, Y. and R. J. Gibbons. 1988. Attachment of *Bacteroides gingivalis* to collagenous substrata. *J. Dent. Res.* 67:1075-1080.

- 53- Odelson, D. A., J. L. Rasmussen, C. J. Smith, and F. L. Macrina. 1987. Extrachromosomal systems and gene transmission in anaerobic bacteria. *Plasmid* 17:87-109.
- 54- Okuda, K., T. Kato, J. Shiozu, I. Takazoe, and T. Nakamura. 1985. *Bacteroides heparinolyticus* sp. nov. isolated from humans with periodontitis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35:438-442.
- 55- Otsuka M., J. Endo, D. Hinode, A. Nagata, R. Maehara, M. Sato and R. Nakamura. 1987. Isolation and characterization of protease from culture supernatant of *Bacteroides gingivalis*. *J. Periodont. Res.* 22:491-498.
- 56- Park, B. H., M. Hendricks, M. H. Malamy, F. P. Tally, and S. B. Levy. 1987. Cryptic tetracycline resistance determinant (Class F) from *Bacteroides fragilis* mediates resistance in *Escherichia coli* by actively reducing tetracycline accumulation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:1739-1743.
- 57- Park, B. H., and S. B. Levy. 1988. The cryptic tetracycline resistance determinant on Tn4400 mediates tetracycline degradation as well as tetracycline efflux. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:1797-1800.
- 58- Paster, B. J., W. Ludwig, W. G. Weisburg, E. Stackebrandt, R. B. Hespell, C. M. Hahn, H. Reichenbach, K. O. Stetter, and C. R. Woese. 1985. A phylogenetic grouping of the *Bacteroides*, *Cytophagas*, and certain *Flavobacteria*. *Syst. Appl. Microbiol.* 6:34-42.
- 59- Patel, G. B., C. R. Mackenzie, and B. J. Agnew. 1985. Properties and potential advantages of B-galactosidase from *Bacteroides polypragmatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22:114-120.
- 60- Pheulpin, P., Y. Tierny, M. Béchet, and J. B. Guillaume. 1988. Construction of new shuttle plasmid vectors for *Escherichia coli* - *Bacteroides* transgeneric cloning. *FEMS Microbiol. Lett.* 55:15-22.
- 61- Privitera, G., M. Sebald, and F. Fayolle. 1978. Common regulatory mechanism of expression and conjugative ability of a tetracycline resistance plasmid in *Bacteroides fragilis*. *Nature* 278:657-659.
- 62- Privitera, G., A. Dublanquet, and M. Sebald. 1979. Transfer of multiple antibiotic resistance between subspecies of *Bacteroides fragilis*. *J. Infect. Dis.* 139:97-101.

- 63- Pühler, A., W. Arnold, D. Horn, B. Jäckel, U. Priefer, R. Simon, and G. Weber. 1982. Genetic analysis of *Rhizobium meliloti* plasmids and *Rhizobium meliloti nif* genes. In Proceedings of the 8th North America Rhizobium Conference. pp 90-114. University of Manitoba Press, Winnipeg.
- 64- Rao, R. N., and S. G. Rogers. 1979. Plasmid pKC7: A vector containing ten restriction endonuclease sites suitable for cloning DNA segments. *Gene* 7:79-82.
- 65- Rasmussen, J. L., D. A. Odelson, and F. L. Macrina. 1986. Complete nucleotide sequence and transcription of *ermF*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinant from *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.* 168:523-533.
- 66- Rasmussen, J. L., D. A. Odelson, and F. L. Macrina. 1987. Complete nucleotide sequence of insertion element IS4351 from *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.* 169:3573-3580.
- 67- Robillard, N. J., F. P. Tally, and M. H. Malamy. 1985. Tn4400, a compound transposon isolated from *Bacteroides fragilis*, functions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 164:1248-1255
- 68- Rotstein, O. D., C. L. Wells, T. L. Pruett, J. J. Sorenson, and R. L. Simmons. 1987. Succinic acid production by *Bacteroides fragilis*. *Arch. Surg.* 22:93-98.
- 69- Salyers, A. A. 1984. *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol.* 38:293-313.
- 70- Salyers, A. A., Shoemaker, N. B., and E. P. Guthrie. 1987. Recent advances in *Bacteroides* genetics. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 14:49-70.
- 71- Schellhorn and C. W. Forsberg. 1984. Multiplicity of extracellular B-(1,4)-endoglucanases of *Bacteroides succinogenes* S85. *Can. J. Microbiol.* 30:930-937.
- 72- Sedallian, A. and J. Debruyères. 1987. Fréquences d'isolement et sensibilité aux antibiotiques des bactéries apparentées à *Bacteroides bivius* et *Bacteroides oralis*. *Path. Biol.* 5:586-589.
- 73- Shah, H. N., and M. D. Collins. 1988. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38:128-131.

