

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE I

Année 1998

N° d'ordre : 2248

# THESE

de DOCTORAT D'UNIVERSITE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

présentée par

**Catherine DANIEL**

**METABOLISME DU FER**

**CHEZ *BILOPHILA WADSWORTHIA* ET**

***ACINETOBACTER BAUMANNII***

ETUDE DES MECANISMES DE CAPTATION DU FER

CLONAGE ET SEQUENCAGE D'UN GENE *FUR*-LIKE CHEZ

*A. BAUMANNII*

Présentée le 23 Mars 1998 devant la commission d'examen

JURY

Président:	Professeur G. Spik
Rapporteurs:	Professeur J.P. Flandrois Professeur Y. Piemont
Examineurs:	Professeur R. Blondeau Professeur R. Courcol



---

*A Jean-Luc.*

*A mes parents.*

*A mes grands-parents.*

*à toute ma famille.*

*à mes amis.*

---

---

*Je tiens à exprimer ici ma profonde reconnaissance à tous  
ceux qui m'ont soutenue, aidée et qui m'ont accordé leur confiance  
tout au long de ces 4 années de recherches.*

---

**« Le peu que je sache, je veux le faire connaître afin qu'un autre, meilleur que je suis, découvre la vérité, et que l'œuvre qu'il poursuit sanctionne mon erreur. Je m'en réjouirai pour avoir été, malgré tout, cause que cette vérité se fasse jour »**

Albrecht Durer

Je tiens tout particulièrement à remercier:

**Monsieur le Professeur Courcol;** vous m'avez accueillie au sein de votre laboratoire pour le DEA puis pour préparer cette thèse de sciences. Je vous remercie d'avoir accepté de m'accompagner dans mes premiers pas en recherche. Vous m'avez soutenue dans des moments très importants. Vous m'avez toujours fait confiance pour mener à bien mes travaux. J'espère que mon parcours scientifique à venir vous fera toujours honneur.

**Monsieur le Professeur Simonet;** vos connaissances et vos discussions scientifiques ainsi que vos remarques constructives sur mon travail m'ont beaucoup apporté.

**Madame Bissinger;** Nous avons travaillé ensemble pendant cette thèse avec un réel plaisir personnel. Je te remercie pour ton aide précieuse pendant ces quatre années. J'admire ta disponibilité de tout instant et ta bonne humeur de tous les jours.

**Madame Haentjens;** Je te remercie de m'avoir fait part de ton amicale contribution et de ta précieuse expérience.

Je remercie Monsieur C. Vandeperre qui a assuré tout l'icônographie nécessaire au long de la thèse.

Je remercie Monsieur le Docteur Vasil pour sa collaboration et pour nous avoir fourni l'antisérum anti-Fur développé chez *E. coli*.

Je remercie tous mes collègues qui m'ont supportée. Qu'ils sachent que c'est grâce à eux que j'ai toujours apprécié à m'adonner à mon travail de recherche dans la bonne humeur.

Je remercie pour l'honneur qu'ils me font:

**Madame le Professeur G. Spik**

en acceptant de présider ce jury;

**Monsieur le Professeur J.P. Flandrois**

**Monsieur le Professeur Y. Piemont**

en acceptant d'être les rapporteurs de cette thèse;

**Monsieur le Professeur R. Blondeau**

**Monsieur le Professeur R. Courcol**

qui ont bien voulu juger ce travail.

Ce travail a été possible grâce au financement apporté durant les deux premières années de Thèse par la Commission Hospitalo-Universitaire de Lille et grâce au financement apporté par l'Université de Lille II pendant la troisième année de Thèse.

## SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE</b> .....	7
<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS</b> .....	13
<b>ANNEXE I: ABRÉVIATIONS UTILISÉES</b> .....	16
<b>ANNEXE II: SYMBOLES UTILISÉS POUR LES BASES NUCLÉIQUES</b> .....	18
<b>ANNEXE III: SYMBOLES UTILISÉS POUR LES ACIDES AMINÉS</b> .....	19
<b>INTRODUCTION</b> .....	20
<b>GÉNÉRALITÉS</b> .....	22
1. LE FER DANS L'ORGANISME HUMAIN .....	22
1.1. <i>Le rôle essentiel du fer</i> .....	22
1.2. <i>La répartition du fer</i> .....	24
1.3. <i>Propriétés des protéines impliquées dans le transport et la réserve du fer</i> .....	24
1.3.1. L'hémoglobine.....	24
1.3.2. La ferritine .....	26
1.3.3. La transferrine et la lactoferrine .....	26
1.4. <i>L'hyposidérémie de l'infection</i> .....	28
2. LES SYSTÈMES BACTÉRIENS DE CAPTATION DU FER.....	29
2.1. <i>La membrane externe des bactéries à Gram négatif</i> .....	29
2.2. <i>Systèmes de haute affinité: les sidérophores</i> .....	32
2.2.1. Les sidérophores: définition .....	33
2.2.2. Détection des sidérophores .....	34
2.2.3. Le prototype: <i>Escherichia coli</i> .....	35
2.2.3.1. Qu'arrive-t-il quand un sidérophore est reconnu par son récepteur ?.....	35
2.2.3.2. Qu'arrive-t-il quand un sidérophore est à l'intérieur des cellules?.....	37
2.3. <i>Utilisation des composés riches en fer de l'hôte</i> .....	38
2.3.1 Utilisation de la transferrine et de la lactoferrine .....	38
2.3.1.1. Acquisition du fer par l'intermédiaire de récepteurs.....	38

2.3.1.2. Modèle schématique d'acquisition du fer par l'intermédiaire des "transferrin-binding proteins" .....	40
2.3.2 Utilisation des composés hémiques .....	40
2.3.2.1. Acquisition de l'hème par l'intermédiaire d'un récepteur .....	42
2.3.2.2. L'acquisition de l'hème et les lipopolysaccharides (LPS) .....	45
2.3.2.3. Comparaison avec les récepteurs bactériens de la transferrine et de la lactoferrine de l'hôte .....	46
2.4. Réduction du fer ferrique et transport du fer ferreux .....	46
2.5. Les systèmes de transport du fer et la virulence .....	47
2.6. Exemples de systèmes de captation du fer .....	49
2.6.1. Introduction .....	49
2.6.2. <i>A. baumannii</i> : modèle d'étude des bactéries aérobies strictes .....	50
2.6.2.1. Présentation de <i>A. baumannii</i> .....	50
2.6.2.2. La virulence de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	51
2.6.2.3. Le rôle du fer dans la virulence de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	52
2.6.2.3.1. Sécrétion d'un sidérophore de faible affinité pour le fer .....	52
2.6.2.3.2. Caractérisation d'un système de transport du fer de haute affinité .....	53
2.6.2.3.3. Caractérisation d'un nouveau sidérophore: l'acinétobactine .....	54
2.6.3. <i>Bilophila wadsworthia</i> : modèle d'étude des anaérobies strictes .....	54
2.6.3.1. Les infections anaérobies .....	54
2.6.3.2. La captation du fer par les bactéries anaérobies strictes .....	55
2.6.3.3. Présentation de <i>B. wadsworthia</i> .....	56
3. RÉGULATION DES GENES DE VIRULENCE PAR LE FER .....	61
3.1. Le fer en tant que signal régulateur de l'expression des facteurs de virulence .....	61
3.2. Mécanismes de contrôle transcriptionnel et post-transcriptionnel des gènes régulés par le fer .....	63
3.2.1. Répression de l'expression des gènes par le complexe Fer-Fur dans des conditions riches en fer .....	63
3.2.1.1. isoléments de mutants <i>fur</i> .....	63
3.2.1.2. La protéine Fur: protéine régulatrice de la transcription .....	64
3.2.1.3. Domaines fonctionnels de Fur .....	66
3.2.1.4. Rôle multifonctionnel de Fur .....	66
3.2.2. Activation de l'expression des gènes dans des conditions de carence en fer .....	67
3.2.2.1. Un exemple de régulation complexe de captation du fer chez <i>V. anguillarum</i> .....	68



3.2.2.2. Régulation d'une protéine de la membrane externe par le fer chez <i>V. cholerae</i>	68
3.2.3. Mécanisme de contrôle post-transcriptionnel des gènes régulés par le fer	69
3.3. Conclusion	70
<b>STRATEGIE</b>	<b>71</b>
1. DONNEES PRELIMINAIRES	71
1.1. Rappel des travaux du DEA: <i>Bilophila wadsworthia</i>	71
1.2. Etude de <i>A. baumannii</i>	73
2. OBJECTIFS DES TRAVAUX	73
3. STRATÉGIE D'ÉTUDE	75
3.1. Etude de l'adaptation de <i>B. wadsworthia</i> et <i>A. baumannii</i> en milieu carencé en fer	75
3.1.1. Etude de <i>B. wadsworthia</i>	75
3.1.2. Etude de <i>A. baumannii</i>	76
3.1.3. Conclusion	76
3.2. Identification du gène qui code une protéine Fur-like chez <i>B. wadsworthia</i> et <i>A. baumannii</i>	79
3.2.1. Détection d'une protéine Fur-like	79
3.2.2. Clonage du gène <i>fur</i> -like chez <i>B. wadsworthia</i> et <i>A. baumannii</i>	79
3.2.2.1. PCR utilisant des amorces dégénérées	82
3.2.2.2. PCR utilisant des amorces internes	86
3.2.2.3. Criblage de la mini-banque <i>HindIII</i> - <i>ClaI</i> de <i>A. baumannii</i>	86
3.2.2.4. Clonage et séquençage complet du gène <i>fur</i> -like de <i>A. baumannii</i>	87
<b>RESULTATS</b>	<b>88</b>
1. INFLUENCE DU FER SUR <i>B. WADSWORTHIA</i>	88
1.1. Etude de la croissance de <i>B. wadsworthia</i> en milieu carencé en fer	88
1.1.1. Présentation du travail	88
1.1.2. Article: Effect of iron depletion on protein profiles of <i>B. wadsworthia</i>	90
1.1.3. Résumé	92
1.2. Influence de diverses sources de fer sur la croissance et l'expression des protéines de la membrane externe de <i>B. wadsworthia</i>	94

1.2.1. Présentation du travail .....	94
1.2.2. Article: Effects of host iron transport compounds on growth kinetics and outer membrane expression of <i>B. wadsworthia</i> .....	96
1.2.3. Résumé .....	124
<b>2. ADAPTATION DE <i>A. BAUMANNII</i> EN CONDITIONS DE CARENCE EN FER: CLONAGE ET SÉQUENÇAGE DU GÈNE <i>FUR</i> HOMOLOGUE.....</b>	<b>126</b>
2.1. <i>Présentation du travail</i> .....	126
2.2. <i>Article: Characterization of the Acinetobacter baumannii Fur regulator: cloning and sequencing of the fur homolog gene</i> .....	128
2.3. <i>Résumé</i> .....	160
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>163</b>
<b>1. ADAPTATION DE <i>B. WADSWORTHIA</i> ET <i>A. BAUMANNII</i> EN MILIEU CARENCE EN FER .....</b>	<b>163</b>
1.1. <i>B. wadsworthia</i> .....	163
1.1.1. Différents mécanismes de captation du fer.....	163
1.1.1.1. Mécanismes de captation du fer à partir de l'hémoglobine .....	164
1.1.1.2. Mécanismes de captation du fer à partir de la transferrine .....	164
1.1.2. Hypothèses sur les fonctions des protéines de la membrane externe réprimées par le fer .....	165
1.1.2.1. Porines et canaux spécifiques.....	166
1.1.2.2. Récepteurs .....	166
1.1.2.2.1. Récepteurs des protéines de l'hôte.....	166
1.1.2.2.2. Récepteurs de sidérophores exogènes.....	167
1.1.3. Caractérisation de la protéine de la membrane externe de 190 kDa régulée par le fer.....	168
1.1.3.1. Technique d'hybridation soustractive .....	168
1.1.3.2. Technique de RAP-PCR.....	169
1.1.4. Conclusion .....	169
1.2. <i>A. baumannii</i> .....	172
<b>2. RÉGULATION DES MÉCANISMES DE CAPTATION DU FER.....</b>	<b>173</b>
2.1. <i>Recherche d'un gène fur homologue chez les bactéries anaérobies strictes</i> .....	174
2.2. <i>Identification et analyse de la séquence du gène fur homologue chez A. baumannii</i> .....	176

2.3. Similarités de séquence avec la protéine PilU de <i>P. aeruginosa</i> .....	177
<b>APPENDICE TECHNIQUE.....</b>	<b>178</b>
1. CROISSANCE ET ADAPTATION DES BACTERIES EN MILIEU CARENCÉ EN FER.....	178
1.1. Souches bactériennes et conditions de culture .....	178
1.1.1. <i>Bilophila wadsworthia</i> .....	178
1.1.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	179
1.2. Milieu de culture carencé en fer .....	179
1.3. Détection des sidérophores .....	181
1.4. Préparation des protéines de la membrane externe .....	181
1.4.1. Protocole d'extraction.....	181
1.4.2. Exposition des cellules à la protéinase K .....	183
1.5. Etude des protéines .....	183
1.5.1. Dosage des protéines .....	183
1.5.2. PAGE-SDS.....	183
1.6. Western blots.....	184
1.6.1. Réalisation d'un sérum polyclonal de lapin anti- <i>B. wadsworthia</i> .....	184
1.6.2. Immunoblot.....	185
1.7. Purification de la protéine de <i>B. wadsworthia</i> .....	185
1.8. Préparation de la protéine de 190 kDa au microséquençage .....	186
2. CLONAGE .....	188
2.1. Purification de l'ADN génomique.....	188
2.1.1. Lyse bactérienne .....	188
2.1.2. Précipitation des protéines cellulaires .....	188
2.1.3. Précipitation de l'ADN.....	188
2.1.4. Détermination de la quantité et de la pureté de l'ADN .....	189
2.2. Amplification élective.....	189
2.2.1. Principe .....	189
2.2.2. Les réactifs, le matériel utilisé et généralités.....	189
2.2.3. Réactions.....	190
2.3. Clonage des fragments amplifiés .....	191
2.3.1. Purification des fragments .....	191
2.3.2. Clonage en vecteur plasmidique T/A.....	192

2.3.2.1. Principe.....	192
2.3.2.2. Ligation.....	192
2.3.2.3. Transformation.....	193
2.3.2.4. Détection des clones recombinants.....	193
2.4. <i>Sous clonage en vecteur plasmidique pKS</i> .....	194
2.4.1. Hydrolyse du vecteur.....	194
2.4.2. Déphosphorylation.....	194
2.4.3. Ligation.....	194
2.4.4. Transformation.....	195
2.4.5. Recherche des clones d'intérêt.....	195
2.4.5.1. Empreintes plasmidiques.....	195
2.4.5.2. Hybridation à une sonde nucléique.....	195
2.5. <i>Préparation de l'ADN plasmidique recombinant</i> .....	196
2.5.1. Lyse bactérienne par un détergent.....	196
2.5.2. Purification de l'ADN plasmidique.....	196
2.5.3. Elution de l'ADN de la matrice.....	197
2.5.4. Détermination de la taille des inserts.....	197
2.6. <i>Sonde nucléique</i> .....	197
2.6.1. Sonde d'ADN : technique du multi-amorçage.....	197
2.6.2. Marquage en 3'OH d'un oligonucléotide.....	198
2.7. <i>Southern Blots</i> .....	198
2.7.1. Transfert.....	198
2.7.2. Hybridation.....	199
2.7.2.1. Sonde double brin.....	199
2.7.2.2. Sonde oligonucléotidique.....	199
2.7.3. Lavages et détection par chimioluminescence.....	199
2.8. <i>Dots blots</i> .....	201
2.8.1. Dénaturation, neutralisation et fixation du matériel génétique.....	201
2.8.2. Hybridation.....	201
2.8.3. Lavages et détection par chimioluminescence.....	201
2.9. <i>Séquençage nucléotidique</i> .....	202
2.10. <i>Analyse des séquences</i> .....	203
<b>COMPOSITION DES TAMPONS</b> .....	<b>204</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>206</b>

## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Ce travail a fait l'objet des publications et communications suivantes:

### Publications

Effect of iron-depletion on protein profiles of *Bilophila wadsworthia*

**Daniel, C.,** Baron, E.J. and Courcol, R.J. (1995). **Clin. Infect. Dis.** 20: S158-9.

Effects of host iron transport compounds on growth kinetics and outer membrane protein expression of *Bilophila wadsworthia*

**Daniel, C.,** Bissinger, M.C. and Courcol, R.J. (1998).

Soumis pour publication après corrections à Anaerobe

Characterization of the *Acinetobacter baumannii* Fur regulator: cloning and sequencing of the *fur* homolog gene

**Daniel, C.,** Haentjens, S., Bissinger, M.C. and Courcol, R.J. (1998).

Soumis pour publication à Journal of Bacteriology

**Communications écrites (affiches):**

The anaerobic iron uptake of *Bilophila wadsworthia*

**Daniel, C.**, Simonet, M. and Courcol, R.J. 96th General Meeting of the American Society for Microbiology, New Orleans, Louisiana, 19-23 May 1996.