- 74- Shigekawa, K., and W. J. Dower. 1988. Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: A general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques* 6:742-751.
- 75- Shoemaker, N. B., E. P. Guthrie, A. A. Salyers, and J. F. Gardner. 1985. Evidence that the clindamycin-erythromycin resistance gene of *Bacteroides* plasmid pBF4 is on a transposable element. *J. Bacteriol.* 162:626-632.
- 76- Shoemaker, N. B., C. Getty, J. F. Gardner, and A. A. Salyers. 1986. Tn4351 transposes in *Bacteroides* spp. and mediates the integration of plasmid R751 into the *Bacteroides* chromosome. *J. Bacteriol.* 165:929-936.
- 77- Shoemaker, N. B., C. Getty, E. P. Guthrie, and A. A. Salyers. 1986. Regions in *Bacteroides* plasmids pBFTM10 and pB8-51 that allow *Escherichia coli*-*Bacteroides* shuttle vectors to be mobilized by IncP plasmids and by a conjugative *Bacteroides* tetracycline resistance element. *J. Bacteriol.* 166:959-965.
- 78- Shoemaker, N. B., and A. A. Salyers. 1987. Facilitated transfer of IncPB R751 derivatives from the chromosome of *Bacteroides uniformis* to *Escherichia coli* recipients by a conjugative *Bacteroides* tetracycline resistance element. *J. Bacteriol.* 169:3160-3167.
- 79- Shoemaker, N. B. and A. A. Salyers. 1988. Tetracycline-dependent appearance of plasmidlike forms in *Bacteroides uniformis* 0061 mediated by conjugal *Bacteroides* tetracycline resistance elements. *J. Bacteriol.* 170:1651-1657.
- 80- Shoemaker, N. B., R. D. Barber and A. A. Salyers. 1989. Cloning and characterization of a *Bacteroides* conjugal tetracycline-erythromycin resistance element by using a shuttle cosmid vector. *J. Bacteriol.* 171:1294-1302.
- 81- Smith, C. J., R. A. Welch, and F. L. Macrina. 1982. Two independent conjugal transfer systems operating in *Bacteroides fragilis* V479-1. *J. Bacteriol.* 151:281-287.
- 82- Smith, C. J. and F. L. Macrina. 1984. Large transmissible clindamycin resistance plasmid in *Bacteroides ovatus*. *J. Bacteriol.* 158:739-741.

- 83- Smith, C. J. 1985. Characterization of *Bacteroides ovatus* plasmid pBI136 and structure of its clindamycin resistance region. *J. Bacteriol.* 161:1069-1073.
- 84- Smith, C. J. 1985. Development and use of cloning systems for *Bacteroides fragilis*: Cloning of a plasmid-encoded clindamycin resistance determinant. *J. Bacteriol.* 164:294-301.
- 85- Smith, C. J. 1985. Polyethylene-glycol-facilitated transformation of *Bacteroides fragilis* with plasmid DNA. *J. Bacteriol.* 164:466-469.
- 86- Smith, C. J. and H. Spiegel. 1987. Transposition of Tn4551 in *Bacteroides fragilis*: Identification and properties of a new transposon from *Bacteroides* spp. *J. Bacteriol.* 169:3450-3457.
- 87- Smith, C. J. 1987. Nucleotide sequence analysis of Tn4551: Use of *ermFS* operon fusions to detect promoter activity in *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.* 169:4589-4596.
- 88- Southern, J. A., J.R. Parker, and D. R. Woods. 1986. Expression and purification of glutamine synthetase cloned from *Bacteroides fragilis*. *J. Gen. Microbiol.* 132:2827-2835.
- 89- Speer, B. S., and A. A. Salyers. 1988. Characterization of a novel tetracycline resistance that functions only in aerobically grown *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170:1423-1429.
- 90- Speer, B. S., and A. A. Salyers. 1989. Novel aerobic tetracycline resistance gene that chemically modifies tetracycline. *J. Bacteriol.* 171:148-153.
- 91- Takahashi, N. 1982. Isolation and properties of dextranase from *Bacteroides oralis* Ig4a. *Microbiol. and Imm.* 26:375-386.
- 92- Takahashi, N., Y. Satoh, and K. Takamori. 1985. Subcellular localization of D-glucanase in *Bacteroides oralis* Ig4a. *J. Gen. Microbiol.* 131:1077-1082.
- 93- Tally, F. P., D. R. Snyderman, M. J. Shimell, and M. H. Malamy. 1982. Characterization of pBFTM10, a clindamycin-erythromycin resistance transfer factor from *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.* 151:686-691.