Le métabolisme du fer chez *Bilophila wadsworthia*

**Daniel, C.** et Courcol, R.J. Congrès des Microorganismes Anaérobies, Société Française de Microbiologie, Lille, 20-21 Mars 1997.

Studies of the iron metabolism of *Acinetobacter baumannii*: cloning and sequence analysis of the *fur* homolog gene

**Daniel, C.**, Haentjens, S., Bissinger, M.C. and Courcol, R.J. 98th General Meeting of the American Society for Microbiology, Atlanta, 17-21 May 1998. (soumis)

**Communications orales:**

Effect on iron-depletion on protein profiles of *Bilophila wadsworthia*

**Daniel, C., Baron, E.J. and Courcol, R.J.** 2nd North American Congress on Anaerobic Bacteria and Anaerobic Infections, Marina del Rey, 29-31 July 1994.

**Daniel, C. et Courcol, R.J.** XXIV Forum des Jeunes Chercheurs de la Société Française de Biochimie et Biologie moléculaire (8-11 Juillet 1997-Corte, Corse).

## Annexes

---

---



**ANNEXE I: ABREVIATIONS UTILISEES**

<b>ADHB</b>	Acide 2-3-dihydroxybenzoïque
<b>ADN</b>	Acide Déoxyribonucléique
<b>EDDA</b>	Acide éthylènediamine-di-O-hydroxyphénylacétique
<b>AMP</b>	Adenosine monophosphate
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>ATP</b>	Adenosine triphosphate
<b>ATPase</b>	ATP synthétase
<b>BCP</b>	Bromocrésol pourpre
<b>BEt</b>	Bromure d'éthidium
<b>C-terminal</b>	Carboxy-terminal
<b>CAP</b>	Catabolite activator protein
<b>ddNTP</b>	Didéoxynucléotide triphosphate
<b>DIG</b>	Digoxigénine
<b>DNase</b>	Déoxyribonucléase
<b>dNTP</b>	Déoxynucléotide triphosphate
<b>DO</b>	Densité optique
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EDTA</b>	Acide éthylène diamine tétraacétique
<b>HCl</b>	Acide chlorydrique
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
<b>kb</b>	kilobase ( $10^3$ bases)
<b>LB</b>	Milieu Luria Bertani
<b>LBP</b>	Lactoferrin binding protein
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>MOPS</b>	Acide-3--(N-morpholino)-propane sulfonique
<b>MCD</b>	Milieu chimiquement défini

<b>N-terminal</b>	Amino-terminal
<b>NaCl</b>	Chlorure de sodium
<b>NADH</b>	Nicotinamide-Adénine-Dinucléotide
<b>NaOH</b>	Hydroxyde de sodium
<b>PAGE</b>	Polyacrylamide gel electrophoresis
<b>pb</b>	Paire de base
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonyl fluoride
<b>PVDF</b>	Polyvinylidène difluorure
<b>qsp</b>	Quantité suffisante pour
<b>RNase</b>	Ribonucléase
<b>SAB</b>	Sérumalbumine bovine
<b>SDS</b>	Sodium Dodécyl Sulfate
<b>SSC</b>	Standard Sodium Citrate
<b>SSPE</b>	Standard Sodium Phosphate EDTA
<b>TBE</b>	Tris Borate EDTA
<b>TBP</b>	Transferrin binding protein
<b>TE</b>	Tris EDTA
<b>TEA</b>	Tris EDTA Acetate
<b>TLCK</b>	N alpha-p-Tosyl-L-Lysine Chloro-méthyl cétone
<b>Tm</b>	Température de fusion
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -galactoside

## ANNEXE II: SYMBOLES UTILISES POUR LES BASES NUCLEIQUES

<b>Les symboles utilisés pour les bases</b>		<b>Signification</b>
<b>A</b>		Adénine
<b>C</b>		Cytosine
<b>G</b>		Guanine
<b>T</b>		Thymidine
<b>U</b>		Uracile (dans l'ARN)
<b>Y</b>	C ou T (U)	pYrimidine
<b>R</b>	A ou G	puRine
<b>M</b>	A ou C	aMino
<b>K</b>	G ou T (U)	Keto
<b>S</b>	G ou C	Strong interaction (3 ponts hydrogènes)
<b>W</b>	A ou T (U)	Weak interaction (2 ponts hydrogènes)
<b>H</b>	A ou C ou T (U)	pas G; <b>H</b> suit le G dans l'alphabet
<b>B</b>	G ou T (U) ou C	pas A; <b>B</b> suit le A dans l'alphabet
<b>V</b>	G ou C ou A	ni T, ni U; <b>V</b> suit le U dans l'alphabet
<b>D</b>	G ou T (U) ou A	pas C; <b>D</b> suit le C dans l'alphabet
<b>N</b>	G, A, C ou T (U)	aNy

### ANNEXE III: SYMBOLES UTILISES POUR LES ACIDES AMINES

Les acides aminés et leurs symboles			Codons						
A	Ala	Alanine	GCA	GCC	GCG	GCU			
C	Cys	Cystéine	UGC	UGU					
D	Asp	Acide aspartique	GAC	GAU					
E	Glu	Acide glutamique	GAA	GAG					
F	Phe	Phénylalanine	UUC	UUU					
G	Gly	Glycine	GGA	GGC	GGG	GGU			
H	His	Histidine	CAC	CAU					
I	Ile	Isoleucine	AUA	AUC	AUU				
K	Lys	Lysine	AAA	AAG					
L	Leu	Leucine	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU	
M	Met	Méthionine	AUG						
N	Asn	Asparagine	AAC	AAU					
P	Pro	Proline	CCA	CCC	CCG	CCU			
Q	Gln	Glutamine	CAA	CAG					
R	Arg	Arginine	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU	
S	Ser	Sérine	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU	
T	Thr	Thréonine	ACA	ACC	ACG	ACU			
V	Val	Valine	GUA	GUC	GUG	GUU			
W	Trp	Tryptophane	UGG						
Y	Tyr	Tyrosine	UAC	UAU					
B	Asx	Acide aspartique ou Asparagine							
Z	Glx	Acide glutamique ou Glutamine							

# Introduction

---

---

## INTRODUCTION

« Il n'y a pas de métal plus essentiel à la vie que le fer. Par son accumulation au centre des étoiles, il déclenche l'explosion des supernovae et permet ainsi la dispersion dans tout le cosmos des atomes vitaux de la vie »

Michael Denton, *L'évolution a-t-elle un sens ?*, 1997

Le fer est quantitativement le quatrième élément sur terre. Cependant, à l'état libre, le fer ferreux, en présence d'oxygène, génère des radicaux hydroxydes toxiques pour les constituants cellulaires. Le fer ferrique est très peu soluble. Les organismes supérieurs ont donc développé des mécanismes pour réduire les niveaux de fer libre bien en dessous des niveaux requis pour la croissance bactérienne. Les bactéries pathogènes, afin de survivre chez l'hôte, ont développé des mécanismes de captation du fer face à une très faible disponibilité en fer libre *in vivo*. Pour les bactéries pathogènes, ces systèmes de captation du fer sont requis pour la virulence. En effet, le fer ou le manque de fer, joue un rôle important dans l'interaction entre le pathogène et l'hôte. Le niveau très faible en fer présent chez l'hôte sert de signal à la bactérie pour réguler l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans les mécanismes de capture du fer et la virulence.

Afin de comprendre comment un pathogène survit chez l'hôte, il est nécessaire d'étudier l'adaptation de ce pathogène dans des conditions de carence martiale similaires à celles observées *in vivo*. *Bilophila wadsworthia* et *Acinetobacter baumannii* sont les deux modèles bactériens présentés dans ce mémoire. *B. wadsworthia* est une bactérie pathogène anaérobie stricte, à Gram négatif, retrouvée essentiellement dans des infections intra-abdominales. Les mécanismes de virulence de cette bactérie sont inconnus. *A. baumannii* est une bactérie aérobie stricte à Gram négatif. Cette bactérie est un pathogène nosocomial important qui joue un rôle primordial dans la colonisation et l'infection des patients admis

à l'hôpital. *A. baumannii* est isolé dans de nombreux types d'infections opportunistes, incluant des septicémies, des pneumonies, des endocardites, des méningites, des infections de la peau et des plaies, et des infections du tractus urinaire. Peu de travaux sur les mécanismes de virulence associés à la captation du fer ont été réalisés. Dans un premier temps, le but de notre travail a été d'étudier *B. wadsworthia* et *A. baumannii* dans des conditions de carence en fer et nous a permis de déterminer les effets de cette restriction sur l'expression de certains facteurs de virulence, notamment le développement de différents moyens de captation du fer.

Ceci nous a conduit à rechercher dans la deuxième partie de notre travail l'existence d'un gène codant un régulateur de l'expression des gènes impliqués dans les différents systèmes de captation du fer chez *B. wadsworthia* et *A. baumannii*. Le fer lui-même joue un rôle primordial. Des concentrations élevées en fer induisent une répression de l'expression des gènes impliqués dans la captation du fer chez les bactéries; ceci se produit en conjonction avec la protéine Fur qui agit comme un répresseur en coordination avec le fer.

## Généralités

---

---



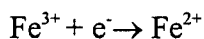
## GENERALITES

### 1. LE FER DANS L'ORGANISME HUMAIN

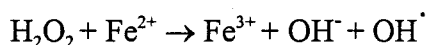
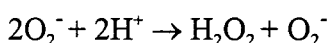
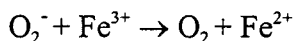
#### 1.1. Le rôle essentiel du fer

Le fer est le métal de transition le plus abondant dans les organismes vivants avec un rôle essentiel dans de nombreux systèmes biologiques. A l'exception des bactéries lactiques dont la croissance n'est pas stimulée par la présence de fer (**Reichard et Ehrenberg, 1983**), tous les systèmes biologiques ont un besoin absolu en fer compris entre 0.4-4.0 $\mu$ M (**Payne, 1993**). En effet, le fer est un cofacteur essentiel de la ribonucléotide réductase, de l'ARN polymérase III, des dioxygénases et des enzymes qui participent au métabolisme de l'oxygène dans les cellules de mammifères et de bactéries comme la superoxyde dismutase, la catalase et la peroxydase (**Reichard et Ehrenberg, 1983**). Le fer est également nécessaire pour l'action des cytochromes, des hydrogénases, des ferrédoxines et des succinates déshydrogénases impliqués dans les transferts d'électrons. Chez les vertébrés, le fer intervient aussi dans les fonctions neutrophiles, les activités T et B-lymphocytaires et les cellules "natural killers" (**Weiss *et al.*, 1995**).

Le fer, de même que la série des métaux de transition comme le manganèse et le cobalt, peut être trouvé dans une grande variété d'états d'oxydation allant de -2 à +6, les états d'oxydation les plus connus étant les états d'ions ferriques (+3) et ferreux (+2). Seuls ces deux derniers états d'oxydation du fer sont stables en solution aqueuse et coexistent dans les conditions physiologiques selon l'équation suivante (**Wooldridge et Williams, 1993**):



Le fer est un composant central dans la chimie de Haber-Weiss-Fenton. Il catalyse la production, à partir de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, des radicaux hydroxydes très réactifs qui réagissent avec la plupart des molécules biologiques (**Griffiths et al., 1988**):



Ces radicaux hydroxydes sont impliqués en particulier dans la coupure de l'ADN et la destruction des membranes biologiques par peroxydation des lipides (**Braun, 1997**). Le peroxyde d'hydrogène est en grande partie éliminé chez les organismes aérobies par la glutathion peroxydase et par la catalase. Les anions superoxydes sont en grande partie éliminés par la superoxyde dismutase (**Griffiths et al., 1988**). Les systèmes biologiques néanmoins produisent du peroxyde d'hydrogène et des anions superoxydes à des niveaux détectables et donc doivent limiter leur niveau en fer libre disponible (**Braun, 1997**).

En raison de la très faible solubilité du fer ferrique et le besoin d'éviter sa participation dans des réactions chimiques potentiellement préjudiciables, les organismes supérieurs ont développé des mécanismes pour réduire les niveaux de fer libre bien en dessous des niveaux requis pour la croissance bactérienne. Le fer est réduit en fer ferreux à l'intérieur des cellules, ou maintenu sous forme soluble complexé à des molécules porteuses ou de transport.

## 1.2. La répartition du fer

Le fer est essentiellement réparti dans l'organisme humain au niveau intracellulaire comme illustré sur le tableau I.

Chez l'homme, la quantité de fer présente est de l'ordre de 3 à 5 g. La majorité du fer est intracellulaire, soit complexé à des métalloprotéines comme l'hémoglobine (74,3%), ou mis en réserve dans une protéine de réserve telle la ferritine (16,4%) (Worwood, 1997). Les traces de fer présentes au niveau extracellulaire sont liées aux glycoprotéines ayant une très forte affinité pour le fer: la transferrine dans le sérum et la lymphe, et la lactoferrine dans les cellules phagocytaires et les sécrétions des muqueuses (Otto *et al.*, 1992).

## 1.3. Propriétés des protéines impliquées dans le transport et la réserve du fer

Les principales protéines impliquées dans le transport et la réserve du fer sont l'hémoglobine, la ferritine, la transferrine et la lactoferrine.

### 1.3.1. L'hémoglobine

L'hémoglobine, protéine intracellulaire riche en fer, est la protéine hémique la plus abondante dans le corps humain. La catalase, les peroxydases, certaines oxygénases et des transporteurs d'électrons comme les cytochromes sont d'autres protéines hémiques. L'hémoglobine, constituée de chaînes polypeptidiques appelées chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , fixe l'oxygène dans les globules rouges. Le résidu hémique de l'hémoglobine est situé dans une poche hydrophobe au niveau de chaque chaîne polypeptidique. La molécule complète a une masse moléculaire de 64450 (Otto *et al.*, 1992).

Protéine	Localisation intracellulaire	Localisation extracellulaire	Contenu en fer (mg)
Hémoglobine	globules rouges		3000
Myoglobine	muscle		400
Cytochromes et autres protéines hémiques	tout type de tissu		50
Transferrine Lactoferrine		plasma, lymphe salive, larmes, sécrétions nasales, mucus cervical, lait, liquide séminal et intestinal, colostrum, neutrophiles	5
Ferritine et hémosidérine	foie, rate, moelle		0-1000

Tableau 1: Distribution du fer dans le corps humain (Worwood, 1997; Otto *et al.*, 1992)

Dans le sang, l'haptoglobine (masse moléculaire 100000) se lie à l'hémoglobine libre relarguée par la lyse des érythrocytes. Le complexe qui en résulte contient approximativement 0,2% du fer total de l'organisme. Il est rapidement retiré de la circulation par des cellules du système réticulo-endothélial. De la même façon, les deux protéines du sérum, hémopexine (masse moléculaire 57000) et albumine (masse moléculaire 43000), se lient à l'hème produit par dissociation et oxydation de l'hémoglobine. Ce phénomène peut arriver si l'haptoglobine circulante est saturée. Les complexes hème-hémopexine sont retirés de la circulation par les cellules hépatiques parenchymateuses. Les complexes hème-albumine, cependant, continuent à circuler jusqu'à ce que l'hème soit transféré à l'apohémopexine. La synthèse d'hémopexine est accrue pendant l'inflammation, ce qui stimule la capacité de l'hôte à fixer de l'hème libre (Ponka, 1997).

### 1.3.2. La ferritine

Les ferritines sont des protéines de réserve du fer présentes dans la plupart des tissus animaux. Ces protéines sont solubles dans l'eau, ont un contenu élevé et variable en fer, et sont présentes dans les espaces extramitochondriaux de la cellule. La molécule de ferritine est composée d'une micelle fer hydroxyde-phosphate et d'une structure protéique constituée de multiple sous-unités (l'apoferritine). L'apoferritine est composée de 24 sous-unités et est capable de contenir approximativement 4500 atomes de fer. L'hémosidérine, produit de dégradation de la ferritine, est présente dans les lysosomes (Otto *et al.*, 1992).

### 1.3.3. La transferrine et la lactoferrine

Les transferrines sont des glycoprotéines extracellulaires liant le fer avec des masses moléculaire variant de 75000 à 80000. Ces molécules sont présentes dans les liquides biologiques sous formes de lactoferrine et de transferrine. Ces protéines ont une homologie de 49,8% au niveau de leur séquence peptidique. La transferrine se trouve principalement dans le sang alors que la lactoferrine est présente à la fois au niveau

intracellulaire dans les neutrophiles et dans diverses sécrétions (Tableau 1) (**Otto et al, 1992**). Les transferrines sont des agents bactériostatiques et, dans le cas de la transferrine, ont une fonction de distribution du fer à différents tissus. La transferrine et la lactoferrine ont la capacité de fixer deux atomes de fer ferrique en association avec la fixation d'un anion, la plupart du temps le bicarbonate. Ces deux glycoprotéines fixant le fer sont partiellement saturées en fer (30-40%) dans l'organisme (**Williams et Griffiths, 1992**).

Dans le sérum normal, la quantité de fer libre en équilibre avec le fer lié à la transferrine a été calculée par Bullen *et al.* et est approximativement de  $10^{-18}$  M (**Bullen, 1981**). Cette valeur est bien en dessous du niveau requis pour la croissance bactérienne. Dans le cas de la transferrine, sa capacité de fixation du fer est réduite à un pH inférieur à 6 alors que la lactoferrine maintient sa capacité de fixer le fer dans des conditions plus acides (stable jusque pH 4) (**Otto et al., 1992**).

La fixation du fer à la transferrine entraîne des changements de conformation de la protéine qui devient alors plus compacte et son point isoélectrique augmente. Elle est plus résistante à la dégradation protéolytique (**Gray-Owen et Schryvers, 1996**). Les cellules de mammifères acquièrent le fer via un récepteur impliquant l'internalisation de la transferrine et la libération du fer dans l'endosome (**Huebers et Finch, 1987**).

Le fer complexé à l'hémoglobine, mis en réserve dans la ferritine ou lié aux transferrines, crée un environnement carencé en fer pour des micro-organismes envahisseurs. Ces niveaux déjà faibles en fer dans le sang et les tissus de l'hôte sont encore réduits, en réponse à la présence de micro-organismes envahisseurs, par un ensemble de réactions connues sous le nom de réponse hyposidérémique (**Wooldridge et Williams, 1993**).

#### 1.4. L'hyposidérémie de l'infection

Les mécanismes de la réponse hyposidérémique, mis en place en réponse à l'invasion de micro-organismes, ne sont pas entièrement élucidés mais sont très probablement médiés par une cytokine, l'interleukine-1, libérée par les macrophages ou les monocytes après stimulation par les micro-organismes ou par certains produits microbiens (comme l'endotoxine par exemple). La dégranulation des polynucléaires neutrophiles et la libération de lactoferrine sont des mécanismes susceptibles d'entraîner la réponse hyposidérémique; à un faible pH, la lactoferrine libère le fer de la transferrine du sérum et est ensuite retirée de la circulation par les cellules du système réticulo-endothélial (Weiss *et al.*, 1995). Ce mécanisme est susceptible d'être important aux sites de l'inflammation mais ne peut probablement pas expliquer la réduction observée des concentrations en fer du sérum de la circulation générale. De très faibles quantités d'endotoxine ou d'interleukine-1 entraînent une chute de la concentration en fer dans le sérum sans réduction correspondante du pH. Au pH physiologique, le fer n'est pas facilement échangeable entre la transferrine et la lactoferrine (Otto *et al.*, 1992).

Le mécanisme le plus probable expliquant l'hyposidérémie serait dû à une réduction du transfert du fer des tissus à la transferrine du sérum; ceci résulte d'une synthèse accrue de ferritine en réponse directe à une stimulation par l'interleukine-1 (Konijn et Hershko, 1989). De plus, le taux de dénaturation de ferritine en hémosidérine augmente pendant l'infection. Ceci est probablement dû aux effets des médiateurs intracellulaires de l'inflammation sur la membrane lysosomale. La synthèse accrue de ferritine ainsi que sa dégradation en hémosidérine rendent le fer moins disponible au "réservoir labile" intracellulaire et donc à la transferrine du sérum. De plus, l'absorption intestinale du fer est réduite très tôt lors d'une infection, mais la médiation de cette réponse par l'interleukine-1 n'est pas connue (Wooldridge et Williams, 1993).

Face à une très faible disponibilité en fer *in vivo*, encore réduite par la réponse hyposidérémique, les micro-organismes doivent développer chez l'hôte des systèmes de captation du fer, élément indispensable pour leur métabolisme et leur croissance.

## **2. LES SYSTEMES BACTERIENS DE CAPTATION DU FER**

Les systèmes bactériens de captation du fer sont étudiés chez de nombreuses bactéries pathogènes pour comprendre comment une bactérie survit chez l'hôte infecté.

Les bactéries ont développé chez l'hôte deux grandes stratégies différentes pour capter le fer nécessaire à leur métabolisme et à leur croissance (**Guerinot, 1994**) comme illustré sur la figure 1 :

- soit en libérant le fer des sources de l'hôte
- soit en utilisant directement les composés de l'hôte qui ont une très forte affinité pour le fer.

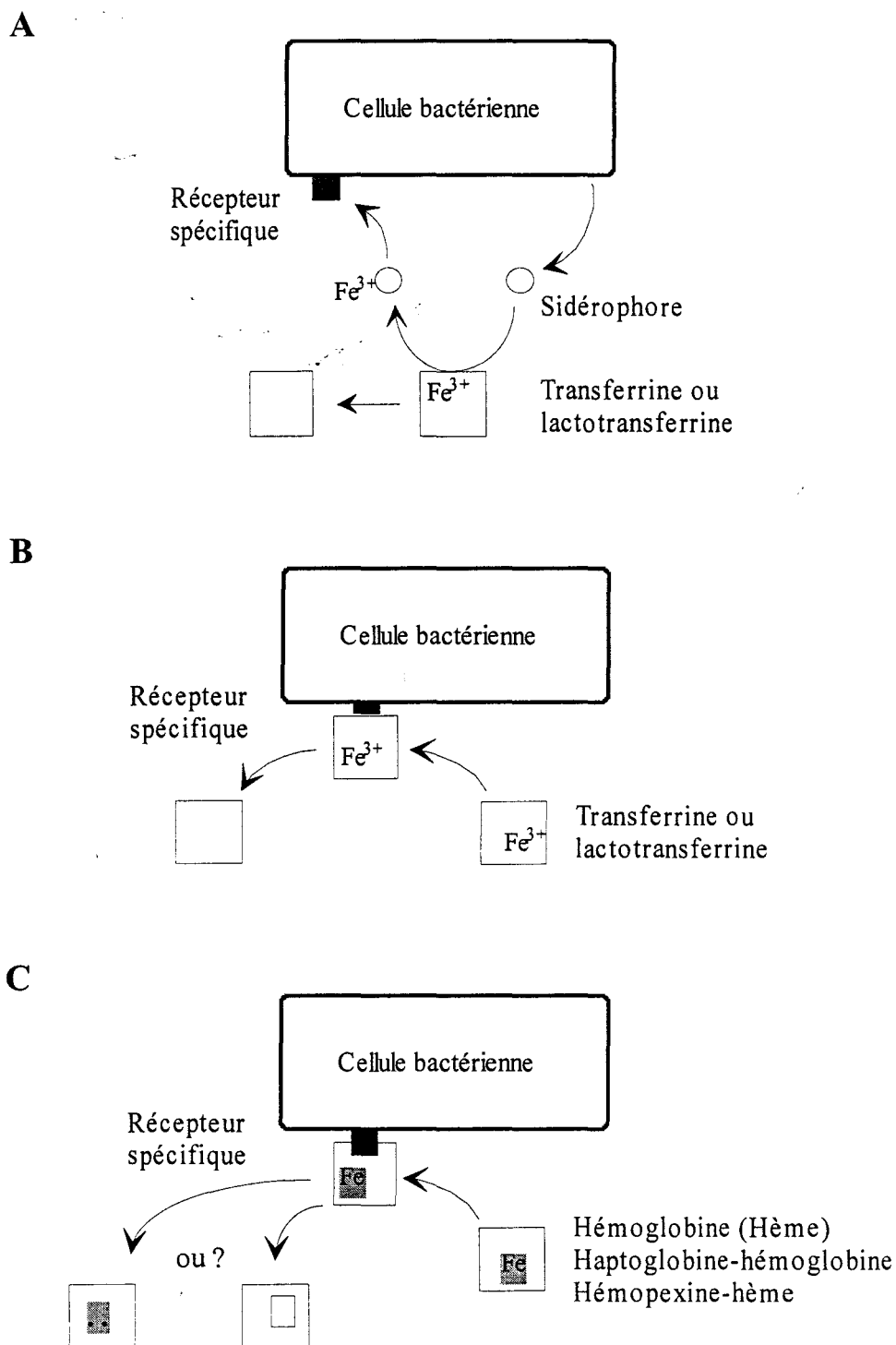
Les différences qui existent au niveau de l'organisation membranaire, base de division des bactéries à Gram négatif et à Gram positif, traduit probablement les différences existant dans la machinerie d'acquisition et du transport du fer. Nous allons nous focaliser sur les bactéries à Gram négatif.

### **2.1. La membrane externe des bactéries à Gram négatif**

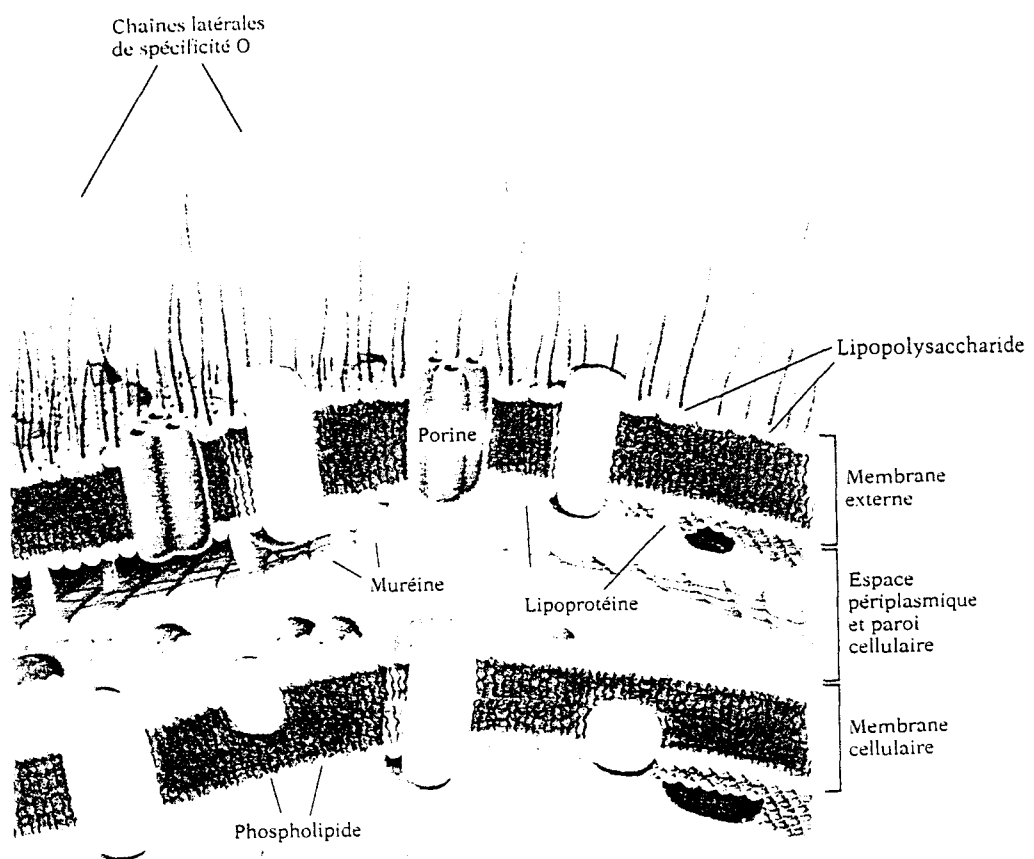
Les bactéries à Gram négatif possèdent une structure complètement différente, par rapport aux bactéries à Gram positif (Figure 2):

- une membrane externe qui est construite à l'extérieur de la fine couche de muréine. Sa structure est une double couche dont le feuillet interne a une composition ressemblant à celle de la membrane cytoplasmique. Son feuillet externe, par contre, possède un constituant particulier à la place des phospholipides. Ce composé est le lipopolysaccharide bactérien (LPS) (**Hancock, 1991**).