- 94- Taylor, K. A., B. Crosby, M. Gavin, C. Forsberg, and D. Y. Thomas. 1987. Characteristics of the endoglucanase encoded by a *cel* gene from *Bacteroides succinogenes* expressed in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:41-46.
- 95- Tierny, Y. 1988. Introduction du transposon Tn501 chez *Bacteroides distasonis*. Mémoire de DEA Sciences de la vie et de la santé, USTLFA.
- 96- Valentine, P. J., N. B. Shoemaker, and A. A. Salyers. 1988. Mobilization of *Bacteroides* plasmids by *Bacteroides* conjugal elements. *J. Bacteriol.* 170:1319-1324.
- 97- Van der Auwera, P., M. Labbe, W. R. Mayberry, K. P. Ferguson and D. W. Lambe, Jr. 1986. Identification of *Bacteroides* by cellular fatty acid profiles: Application to the routine microbiological laboratory. *J. Microbiol. Meth.* 4:267-275.
- 98- Van Steenberg, T. J. M., C. A. Vlaanderen, and J. de Graaff. 1981. Confirmation of *Bacteroides gingivalis* as a species distinct from *Bacteroides asaccharolyticus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31:236-241.
- 99- Van Steenberg, T. J. M., and J. de Graaff. 1986. Proteolytic activity of black-pigmented *Bacteroides* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 33:219-222.
- 100- Van Winkelhoff, A. J., T. J. M. van Steenberg, N. Kippuw, and J. de Graaff. 1985. Further characterization of *Bacteroides endodontalis*, an asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species from the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* 22:75-79.
- 101- Van Winkelhoff, A. J., T. J. M. Van Steenberg and J. De Graaff. 1988. The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections. *J. Clin. Periodont.* 15:145-155.
- 102- Wallace, B. L., J. E. Bradley, and M. Rogolsky. 1981. Plasmid analyses in clinical isolates of *Bacteroides fragilis* and other *Bacteroides* species. *J. Clin. Microbiol.* 4:383-388.
- 103- Welch, R. A., and F. L. Macrina. 1981. Physical Characterization of *Bacteroides fragilis* R plasmid pBF4. *J. Bacteriol.* 145:867-872.
- 104- Whitehead, T. R. and R. B. Hespell. 1989. Cloning and expression in *E. coli* of a xylanase gene from *Bacteroides ruminicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:893-896.



RESUME

Un vecteur navette s'exprimant chez *Escherichia coli* et *Bacteroides* a été construit par l'association d'un plasmide cryptique de 4.6 kb: pBF367 originaire d'une souche de *Bacteroides fragilis*, de pKC7: plasmide de 5.9 kb dérivé de pBR322 et du fragment *EcoRI*-B de pBFTM10.

Ce plasmide de 14.7 kb nommé pKBF367-1 confère la résistance à la clindamycine-érythromycine chez *Bacteroides* et à l'ampicilline, la kanamycine et la tétracycline chez *E. coli*. Ce vecteur est mobilisé par les plasmides des groupes d'incompatibilité ColE1 et P β ; il est transféré vers *Bacteroides distasonis* par conjugaison à la fréquence de 10^{-5} .

Des dérivés de pKBF367-1 d'une taille comprise entre 14.7 et 8.4 kb ont été réalisés.

Des délétions de ces plasmides au niveau du pBF367 inséré ont permis de localiser la région nécessaire à leur répllication chez *Bacteroides* ainsi que celle permettant leur mobilisation par R751.

Nous avons ensuite réalisé un vecteur navette à partir d'un plasmide cryptique d'une souche de *Bacteroides* du rumen. Ce vecteur mobilisé par pRK2013 est transféré par conjugaison et s'exprime chez *E. coli*, *B. distasonis*, et *B. ruminicola*.

L'insertion dans ces vecteurs de fragments de DNA originaires de bactéries aérobies et de *Bacteroides* a été réalisée. L'expression des gènes clonés y est discutée.

Ces résultats indiquent que ces plasmides peuvent être utilisés pour cloner des gènes de *Bacteroides* chez *E. coli* puis étudier leur expression dans des souches de *Bacteroides* hétérologues.