**Figure 1:** Représentation schématique des différents systèmes bactériens de captation du fer. a) captation du fer à partir de sidérophores; b) captation du fer par interaction directe avec la transferrine ou la lactoferrine; c) captation du fer par interaction directe avec les protéines hémiques. Symboles: (.), l'hème est internalisé; (..) seul le fer de l'hème est libéré (d'après Otto *et al*, 1992)



**Figure 2 :** Modèle de l'enveloppe cellulaire d'*Escherichia coli* montrant les différentes couches qui la composent et leur épaisseur (Neidhardt *et al.*, 1994)

La membrane externe possède des canaux qui permettent la diffusion passive des composés hydrophiles comme les sucres, les acides aminés et certains ions. Ces canaux sont constitués de protéines appelées porines. Ces canaux sont étroits, et permettent juste le passage des molécules de masses inférieures à 600-700 daltons (**Hancock, 1991**). Certains composés hydrophiles nécessaires à la survie de la cellule sont plus larges que la limite d'exclusion des porines (**Nikaido, 1994**). C'est le cas de la vitamine B<sub>12</sub>, des sucres plus grands que les trissacharides et du fer chélaté. Ces composés traversent la membrane externe par des mécanismes séparés de perméation spécifique qui utilisent des protéines spécialement conçues pour la translocation de chacun d'eux (**Nikaido, 1993**). Ainsi, la membrane externe permet le passage de petites molécules hydrophiles, exclut les composés hydrophobes, qu'ils soient petits ou gros, et permet l'entrée de quelques molécules hydrophiles plus larges par des mécanismes qui leur sont spécialement dédiés (**Hancock, 1991; Sprott et al., 1994**).

De nombreuses souches à Gram négatif ont développé dans leur membrane externe des systèmes spécialisés dans le transport du fer par l'intermédiaire de chélateurs de très haute affinité pour le fer comme les sidérophores et par l'intermédiaire de composés riches en fer de l'hôte.

## **2.2. Systèmes de haute affinité: les sidérophores**

Le mécanisme de transport du fer par l'intermédiaire des sidérophores est, des différents systèmes de captation du fer développés par les bactéries dans les conditions de carence en fer, le mécanisme probablement le plus illustré dans la littérature chez les bactéries à Gram négatif.

### 2.2.1. Les sidérophores: définition

Les sidérophores sont des petites molécules non protéiques (500-1000 daltons) produites par les bactéries et certains champignons. Ces composés sont sécrétés dans l'organisme hôte où, en raison d'une forte constante d'affinité pour le fer  $Fe^{3+}$ , ils entrent en compétition avec la transferrine et la lactoferrine dans la captation du fer  $Fe^{3+}$ . Le ferrisidérophore (complexe formé par le sidérophore et le fer  $Fe^{3+}$ ) est ensuite internalisé dans la bactérie, mettant ainsi le fer à la disposition du métabolisme bactérien (Neilands, 1995).

La membrane externe des bactéries à Gram négatif est, en principe, imperméable à ces formes chélatées du fer. Cependant, de nombreuses souches à Gram négatif ont développé dans leur membrane externe des systèmes spécialisés dans le transport de ces chélateurs. La pénétration du ferrisidérophore nécessite donc la présence de plusieurs protéines pariétales:

- une protéine de la membrane externe spécifique du sidérophore qui peut constituer également le récepteur de bactériophages et de bactériocines
- une ou plusieurs protéines situées dans le périplasme et/ou la membrane cytoplasmique. Ces dernières sont généralement spécifiques d'un sidérophore ou d'un groupe de sidérophores. La synthèse de l'ensemble sidérophore-protéines pariétales est induite en situation de carence martiale (Nikaido, 1993).

Les premiers sidérophores ont été isolés il y a une cinquantaine d'années de champignons et de bactéries. Ils ont reçu le nom de ferrichrome, coprogène, et de mycobactine. Actuellement, il semble que la plupart des bactéries aérobies et aéro-anaérobies facultatives aient la capacité de produire de tels composés. Les sidérophores sont probablement apparus chez les micro-organismes en réponse à l'apparition de l'oxygène dans l'atmosphère. Celle-ci s'est en effet accompagnée d'une oxydation du fer  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$  et de la précipitation de ce dernier sous forme d'hydroxyde ferrique, particulièrement insoluble (Neilands, 1995).

Ces molécules de transport du fer sont principalement des hydroxamates (type aërobactine) ou des phénolates-catécholates.

### 2.2.2. Détection des sidérophores

Les premières techniques de détection qualitative des sidérophores reconnaissaient spécifiquement des structures, de type catéchol (Arnow, 1937), ou de type hydroxamate (Czaky, 1948). D'autres méthodes d'études sont fondées sur la fonction biologique du sidérophore et font appel à une technique microbiologique: sur milieu gélosé, la croissance d'une espèce bactérienne est stimulée par la production de sidérophore d'une autre espèce déposée sur la même gélose (Miles et Khimji, 1975). En effet, un certain nombre de bactéries ont la propriété d'utiliser des sidérophores exogènes qu'elles sont incapables de produire elles-mêmes. Par exemple, *Haemophilus influenzae* est capable d'utiliser l'entérochéline alors que cette bactérie ne produit aucun sidérophore (Williams *et al.*, 1990).

Plus récemment, une méthode quantitative, plus facile à mettre en oeuvre, a été proposée (Schwyn et Neilands, 1987). Elle offre l'avantage d'être indépendante des structures des sidérophores étudiés, ce qui lui confère un aspect "universel". Elle repose sur la compétition du sidérophore avec le chrome azurol sulfonate en présence de fer ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ). L'affinité du sidérophore est supérieure à celle du chrome azurol. Le déplacement du fer induit un changement colorimétrique qui peut être apprécié par mesure de l'absorbance ou par virage de la gélose.

La caractérisation chimique d'un sidérophore ne peut suivre de protocole universel en raison des différences de structure chimique. La caractérisation complète de ces structures nécessite la combinaison de deux techniques très performantes: la résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie de masse.

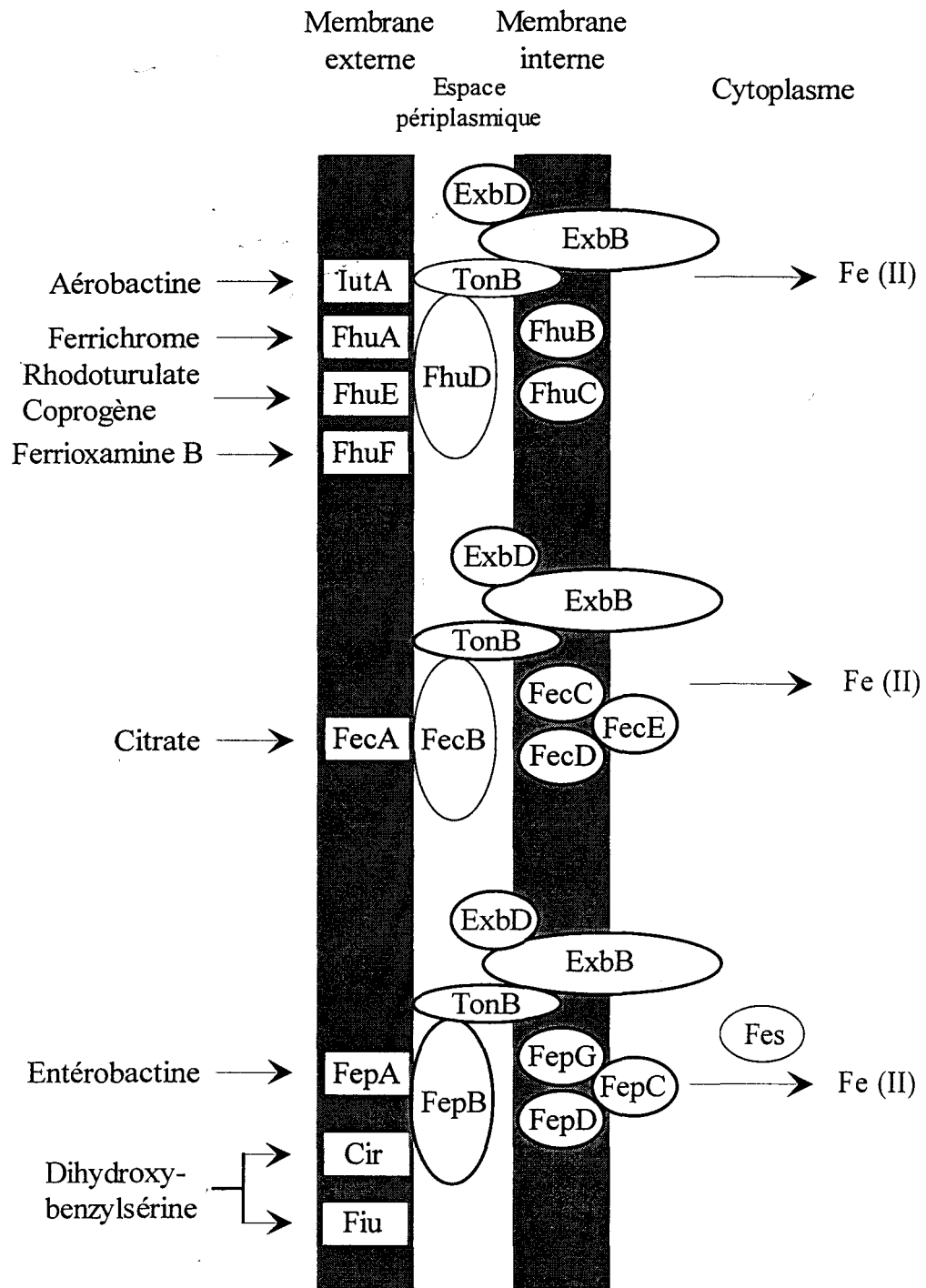
Le système de transport du fer par l'intermédiaire des sidérophores a été surtout le plus étudié chez *Escherichia coli*.

### 2.2.3. Le prototype: *Escherichia coli*

Dans des conditions de carence martiale, *E. coli* dérègle de façon coordonnée de nombreux systèmes de captation du fer composés d'un récepteur de la membrane externe, d'une protéine périplasmique et de nombreuses protéines associées à la membrane interne (Figure 3). Les protéines de la membrane externe servent de récepteurs pour les sidérophores synthétisés par *E. coli* (aérobactine et entérobactine) et également pour des sidérophores exogènes synthétisés par d'autres microorganismes tels que des hydroxamates fongiques (ferrichrome, coprogène, rhodoturulate), ferrioxamines, et catéchols (2,3-dihydroxybenzoylsérine et dihydroxybenzoate). De plus, *E. coli* peut utiliser le citrate ferrique (Guerinot, 1994).

#### 2.2.3.1. Qu'arrive-t-il quand un sidérophore est reconnu par son récepteur ?

Quand un sidérophore reconnaît son récepteur, celui-ci subit un changement conformationnel pour internaliser son ligand. Ce procédé dépend absolument de la protéine TonB. Le transport du fer à travers la membrane externe requiert de l'énergie mais la membrane externe ne contient aucun mécanisme générant de l'énergie. Un transfert d'énergie de la membrane cytoplasmique à la membrane externe par l'intermédiaire de la protéine TonB a été suggéré. Ce phénomène est rendu possible par l'utilisation du potentiel électrochimique de la membrane interne pour activer le transport des complexes  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore ainsi que la vitamine  $\text{B}_{12}$  à travers des récepteurs de très haute affinité de la membrane externe (Letain et Postle, 1997). En effet, la protéine TonB est insérée dans la membrane cytoplasmique par son extrémité N-terminale et la plus grande partie de la protéine est localisée dans le périplasma. TonB interagit aussi avec les protéines ExbB et ExbD, ancrées dans la membrane externe. La partie N-terminale de ExbB dépasse dans le périplasma. Les systèmes TonB-ExbB incluent toutes les protéines de la membrane externe spécifiques des complexes  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore connus chez *E. coli*:



**Figure 3: Représentation schématique des systèmes de captation du fer chez *Escherichia coli* (voir texte pour légende) (d'après Guerinot, 1994)**

FepA (entérobactine), IutA (aérobactine), FecA (citrate ferrique), FhuA (ferrichrome) et FhuE (rhodoturulate).

Le transport du fer à travers la membrane interne requiert:

- une protéine périplasmique (FhuD, ou FecB, ou FepB)
- quelques protéines situées dans la membrane interne (FhuB/FhuC, ou FecA/FecD, ou FepG/FepD)
- une protéine polaire liée à la membrane contenant deux régions caractéristiques des protéines capables de fixer des nucléotides (FecE, ou FepC) (Guérinot, 1994).

#### 2.2.3.2. Qu'arrive-t-il quand un sidérophore est à l'intérieur des cellules?

A l'intérieur des cellules, les complexes  $Fe^{3+}$ -sidérophores sont extrêmement stables. Dans le cas de l'entérochéline ferrique, une estérase clive le groupement ester de l'entérochéline ce qui induit une augmentation de la constante de dissociation. Les cellules ne possédant pas d'estérase fonctionnelle accumulent l'entérochéline ferrique et restent carencées en fer. Certains sidérophores sont recyclés, alors que d'autres comme l'entérochéline sont hydrolysés dans la bactérie (Griffiths *et al.*, 1988).

Un autre moyen de libérer le fer des sidérophores est de réduire le fer. Certaines réductases microbiennes peuvent réduire les complexes  $Fe^{3+}$ -sidérophores. La libération du fer peut se faire au niveau de la membrane cytoplasmique ou dans le cytoplasme. Si la réduction du fer se fait dans le cytoplasme, le sidérophore déferaté doit être soit:

- stocké
- excrété rapidement
- modifié, immédiatement, ou lors de la libération du fer pour éviter une interférence avec l'utilisation intracellulaire du fer (Guérinot, 1994).

De nombreuses bactéries pathogènes peuvent également utiliser directement des composés riches en fer de l'hôte pour leur croissance et leur métabolisme.



## 2.3. Utilisation des composés riches en fer de l'hôte

L'utilisation de composés riches en fer, comme la transferrine et la lactoferrine ou les composés hémiques de l'hôte, constitue la deuxième stratégie importante développée par les bactéries en réponse à une carence martiale imposée par l'hôte infecté.

### 2.3.1 Utilisation de la transferrine et de la lactoferrine

#### 2.3.1.1. Acquisition du fer par l'intermédiaire de récepteurs

De nombreuses bactéries acquièrent le fer directement à partir des protéines de l'hôte comme la lactoferrine et la transferrine par l'intermédiaire de récepteurs. La captation du fer est un processus qui requiert de l'énergie et qui se produit sans internalisation de la transferrine. Ce processus qui met en jeu un récepteur bactérien n'est pas un mécanisme d'endocytose analogue aux processus utilisés chez les mammifères (Huebers et Finch, 1987). L'acquisition du fer par les bactéries nécessite une interaction directe avec les glycoprotéines de l'hôte. Des bactéries comme *H. influenzae* (Schryvers et Gray-Owen, 1992), *Neisseria meningitidis* (Schryvers et Morris, 1988), *N. gonorrhoeae* (Schryvers et Lee, 1989), *Helicobacter pylori* (Husson *et al.*, 1993), ou *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Gonzalez *et al.*, 1990) sont capables de capter du fer à partir de la transferrine ou de la lactoferrine de l'hôte. Les récepteurs de la transferrine et de la lactoferrine ont été les plus étudiés jusqu'à présent chez les *Neisseria* et *H. influenzae* (Gray-Owen et Schryvers, 1996).

Des homologies structurales et fonctionnelles ont été retrouvées entre les récepteurs bactériens de la transferrine et de la lactoferrine et suggèrent que ces mécanismes de

captation du fer résultent d'un précurseur commun dans l'évolution (**Gray-Owen et Schryvers, 1996**).

Les processus médiés par la transferrine et la lactoferrine impliquent des complexes de récepteurs distincts, chacun composé de deux protéines exprimées à la surface bactérienne (**Gray-Owen et Schryvers, 1996**). TbpA («transferrin-binding protein») et LpbA («lactoferrin-binding protein») sont des protéines de haut poids moléculaire qui fixent respectivement la transferrine et la lactoferrine. Les protéines TpbB et LpbB sont des protéines de bas poids moléculaire qui fixent respectivement la transferrine, et la lactoferrine. Chez les différentes souches et espèces caractérisées jusqu'à présent, les masses moléculaires de TbpA et LpbA sont d'environ 100 kDa, alors que celles de TpbB et LpbB sont comprises entre 65 et 85 kDa. Les alignements des séquences protéiques déduites des gènes clonés *tpb* et *lbp*, qui codent respectivement les protéines fixant la transferrine ou la lactoferrine, ont révélé une identité significative (**Gonzalez et al., 1995, Gray-Owen et Schryvers, 1996**). Cette conservation est particulièrement évidente entre les protéines TbpA et LpbA qui ont un pourcentage d'identité de 25%. Les identités de séquences retrouvées avec le récepteur du sidérophore entérobactine d' *E. coli*, FepA, et les autres membres de la famille des récepteurs TonB-dépendants suggèrent que TbpA et LpbA sont des protéines faisant partie intégrante de la membrane externe. Elles peuvent fonctionner comme un canal à travers lequel le fer de la transferrine pourrait passer de la membrane externe à l'espace périplasmique. L'étude de mutants déficients pour une ou deux protéines du récepteur a montré que TbpA et LpbA sont essentielles dans l'acquisition du fer à partir respectivement de la transferrine et de la lactoferrine (**Gray-Owen et al., 1995**).

Ces différentes données ont permis de construire un modèle schématique de l'acquisition du fer de la transferrine ou de la lactoferrine par l'intermédiaire des «transferrin-binding proteins».

### 2.3.1.2. Modèle schématique d'acquisition du fer par l'intermédiaire des "transferrin-binding proteins"

L'acquisition du fer par la transferrine et la lactoferrine de l'hôte peut être schématisée selon le modèle présenté sur la figure 4. Les protéines de la membrane externe fixant la transferrine (TbpA et TbpB) facilitent la fixation et la libération du fer de la transferrine. TbpB serait impliquée dans la première interaction avec la transferrine chargée en fer et ceci induirait l'association de TbpA avec ce complexe. L'énergie requise pour ce processus est transduite aux protéines réceptrices via la protéine TonB liée à la membrane cytoplasmique et à ses protéines associées ExbB et ExbD (Letain et Postle, 1997). Une ATPase ferait également partie du complexe. Une fois libéré de la transferrine par un mécanisme encore inconnu, le fer pourrait passer à travers la membrane externe par l'intermédiaire d'un canal hydrophile dans TbpA et serait ultérieurement transféré à une protéine périplasmique fixant le fer (FbpA). Une interaction spécifique entre FbpA et sa protéine perméase FbpB au niveau de la membrane cytoplasmique permettrait le transport du fer dans le cytoplasme par un processus actionné par l'activité ATPasique de FbpC (Gray-Owen et Schryvers, 1996).

Les bactéries peuvent également utiliser les composés hémiques de l'hôte pour capter le fer nécessaire à leur survie.

### 2.3.2 Utilisation des composés hémiques

Les composés hémiques sur lesquels nous nous focaliserons sont des hétéroprotéines dont le groupement prosthétique est l'hème. Ce groupement comporte une molécule de protoporphyrine et un atome de fer. L'hème est piégé au niveau intracellulaire sous forme de protéines hémiques ou rapidement fixé par des protéines du sérum comme l'hémopexine et l'albumine (dans le cas de l'hème), et par l'haptoglobine (dans le cas de l'hémoglobine).

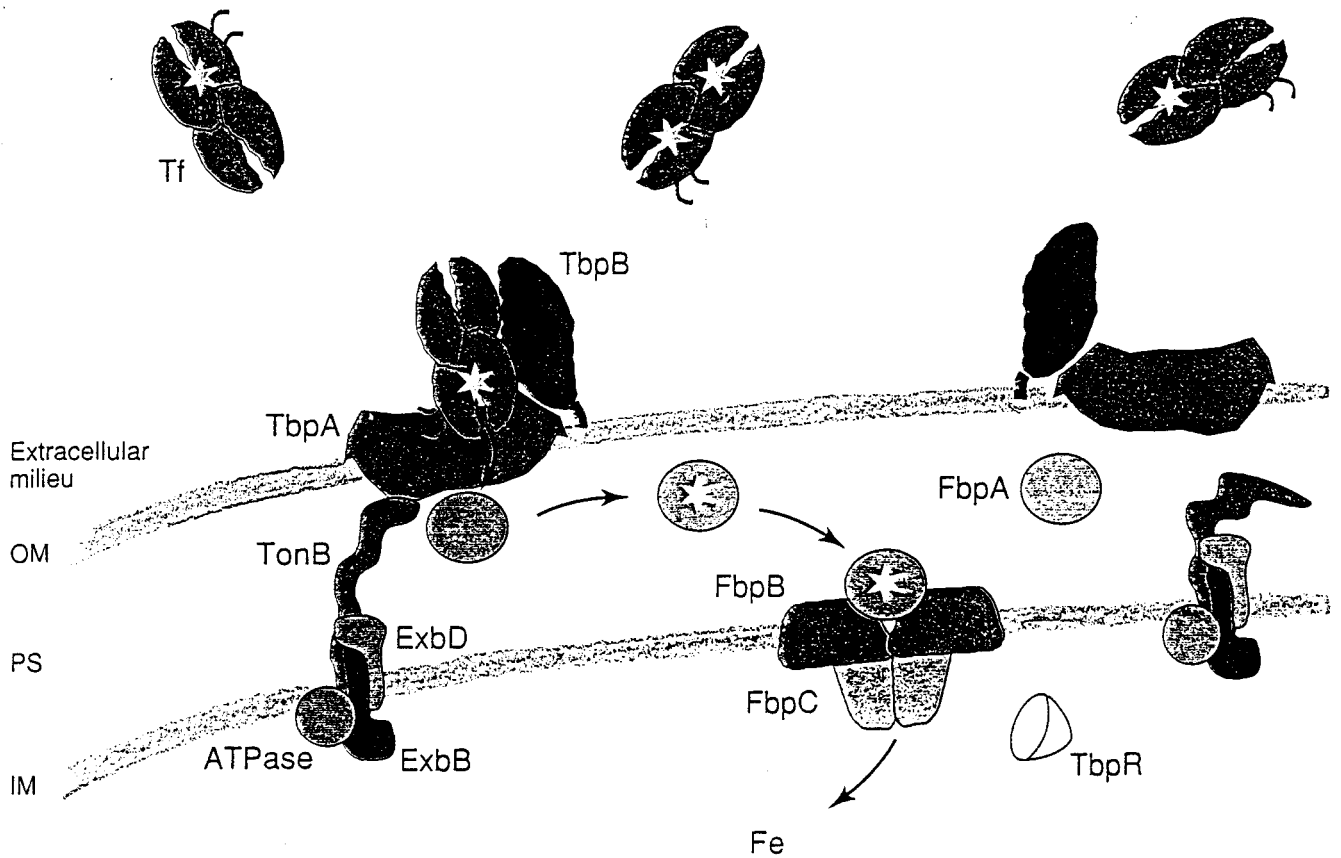


Figure 4: Acquisition du fer par interaction directe avec la transferrine ou la lactoferrine. Abréviations: OM, membrane externe; PS, espace périplasmique; IM, membrane interne (voir texte pour légende) (Gray-Owen et Schryvers, 1996)

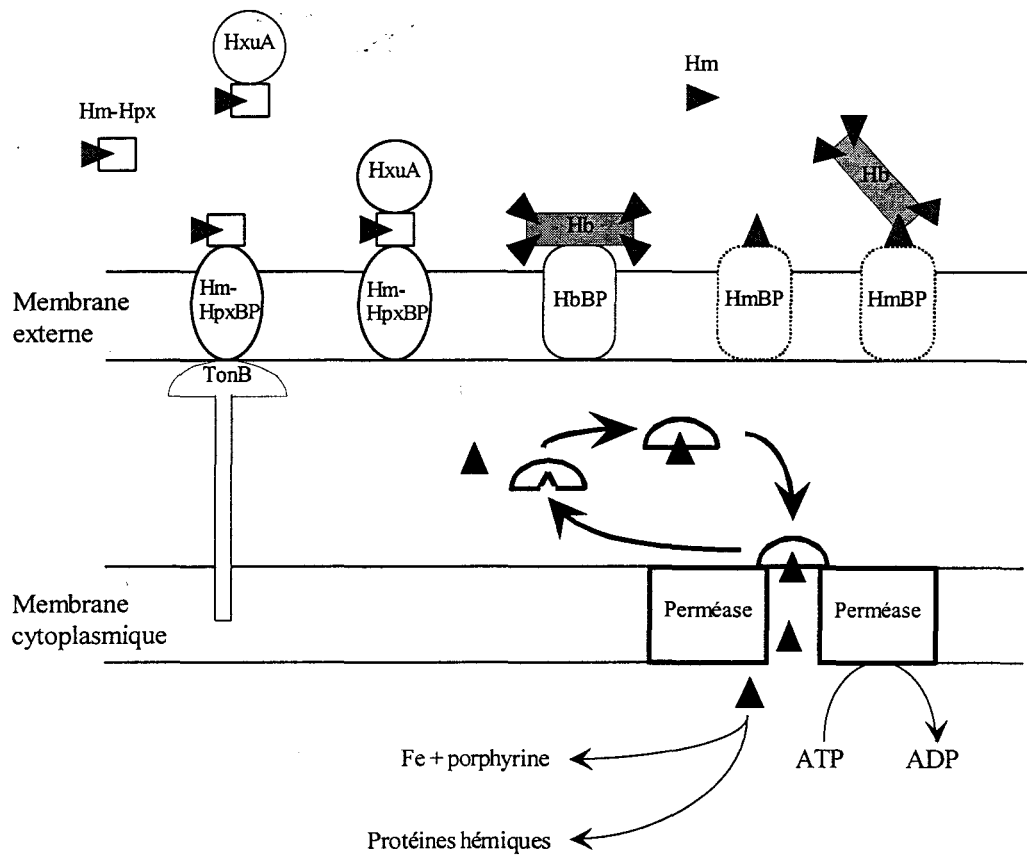
### 2.3.2.1. Acquisition de l'hème par l'intermédiaire d'un récepteur

L'acquisition de l'hème chez les bactéries se fait par un ou plusieurs récepteur(s) situé(s) à la surface bactérienne. En effet, l'hème est hydrophobe et forme un agrégat à pH physiologique. De plus, en raison des contraintes de taille des molécules pouvant traverser la membrane externe, l'hème ne pourrait pas traverser l'enveloppe cellulaire à travers les simples canaux des porines (Nikaido, 1994).

L'acquisition de l'hème nécessite certaines caractéristiques spécifiques:

- les bactéries doivent accéder au réservoir intracellulaire d'hémoprotéines
- les bactéries doivent capter l'hème fixé aux protéines de transport du sérum
- les bactéries, dans des conditions de carence en hème, doivent activer la synthèse d'une ou plusieurs protéine(s) de la membrane externe. Ces protéines seraient des récepteur(s) spécifique(s) et fonctionnel(s) situé(s) à la surface de la cellule
- l'hème est transporté à travers l'enveloppe cellulaire
- des protéines périplasmiques fixent l'hème
- et il existe des composés qui fournissent de l'énergie.

Un modèle générique de l'acquisition de l'hème, à partir des données biochimiques et génétiques caractérisées jusqu'à présent, est représenté sur la figure 5. L'hème, l'hémopexine, et l'hémoglobine sont liés à des protéines spécifiques au niveau de la surface cellulaire. La topologie exacte de la membrane externe et l'identité précise de chaque composant sont encore sujets à spéculation. Suite à une reconnaissance spécifique, l'hème est libéré du complexe récepteur-ligand par des mécanismes non définis et est transporté à travers la membrane externe dans l'espace périplasmique par un processus nécessitant de l'énergie et qui dépend de la protéine TonB. Pour des raisons d'illustration, TonB est représentée sur la figure 5 interagissant seulement avec le récepteur de l'hème-hémopexine. Ultérieurement, un système transporteur de type ABC (constitué de trois protéines associées à la membrane cytoplasmique et à la membrane externe; Létoffé, *et al.*, 1994) transporte l'hème dans le cytoplasme de la cellule où l'hème pourrait être



**Figure 5: Modèle schématique de l'acquisition de l'hème (voir texte pour légende). Hm-HpxBP représente la protéine qui se lie à l'hème-hémopexine; HbBP représente la protéine qui se lie à l'hémoglobine et HmBP représente la protéine qui se lie à l'hémine (d'après Lee, 1995)**

directement incorporé dans les protéines hémiques ou libéré de l'anneau porphyrique par l'action d'une hème-oxygénase avec entrée du fer dans le pool de fer (Lee, 1995).

Pour accéder au réservoir intracellulaire de l'hème, les bactéries pathogènes sécrètent généralement des hémolysines, des protéases, ou des cytolysines (Lee, 1995). Alternativement, les membranes cellulaires peuvent être endommagées par des mécanismes immunologiques. *H. influenzae* de type b est responsable d'une lyse intravasculaire des érythrocytes médiée par le complément (Shurin *et al.*, 1986). Une fois libérées, les protéines hémiques, l'hème et l'hémoglobine sont disponibles comme substrats de croissance. De nombreuses bactéries pathogènes comme par exemple, *H. influenzae* type b (Stull, 1987), *Campylobacter jejuni* (Pickett *et al.*, 1992), et certaines espèces pathogènes *Neisseria* (Dyer *et al.*, 1987), peuvent s'appropriier l'hème pour leur croissance.

De nombreuses protéines, dont la fonction est de fixer l'hème sous ces différentes formes au niveau de la surface bactérienne ont été isolées et caractérisées. Des techniques biochimiques comme la fixation d'un ligand ou la chromatographie d'affinité ont été les méthodes principalement utilisées pour identifier ces protéines de fixation. Peu de ces récepteurs ont été caractérisés au niveau génétique. L'information obtenue de ces études génétiques ont démontré rigoureusement la nécessité d'une protéine de surface qui interagit spécifiquement avec l'hème ou des protéines hémiques. En accord avec la fonction proposée de récepteur, ces protéines résident dans l'enveloppe externe de la cellule et leur domaine de fixation est accessible en surface (Lee, 1995).

Un mécanisme alternatif, proposé par Bramanti *et al.*, n'impliquerait pas une libération de l'hème à la surface cellulaire mais impliquerait le transfert du complexe hème-récepteur à travers la membrane externe, comme cela a été démontré pour la protéine Omp26 chez une bactérie anaérobie stricte, *Porphyromonas gingivalis* (Bramanti et Holt, 1993). Ce mécanisme de translocation est encore inconnu.

Même si le mécanisme prévalent est caractérisé par une fixation directe de l'hème et des protéines hémiques à la surface bactérienne, *Serratia marcescens* a adopté une

stratégie unique qui implique la sécrétion d'une protéine extracellulaire de 19 kDa, HasA. Cette protéine reconnaît spécifiquement l'hème, ou l'hème de l'hémoglobine (**Létoffé et al., 1994**). HasA servirait d'intermédiaire pour transporter l'hème jusqu'au récepteur de surface pour l'internalisation (**Ghigo et al., 1997**).

### 2.3.2.2. L'acquisition de l'hème et les lipopolysaccharides (LPS)

Les mécanismes d'acquisition de l'hème chez les bactéries ne sont pas seulement médiés par des protéines situées à la surface bactérienne mais également par des lipopolysaccharides de l'enveloppe externe.

Il a été démontré par **Bélangier et al.** que *A. pleuropneumoniae* est capable d'utiliser de l'hémoglobine de cochon comme seule source de fer et que l'hémoglobine se fixe à la surface bactérienne. Dans cette étude, le LPS de *A. pleuropneumoniae*, et en particulier le lipide-A qui ancre le LPS dans le feuillet externe de la membrane externe, est impliqué dans la fixation de l'hémoglobine (**Bélangier et al., 1995**). De même, la fixation de l'hémine chez *P. gingivalis* a été démontrée comme étant médiée par le LPS et plus particulièrement par la région du lipide-A (**Cutler et al., 1996**). Ces résultats ont été confirmés par des études qui ont démontré que l'hémoglobine humaine et les LPSs bactériens forment des complexes bimoléculaires (**Kaca et al., 1994**).

Ces résultats suggèrent que le LPS pourrait jouer le rôle de "récepteur" des composés hémiques (**Mario, 1996**).



### 2.3.2.3. Comparaison avec les récepteurs bactériens de la transferrine et de la lactoferrine de l'hôte

Les récepteurs bactériens des composés hémiques, de la transferrine et de la lactoferrine de l'hôte semblent posséder de nombreux points communs (**Cornelissen et Sparling, 1994**).

Des études montrent que la fixation spécifique des composés riches en fer de l'hôte, tels que l'hémoglobine, la transferrine ou la lactoferrine à des récepteurs bactériens, constitue une stratégie bactérienne significative d'acquisition du fer. De plus, tous ces récepteurs ont des points communs au niveau de leur structure, au niveau des mécanismes de transport à travers la membrane, et au niveau de la régulation de leur expression génique. Par exemple, les récepteurs de la lactoferrine, de la transferrine et de l'hémoglobine chez *N. meningitidis* partagent des homologies de séquences peptidiques, ainsi que des homologies de structure (**Stojiljkovic et al., 1995**). De plus, le transport du fer de la lactoferrine, de la transferrine et de l'hémoglobine dans le périplasme implique très probablement un mécanisme TonB-dépendant chez le pathogène *N. meningitidis*.

## 2.4. Réduction du fer ferrique et transport du fer ferreux

Certains micro-organismes réduisent le fer ferrique en fer ferreux au niveau de la membrane cytoplasmique et par la suite transportent le fer ferreux jusqu'au cytoplasme. Par exemple, *Listeria monocytogenes* capte le fer fixé à la transferrine par l'intermédiaire d'un réductant sécrété de 9 kDa (**Cowart et Foster, 1985**). Les espèces de *Pseudomonas aeruginosa* sécrètent un composé bleu, nommé pyocyanine, qui est réduit en leucopyocyanine en présence de substrats oxydables ou de NADH. La forme réduite peut à son tour réduire le fer ferrique lié à la transferrine, stimulant la captation des cellules carencées en fer (**Cox, 1986**). *Bifidobacterium bifidus*, un micro-organisme microaérophile, acquiert activement des ions ferreux par l'intermédiaire d'une ATPase de la membrane cytoplasmique.

*E. coli* ne possède pas de système extracellulaire de fer-réductase, mais si du fer ferreux est disponible, par exemple en anaérobiose, celui-ci peut être transporté via un système spécifique induit dans des conditions de restriction en fer (**Kammler et al., 1993**). Paradoxalement, ce système est déréprimé dans des conditions d'aérobiose où le fer ferreux devrait normalement être oxydé rapidement sous forme ferrique (**Kammler et al., 1993**).

## 2.5. Les systèmes de transport du fer et la virulence

Face à une disponibilité en fer *in vivo* bien en dessous des niveaux requis pour la croissance bactérienne, les bactéries ont développé des systèmes de captation du fer qui interviennent directement dans la virulence bactérienne.

La plupart des systèmes de transport du fer décrits précédemment, peuvent être mis en évidence au laboratoire lors de cultures bactériennes en conditions de carence martiale. Les interactions entre ces systèmes et des complexes de fer de l'hôte peuvent être analysés *in vitro*. Cependant, il est plus difficile d'étudier le rôle du fer et des systèmes de transport du fer *in vivo*.

Une approche de l'étude du rôle de l'acquisition du fer dans une infection consiste à rechercher l'expression des systèmes de transport du fer chez un hôte infecté. Des preuves expérimentales du rôle joué par les sidérophores et les protéines réceptrices des systèmes de transport du fer ont été obtenues. Elles montrent que ces systèmes sont produits par les pathogènes durant l'infection. L'entérobactine a été retrouvée dans le liquide péritonéal de cochons d'Inde infectés par *E. coli* (**Griffiths et Humphreys, 1980**), et des anticorps dirigés contre ce sidérophore et son récepteur respectif ont été identifiés dans le sérum de patients et d'animaux suite à une infection par des entérobactéries produisant de l'entérobactine. Ceci confirme l'expression de ce système de transport du fer *in vivo* (**Griffiths, 1985**).

Bactérie	Site de l'infection	Hôte	Protéines induites par la carence en fer	Protéines immunogènes chez l'hôte	Références
<i>E. coli</i>	intestin	homme-animal	81, 74 kDa	81, 74 kDa	Chart <i>et al.</i> , 1988
	urine	homme			Shand <i>et al.</i> , 1985
<i>K. pneumoniae</i>	urine	homme	73, 75, 83 kDa	75 kDa	Shand <i>et al.</i> , 1985
<i>Proteus mirabilis</i>	urine	homme	69 kDa	69 kDa	Shand <i>et al.</i> , 1985
<i>N. gonorrhoeae</i>	vagin	homme	37 kDa	37 kDa	Fohn <i>et al.</i> , 1987
<i>N. meningitidis</i>	méninge	homme	70, 94 kDa	70, 94 kDa	Black <i>et al.</i> , 1986
<i>P. aeruginosa</i>	poumon	homme	80, 86, 90 kDa	NE	Brown <i>et al.</i> , 1984
	poumon	rat	76, 83, 85 kDa	76, 83, 85 kDa	Cochrane <i>et al.</i> , 1988
	brûlure	homme	77, 101 kDa	77 kDa	Ward <i>et al.</i> , 1988

Note : NE, non étudié

**Tableau 2: Exemples de bactéries dont les protéines de la membrane externe régulées par le fer sont observées *in vivo* et douées de pouvoir immunogène**

De même, des préparations de la membrane externe de nombreuses espèces bactériennes à Gram négatif isolées sans subculture à partir de patients ou d'animaux infectés, contiennent des protéines réprimées par le fer (**Brown et al., 1984; Shand et al., 1985; Black et al., 1986; Fohn et al., 1987; Chart et al., 1988; Cochrane et al., 1988; Ward et al., 1988**). Ainsi, l'expression de protéines réprimées par le fer a été détectée chez *E. coli* au niveau de la cavité péritonéale de cochons d'Inde, chez *Vibrio cholerae* au niveau du tractus intestinal de lapins et chez des bactéries à Gram négatif isolées dans l'urine de patients atteints d'infections du tractus urinaire (**Wooldridge et Williams, 1993**). Les sérums de patients convalescents contiennent souvent des anticorps dirigés contre des protéines bactériennes de la membrane externe réprimées par le fer comme illustré dans le tableau 2.

La preuve de l'importance des systèmes de transport du fer au niveau de la virulence a également été obtenue par l'utilisation de mutants isogéniques dans des infections expérimentales. Des mutants incapables de produire le sidérophore anguibactine chez *Vibrio anguillarum* et chez *E. coli* ColV ont montré une perte de virulence respectivement chez des poissons et des souris (**Payne, 1993**).

## 2.6. Exemples de systèmes de captation du fer

### 2.6.1. Introduction

Le contrôle des infections acquises à l'hôpital causées par les bacilles à Gram négatif présentant des résistances multiples aux antibiotiques, s'est révélé être un véritable problème ces vingt dernières années dans les pays développés. Une augmentation de l'incidence dans les années 1970 des entérobactéries résistantes aux antibiotiques et impliquées dans les infections nosocomiales a été suivie de l'introduction de nouveaux antibiotiques et d'une augmentation ultérieure de l'importance de certains bacilles à Gram

négatif aérobies stricts, incluant *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, et *Acinetobacter baumannii* (**Bergogne-Bérézin et Towner, 1996**). Les infections à *A. baumannii* sont extrêmement difficiles à traiter par le clinicien en raison de la résistance de ces bactéries à de nombreux antibiotiques (**Lambert et al., 1988; Lambert et al., 1994; Jiménez-Mejias et al., 1997**). De telles souches multi-résistantes sont isolées au laboratoire à partir de prélèvements d'infections variées. Ces infections se révèlent parfois mortelles. Il devient nécessaire d'étudier les mécanismes de virulence de ces souches de *A. baumannii* multi-résistantes aux antibiotiques, notamment le rôle du fer dans la virulence bactérienne.

D'autres infections polymicrobiennes moins connues chez l'homme sont également difficiles à traiter, impliquant des bactéries anaérobies strictes comme *Bilophila wadsworthia*. Ces infections associent des bactéries aérobies et anaérobies qui agissent en synergie pour entraîner des dommages importants chez l'homme. Il est aussi nécessaire d'étudier les mécanismes de captation du fer associés à la virulence. Jusqu'à présent, très peu d'études sur les mécanismes de virulence de ces bactéries impliquées dans ces infections ont été effectuées.

## 2.6.2. *A. baumannii*: modèle d'étude des bactéries aérobies strictes

### 2.6.2.1. Présentation de *A. baumannii*

Les membres du genre *Acinetobacter* sont des bacilles à Gram négatif, ubiquitaires et saprophytes, facilement isolés dans la terre, dans l'eau, la nourriture, et les vidanges (**Towner, 1997**). Dans le domaine de la biotechnologie, la faculté d'adaptation métabolique de ces organismes représente une propriété essentielle dans de nombreux procédés industriels importants, et également dans la dégradation d'un grand nombre de polluants de l'environnement (**Towner, 1997**). Ces micro-organismes sont également ubiquitaires dans l'environnement clinique et peuvent être isolés facilement en tant que bactéries commensales de la peau des patients et du personnel hospitalier (**Bergogne-Bérézin et Towner, 1996**).

Il est maintenant reconnu que *Acinetobacter baumannii* est un pathogène nosocomial important jouant un rôle primordial dans la colonisation et l'infection des patients admis à l'hôpital. *A. baumannii* a été isolé dans de nombreux types d'infections opportunistes, incluant des septicémies, pneumonies, endocardites, méningites, des infections de la peau et des plaies, et des infections du tractus urinaire (**Bergogne-Bérézin et Towner, 1996**). Les principaux sites d'infection sont le tractus respiratoire et le tractus urinaire.

De telles infections sont extrêmement difficiles à traiter par le clinicien en raison de la multi-résistance de ces bactéries à de nombreux antibiotiques (**Lambert et al., 1988; Lambert et al., 1994; Jiménez-Mejias et al., 1997**). Ces difficultés thérapeutiques sont couplées au fait que ces bactéries ont une capacité significative de survie dans l'environnement de l'hôpital pendant plusieurs jours, avec des opportunités supplémentaires de transmission entre patients, via des réservoirs humains ou via du matériel inanimé (**Wendt et al., 1997**). Bien qu'il y ait eu de rares cas d'infections communautaires dues à *A. baumannii* (**Bick et Semel, 1993**), le premier rôle de cette bactéries est sans aucun doute d'entraîner des infections nosocomiales (**Bergogne-Bérézin et Towner, 1996**).

#### 2.6.2.2. La virulence de *Acinetobacter baumannii*

Certaines caractéristiques de ce micro-organisme participent à sa virulence:

- la présence d'une capsule polysaccharidique formée de L-rhamnose, D-glucose, acide D-glucuronique et D-mannose, rendant la surface des cellules plus hydrophile (**Kaplan et al., 1985**)

- la propriété d'adhésion aux cellules épithéliales humaines en présence de fimbriae et/ou d'une capsule polysaccharidique (**Rosenberg et al., 1982; Rosenberg et al., 1983**)

- la production d'enzymes pouvant endommager les lipides des tissus (**Poh et Loh, 1985**)

- le rôle potentiellement toxique du composé polysaccharidique de l'enveloppe cellulaire et la présence du lipide A (Avril et Mesnard, 1991)

Comme d'autres bactéries à Gram négatif, *A. baumannii* produit un lipopolysaccharide responsable de toxicité chez la souris et de pyrogénicité chez le lapin. La production d'endotoxine *in vivo* est probablement responsable des symptômes de la maladie observés pendant une septicémie à *A. baumannii*. Expérimentalement, des infections mixtes combinant d'autres bactéries avec *A. baumannii* sont plus virulentes que des infections à *A. baumannii* seules (Obana, 1986).

#### 2.6.2.3. Le rôle du fer dans la virulence de *Acinetobacter baumannii*

Peu d'études ont montré que des souches cliniques de *A. baumannii* ont la capacité de pousser et de synthétiser des sidérophores en conditions de carence martiale.

##### 2.6.2.3.1. Sécrétion d'un sidérophore de faible affinité pour le fer

Une première étude a montré qu'une souche clinique de *A. baumannii* est capable de croître dans un milieu chimiquement défini contenant un chélateur de fer, le 2-2-dipyridyl. Des analyses chimiques et chromatographiques des extraits des surnageants de culture provenant de cette souche ayant poussé dans des conditions de carence martiale ont révélé la présence d'acide 2-3-dihydroxybenzoïque (ADHB). Des essais biologiques ont également montré que ce micro-organisme est capable d'utiliser les complexes Fer-ADHB dans des conditions de carence en fer. Ces études ont donc suggéré aux auteurs que *A. baumannii* exprime un système de captation du fer impliquant le ADHB en tant que sidérophore extracellulaire (Smith *et al.*, 1990). D'autres travaux sur d'autres bactéries à Gram négatif ont également montré que le ADHB pouvait agir en tant que sidérophore de faible affinité pour le fer (Page et Huyer, 1984; Hantke, 1990).

#### 2.6.2.3.2. Caractérisation d'un système de transport du fer de haute affinité

Une analyse approfondie du système de captation du fer d'une souche clinique isolée lors d'une épidémie nosocomiale d'infections du tractus respiratoire a été réalisée (Echenique *et al.*, 1992). La concentration en fer libre du milieu de culture affecte la croissance de la bactérie, la synthèse des protéines membranaires et des produits extracellulaires. Cependant, cette souche a bien poussé dans les conditions de culture imposées par différents chélateurs du fer comme la transferrine humaine ou l'acide éthylènediamine-di-O-hydroxyphényl acétique (EDDA). Des tests colorimétriques et d'utilisation de sidérophores, supportés par des expériences d'hybridation d'ADN, ont révélé que la capacité de *A. baumannii* à capter le fer est liée à la synthèse et à la sécrétion d'un nouveau type de sidérophore de type catéchol qui est régulé par le fer. Ce nouveau type de sidérophore a une très haute affinité pour le fer puisqu'il est capable de capter le fer des molécules fortement chélatrices du fer comme la transferrine humaine. De plus, ce système de captation du fer requiert de l'énergie couplée à un gradient transmembranaire de proton (Echenique *et al.*, 1992). L'étude de ce système de très haute affinité pour le fer a permis d'identifier deux protéines de la membrane cytoplasmique de 120 et 134 kDa, ainsi que sept protéines de la membrane externe de 68 à 87 kDa exprimées uniquement en conditions de carence martiale (Echenique *et al.*, 1992).

Actis *et al.* ont montré que plusieurs souches de *A. baumannii* isolées lors d'une épidémie nosocomiale d'infections du tractus respiratoire, sont capables de pousser dans des conditions de carence martiale. Elles sécrètent des sidérophores, analogues à ceux décrits par Echenique *et al.*, de type catéchol régulés par le fer et indépendamment de leur contenu plasmidique. Ce système de captation du fer ne requiert pas une interaction directe entre les cellules et les complexes transferrine-Fer (Actis *et al.*, 1993), comme il a été précédemment décrit chez d'autres pathogènes humains (*H. influenzae*; *N. meningitidis*; *N. gonorrhoeae*) (Williams et Griffiths, 1992).



### 2.6.2.3.3. *Caractérisation d'un nouveau sidérophore: l'acinétobactine*

Yamamoto *et al.* ont isolé et caractérisé plus récemment, à partir de cultures d'*A. baumannii* en conditions de carence en fer, la structure d'un nouveau type de sidérophore contenant des groupements fonctionnels catécholate et hydroxamate, appelé acinétobactine (Yamamoto *et al.*, 1994). Ce nouveau sidérophore est clairement différent de celui isolé par Echenique *et al.* (Echenique *et al.*, 1992). De plus, seules 4 souches parmi les 12 souches étudiées par Yamamoto *et al.*, produisent de l'acinétobactine suggérant ainsi une variation de souche à souche dans la capacité de produire un sidérophore particulier. Toutes les souches étudiées produisent le ADHB, chélateur de faible affinité (Smith *et al.*, 1990, Actis *et al.*, 1993). Par contre, les 8 autres souches qui ne produisent pas l'acinétobactine ont une bonne croissance dans les conditions de carence en fer imposées par l'EDDA, un chélateur de forte affinité pour le fer. Ceci laisse supposer la production de plusieurs types de sidérophores chez *A. baumannii* (Yamamoto *et al.*, 1994).

Ces études nous permettent de mieux comprendre comment *A. baumannii* survit chez l'hôte infecté et définit l'importance d'un tel système de captation du fer développé par la bactérie en produisant des sidérophores dans les infections causées par *A. baumannii*. L'expression de ce système de captation du fer permet à la bactérie de rentrer en compétition avec les protéines de haute affinité pour le fer de l'hôte pour capter le fer.

Nous avons vu les systèmes de captation du fer chez les bactéries aérobies, quand est-il chez les bactéries anaérobies strictes ?

## 2.6.3. *Bilophila wadsworthia*: modèle d'étude des anaérobies strictes

### 2.6.3.1. Les infections anaérobies

Trois grandes caractéristiques sont communes aux infections anaérobies. La première, le micro-organisme infectant est souvent issu de la flore endogène de la

muqueuse gastro-intestinale, oropharyngée ou génito-urinaire du patient. La deuxième, des altérations des tissus de l'hôte dues, par exemple, à un traumatisme ou une hypoxie, induisent des conditions favorables au développement d'infections secondaires ou opportunistes anaérobies. La troisième, les infections anaérobies sont généralement polymicrobiennes, impliquant souvent différentes bactéries anaérobies et aérobies agissant en synergie pour entraîner des dommages importants (**Duerden, 1994**).

Cette inter-dépendance métabolique retrouvée dans ces infections mixtes, est primordiale dans l'invasion des tissus, dans leur besoin nutritionnels, et dans l'expression de leur pathogénicité synergique (**Botta et al., 1994**). Pour une croissance optimale, la plupart des pathogènes anaérobies ont besoin de nutriments complexes libérés par les tissus endommagés de l'hôte. Les facteurs de l'hôte sont importants dans l'établissement d'une infection anaérobie; la capacité d'un pathogène anaérobie à exploiter l'environnement compromis de l'hôte reflète sa virulence (**Duerden, 1994**).

Jusqu'à présent, le rôle des bactéries anaérobies strictes dans les processus infectieux est resté négligé. Ceci est dû en partie à une compréhension insuffisante et à un manque d'appréciation du rôle des anaérobies dans les infections humaines. Cependant, les bactéries anaérobies strictes sont impliquées dans un grand nombre d'infections diverses chez l'homme et jouent un rôle important, souvent majeur, dans les processus infectieux du tractus respiratoire, gastro-intestinal, et génital. Les anaérobies sont des pathogènes ayant un rôle essentiel dans les abcès, les infections orales et dentaires, les actinomycoses, les abcès des poumons, les ostéomyélites chroniques, le tétanos, le botulisme, les gangrènes gazeuses, et de nombreuses autres infections du tissu mou (**Summanen et al., 1993**).

#### 2.6.3.2. La captation du fer par les bactéries anaérobies strictes

La capacité d'acquérir le fer de l'hôte est une nécessité pour la croissance *in vivo* des bactéries anaérobies strictes. Le mécanisme d'acquisition du fer le plus étudié chez les bactéries aérobies-anaérobies facultatives, celui qui implique la synthèse et la sécrétion de

sidérophores, n'a jamais été décrit jusqu'à présent chez les bactéries anaérobies strictes (Neilands, 1995).

Les mécanismes de captation du fer mis en œuvre par les anaérobies ont été très peu étudiés par rapport aux bactéries aérobies (Tableau 3). Le mécanisme le plus étudié concerne la captation de l'hème chez l'hôte et celui-ci a été principalement étudié chez *Bacteroides fragilis*, isolé dans des infections intra-abdominales et souvent associé avec *B. wadsworthia* dans des infections mixtes intra-abdominales, (Otto *et al.*, 1988; Otto *et al.*, 1990; Otto *et al.*, 1994; Otto *et al.*, 1996) et chez *P. gingivalis*, isolé dans des infections dentaires et orales (Genco, 1995).

*B. fragilis* possède un besoin primordial en hème pour sa croissance (Otto *et al.*, 1990). Alors que ce micro-organisme est capable d'utiliser de l'hème libre ou complexé à l'hémoglobine et au complexe haptoglobine-hémoglobine en tant que seule source de fer, le mécanisme de captation de ce nutriment essentiel reste encore inconnu. Une protéine de 44 kDa, réprimée par le fer, est impliquée dans la captation de l'hème mais son rôle exact est inconnu (Otto *et al.*, 1991). Otto *et al.* ont montré que cette protéine de 44 kDa est exprimée *in vivo* et induit une réponse immune chez des patients et des animaux infectés par *B. fragilis* (Otto *et al.*, 1991). D'autres espèces de *Bacteroides*, moins virulentes que *B. fragilis*, n'expriment pas cette protéine dans les mêmes conditions de culture carencées en fer. Ces arguments permettent de suggérer que cette protéine de 44 kDa est essentielle pour la survie de *B. fragilis* chez l'hôte. *B. fragilis* est incapable d'utiliser la transferrine comme seule source de fer (Otto, 1990).

#### 2.6.3.3. Présentation de *B. wadsworthia*

*B. wadsworthia* est un pathogène significatif retrouvé dans de nombreux types d'infections chez l'homme associé à d'autres bactéries pathogènes plus connues comme *E. coli* par exemple (Arseze *et al.*, 1997). *B. wadsworthia* est une bactérie anaérobie stricte et jusqu'à présent aucune étude n'a été effectuée auparavant sur le métabolisme du fer de cette bactérie. Nous nous proposons d'étudier les mécanismes de capture du fer associés à des conditions de carence martiale chez cette bactérie.

Bactérie	Site de l'infection	Hôte	Protéines induites en carence en fer	Protéines immunogènes exprimées <i>in vivo</i>	Caractéristiques des protéines	Références
<i>Bacteroides fragilis</i>	intestin	homme	89, 49, 44, 23,5 kDa	44 kDa	protéines fixant l'hème	Otto <i>et al.</i> , 1988
			60, 58, 49, 35 kDa	NE	protéines fixant l'hème	Otto <i>et al.</i> , 1994
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	cavité orale	homme	80, 77, 71, 62, 60, 58, 56, 50, 29, 26 kDa	NE		Bramanti et Holt, 1990
			26 kDa	NE	protéine de surface fixant l'hémine	Bramanti et Holt, 1993
			19 kDa	NE	protéine de l'enveloppe fixant l'hémoglobine	Fujimura <i>et al.</i> , 1996
			26 kDa LPS (lipopolysaccharide)	26 kDa LPS	lipopolysaccharide fixant l'hémine	Cutler <i>et al.</i> , 1996
<i>Bacteroides vulgatus</i>	intestin	homme	89, 49 kDa	NE		Otto <i>et al.</i> , 1988
<i>Prevotella intermedia</i>	cavité orale	homme	NE	NE	fixation de l'hémine	Tompkins <i>et al.</i> , 1997

Note : NE, non étudié

**Tableau 3: Exemples de bactéries anaérobies strictes dont les protéines de la membrane externe régulées par le fer sont observées *in vivo* et douées de pouvoir immunogène (LPS, lipopolysaccharide)**

*Bilophila* (qui aime la bile) *wadsworthia* (qui a été découverte au Wadsworth Hospital), bacille à Gram négatif anaérobie strict, a été initialement isolé et caractérisé en 1989 dans des prélèvements effectués sur des patients atteints d'appendicites gangrénées et perforées et également dans 50% des fèces de sujets sains (**Baron et al., 1989**).

Le tractus gastro-intestinal inférieur est la niche écologique présumée de *B. wadsworthia* même si ce dernier a déjà été isolé dans la flore orale et vaginale de sujets sains. Dans une étude effectuée sur des patients atteints d'appendicites gangrénées et perforées, *B. wadsworthia* a été isolé en troisième position par ordre d'importance parmi les bactéries anaérobies strictes (**Baron et al., 1992**). *B. wadsworthia* a également été isolé plus récemment dans un certain nombre de prélèvements cliniques tels que des abcès scrotaux, des ostéomyélites mandibulaires, dans le liquide pleural, le liquide articulaire, et le sang (**Baron et al., 1992; Finegold et al., 1992; Kasten et al., 1992**).

Sa croissance est stimulée par la présence de bile (20%) et de pyruvate (1%) et cette bactérie anaérobie stricte produit une catalase, enzyme qui la différencie de la plupart des autres bactéries anaérobies strictes. Le genre *Bilophila* se rapproche le plus de la famille des *Bacteroidaceae* qui incluent également d'autres bacilles à Gram négatif stimulés par la présence de bile (**Baron et al., 1989**).

Une étude récente réalisée en Italie par Arzese *et al.* a révélé que *B. wadsworthia* est toujours isolé dans des infections mixtes et que le processus infectieux est toujours compliqué par la formation d'un abcès, quel que soit le type d'infection. Les micro-organismes les plus fréquemment rencontrés avec *B. wadsworthia* sont *E. coli* (38%) en tant qu'espèce anaérobie-facultative et *B. fragilis* en tant qu'espèce anaérobie stricte (25%) (**Baron, 1997; Arzeze et al., 1997**).

Il est parfaitement établi que *B. wadsworthia* est un pathogène significatif et est ainsi retrouvé dans de nombreux types d'infections (tableau 4). Cependant, les mécanismes de virulence de *B. wadsworthia* sont encore inconnus et très peu de données existent concernant cette bactérie. Malgré les difficultés qui résident dans l'identification

de cette bactérie qui pousse très lentement en 7 jours minimum, dans des conditions d'anaérobiose stricte, et sur un milieu approprié enrichi de bile et de pyruvate, des laboratoires dans le monde ont isolé récemment *B. wadsworthia* dans diverses infections (Arseze *et al.*, 1997; Schumacher et Bucheler, 1997).

Cas no	prélèvement	type d'infection	prédispositions	quantité de <i>B. wadsworthia</i>	autres anaérobies isolés	aérobies isolés
1	sang	septicémie	hépaticojéjunostomie adénocarcinome du colon et du foie	ND	aucun	<i>Enterococcus raffinosus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
2	sang	septicémie	gastrite chronique carcinome prostatique	ND	aucun	aucun
3	bile	cholécystite aiguë	inconnue	peu	peu de <i>Bacteroides</i> <i>thetaiotaomicron</i>	aucun
4	bile	cholécystite aiguë	aucune	modéré à nombreux	modéré à nombreux <i>Gemella morbillorum</i>	modéré à nombreux <i>E. coli</i> et <i>Klebsiella oxytoca</i>
5	bile	cholécystite chronique	déficience rénale	nombreux	aucun	nombreux <i>E. coli</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> peu d' <i>Enterococcus</i>
6	pus	bartholinite	aucune	nombreux	nombreux <i>Fusobacterium</i> et <i>Prevotella bivia</i>	quelques <i>Lactobacillus</i>
7	pus	fasciites nécrosantes	aucune	nombreux	nombreux <i>Bacteroides</i> <i>caccae</i> et <i>Bacteroides</i> <i>fragilis</i>	nombreux <i>E. coli</i> et <i>Enterococcus</i>
8	pus	fasciites nécrosantes gangrène	diabète insulino-dépendant	nombreux	nombreux <i>B. fragilis</i> et <i>Bacteroides ovatus</i>	nombreux <i>E. coli</i>
9	pus	abcès du foie	diabète insulino-dépendant	modérés	modérés <i>B. fragilis</i>	quelques <i>E. coli</i>
10	pus	abcès cutané	inconnu	nombreux	nombreux <i>B. fragilis</i> et <i>B. ovatus</i>	nombreux <i>Proteus mirabilis</i>
11	pus	abcès cutané au mollet	utilisation de drogue en intraveineuse	peu	peu de <i>Prevotella</i>	nombreux <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> et <i>Streptococcus</i>
12	écoulement purulent	ulcère du pied	diabète insulino-dépendant	nombreux	nombreux <i>Bacteroides</i> <i>gracilis</i>	I

Note : I = indisponible; ND = non déterminé

**Tableau 4: Infections dans lesquelles *Bilophila wadsworthia* a été retrouvé (Summanen et al., 1995)**

### **3. REGULATION DES GENES DE VIRULENCE PAR LE FER**

Les micro-organismes pathogènes ont développé des systèmes spécifiques de captation du fer qui sont requis pour leur virulence. Le niveau très faible en fer présent dans l'organisme humain sert de signal à la bactérie pour réguler l'expression d'un certain nombre de gènes de virulence. Le fer joue ainsi un rôle primordial dans la régulation des gènes impliqués dans les mécanismes de captation du fer et la virulence bactérienne.

#### **3.1. Le fer en tant que signal régulateur de l'expression des facteurs de virulence**

Un certain nombre de facteurs comme le pH, l'osmolarité, la température, la concentration en acides aminés, régulent en coordination l'expression des gènes de virulence. Ainsi le fer, ou son absence, joue un rôle important dans l'interaction entre le pathogène et l'hôte. Le niveau très faible en fer présent chez l'hôte sert de signal à la bactérie pour réguler l'expression d'un certain nombre de gènes de virulence.

Des hémolysines et des sidérophores sont des facteurs de virulence dans un certain nombre de systèmes modèles et sont régulés par la concentration en fer de l'environnement. D'autres facteurs de virulence régulés par le fer incluent la toxine Shiga de *Shigella dysenteriae* de type I, et un certain nombre de protéines de la membrane externe. Quelques exemples de facteurs de virulence régulés par le fer sont donnés dans le tableau 5 (Litwin et Calderwood, 1993a).

De plus, les bactéries, doivent réguler leur contenu en fer pour des raisons économiques et pour éviter une toxicité du fer (Braun, 1997).



Bactérie	Facteur(s) de virulence
<i>E. coli</i>	Aérobactine SLT-I (Shiga-like toxin I) Hémolysine
<i>S. dysenteriae type I</i>	Shiga toxine
<i>S. marcescens</i>	Hémolysine
<i>Vibrio cholerae</i>	gène régulé par le fer ( <i>irgA</i> )
<i>Vibrio anguillarum</i>	anguibactine
<i>Yersinia</i> spp.	protéines de la membrane externe régulées par le fer
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Transferrin-binding protein A Transferrin-binding protein B
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Exotoxine A Elastase

**Tableau 5: Exemples de facteurs de virulence bactériens régulés par le fer (Litwin et Calderwood, 1993a)**

### **3.2. Mécanismes de contrôle transcriptionnel et post-transcriptionnel des gènes régulés par le fer**

Les mécanismes bactériens de captation du fer sont contrôlés par de nombreux paramètres qui, dans les conditions physiologiques de l'hôte, agissent par répression (dans des conditions riches en fer) ou par activation (dans des conditions de carence en fer). Le fer lui-même joue un rôle primordial.

#### **3.2.1. Répression de l'expression des gènes par le complexe Fer-Fur dans des conditions riches en fer**

Des concentrations élevées en fer induisent chez les bactéries une répression de l'expression des gènes impliqués dans la captation du fer; ceci se produit en conjonction avec la protéine Fur qui agit comme un répresseur en coordination avec le fer.

##### 3.2.1.1. isolements de mutants *fur*

Le travail de Ernst *et al.* sur *Salmonella typhimurium* a permis d'établir les premières bases moléculaires de cette régulation. Le gène *fur* ("ferric uptake regulator") a été identifié par mutagenèse, induisant une surproduction des protéines de la membrane externe régulées par le fer et une production constitutive du sidérophore entérobactine (Ernst *et al.*, 1987). De manière similaire, le gène *fur* a été identifié chez *E. coli*, cloné et séquencé. Il code une protéine cytoplasmique de 17 kDa (148 acides aminés) riche en histidine (8%) (Schaffer *et al.*, 1985).

### 3.2.1.2. La protéine Fur: protéine régulatrice de la transcription

La régulation transcriptionnelle des gènes par le fer chez *E. coli* est médiée par le produit du locus *fur*. La protéine Fur agit comme co-répresseur avec le fer Fe(II) via des séquences spécifiques d'interactions ADN-protéine au niveau des régions promotrices des gènes. L'opéron aérobactine *iucABCD* (gènes impliqués dans la synthèse du sidérophore aérobactine) a été utilisé comme modèle d'étude de la régulation de l'expression des gènes par le fer chez *E. coli*. En utilisant les données génétiques obtenues concernant le promoteur défini de l'opéron aérobactine et les données du promoteur régulé par le fer de SLT-1 (Shiga-like toxin de *E. coli*), une séquence consensus de fixation du répresseur Fur nommée "iron box" ou "Fur box" a été déterminée: GATAATGATaATCATTATC (Calderwood et Mekalanos, 1987). Cette "iron box" est une séquence palindromique de 19 pb.

A partir de ces différentes données, on peut proposer un schéma montrant les mécanismes selon lesquels la concentration en fer régule l'expression des gènes chez *E. coli* (Figure 6). Le site consensus de fixation de Fur est localisé en amont des gènes régulés par le fer. Fe(II) est un co-répresseur qui, à des concentrations intracellulaires suffisantes en fer, se lie avec Fur à l'ADN au niveau de l'"iron box" et réprime la transcription des gènes régulés par le fer. En plus d'une "iron box", des sites de fixation de la protéine CAP, protéine fixatrice d'AMP cyclique, ont également été identifiés au niveau du promoteur du gène *fur* (de Lorenzo *et al.*, 1988). La signification de ce double contrôle suggère une relation entre la régulation par le fer et le statut métabolique de la cellule.

Même si il a été montré *in vitro* que la protéine Fur pouvait être activée par de nombreux ions divalents comme le Mn(II), Fe(II), Co(II), Cd(II), seul le fer Fe(II) semble être l'activateur naturel *in vivo* (Privalle et Fridovich, 1993).

Par la suite, des séquences homologues à la séquence consensus "Fur box" ont été retrouvées en amont d'un grand nombre de gènes régulés par le fer plus ou moins conservées chez de nombreuses espèces bactériennes. Des protéines Fur-like ont été décrites chez des bactéries aérobies et aérobies-anaérobies facultatives comme *Yersinia*

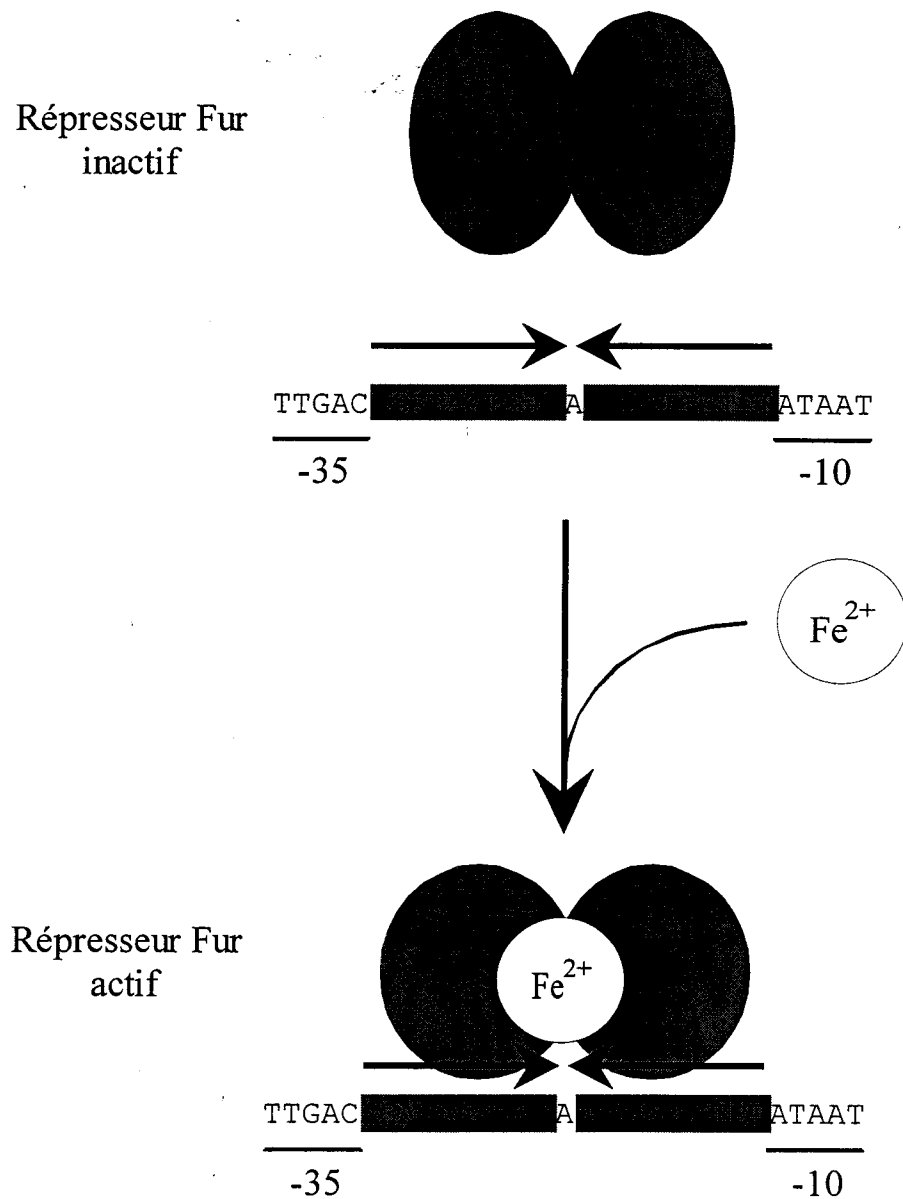


Figure 6: Représentation schématique de la régulation de l'expression par la protéine Fur (Litwin et Calderwood, 1993a)

*pestis* (Staggs et Perry, 1991), *V. cholerae* (Litwin *et al.*, 1992), *Vibrio vulnificus* (Litwin et Calderwood, 1993b), *P. aeruginosa* (Prince *et al.*, 1993), *P. putida* (Venturi *et al.*, 1995), *Vibrio anguillarum* (Tolmasky *et al.*, 1994), *Bordetella pertussis* (Brickman et Armstrong, 1995), *C. jejuni* (Wooldridge *et al.*, 1994), *Legionella pneumophila* (Hickey et Cianciotto, 1994), *N. meningitidis* (Karkhoff-Schweizer *et al.*, 1994), *Neisseria gonorrhoeae* (Berish *et al.*, 1993), et chez des cyanobactéries (Michel *et al.*, 1996). Aucune protéine Fur-like n'a été décrite jusqu'à présent chez les bactéries anaérobies strictes.

### 3.2.1.3. Domaines fonctionnels de Fur

La polymérisation de Fur au niveau de l'opérateur a été suggérée comme mode de fixation. Cette hypothèse a été supportée par des observations au microscope électronique (Le Cam *et al.*, 1994). Des expériences d'hypersensibilité à la DNase I ont montré qu'une dimérisation de Fur est nécessaire pour sa fixation au niveau des régions -10 et -35 du promoteur et ont suggéré une interaction avec une face de la double hélice (Tardat et Touati, 1993). Par la suite, l'interaction du complexe Fur-Fe(II) a été étudiée à nouveau concluant que le répresseur ne possédant pas le motif classique hélice-boucle-hélice établit un contact avec une face de l'ADN par l'intermédiaire de presque 3 sillons successifs (Coy, 1995). Auparavant, il a été établi que la région N-terminale de Fur est impliquée dans la reconnaissance de l'ADN alors que les autres domaines du répresseur sont impliqués dans des fonctions séparées comme la fixation au Fe(II) et la polymérisation (Coy et Neilands, 1991).

### 3.2.1.4. Rôle multifonctionnel de Fur

En utilisant différentes approches comme l'échange de marqueurs pour *V. cholerae* (Litwin *et al.*, 1992) et *Y. pestis*, ou une sélection avec  $Mn^{2+}$  (les mutants *fur* sont résistants à de très fortes concentrations de  $Mn^{2+}$ ) pour *P. aeruginosa* (Prince, 1993), il a été possible de démontrer que des mutations dans le gène *fur*-like chez ces bactéries induisent une altération de la régulation des systèmes spécifiques régulés par le fer.

Il y a maintenant suffisamment de preuves pour affirmer que Fur joue divers rôles en contrôlant à la fois l'expression d'autres gènes et le métabolisme de la bactérie. Fur est une protéine pléiotrope qui régule l'expression de nombreux gènes régulés ou non par le fer (Crosa, 1989). Il y a de nombreux exemples de régulation de l'expression de gènes non régulés par le fer par la protéine Fur comme le gène *sodB*, dont l'expression est régulée par Fur de manière positive probablement par une interaction directe ADN-protéine ne nécessitant pas le fer Fe(II) comme co-facteur (Niederhoffer *et al.*, 1990). Autre exemple du pléiotropisme de Fur, les mutants *fur* chez *E. coli* ne peuvent pas pousser en présence de glycérol, succinate ou fumarate en tant que source de carbone. Il a été aussi démontré que, même si l'expression de certains gènes chez *S. typhimurium* sont réprimés par des concentrations élevées en fer, neuf autres protéines sont plus fortement exprimées en présence de Fur et du fer (Foster et Hall, 1992). De plus, des mutants  $Fur^-$  se sont révélés être plus sensibles à l'acidité, une caractéristique qui pourrait être importante dans la capacité d'un pathogène intestinal à parcourir l'estomac et à survivre au niveau intracellulaire (Foster et Hall, 1992).

### 3.2.2. Activation de l'expression des gènes dans des conditions de carence en fer

Une fois que la bactérie atteint des conditions de carence martiale, le contrôle négatif médié par la protéine Fur ne se produit plus. Dans de nombreux systèmes bactériens, cette absence de contrôle négatif par Fur est suffisante; la dérépression des gènes régulés par le fer entraîne une biosynthèse des protéines impliquées dans le transport et dans la biosynthèse des sidérophores. Cependant, dans d'autres systèmes, lorsque la bactérie rencontre des conditions de carence martiale, une régulation positive de l'expression des gènes de virulence est nécessaire pour la synthèse des protéines impliquées dans le transport du fer et/ou la synthèse des sidérophores (Crosa, 1997).

Lorsque la cellule perçoit un manque de fer dans son environnement proche, la nécessité d'exprimer un système de transport du fer est, en quelque sorte, transmise à l'intérieur de la cellule pour rendre opérationnels les activateurs de la transcription d'un système particulier de gènes impliqués dans le transport du fer.

Deux exemples illustrent la régulation complexe des gènes impliqués dans les systèmes bactériens de captation du fer et dans la virulence bactérienne.

### 3.2.2.1. Un exemple de régulation complexe de captation du fer chez *V. anguillarum*

*V. anguillarum* possède un circuit de régulation complexe lié au fer et gouverné par des facteurs négatifs et positifs. La régulation positive est médiée par deux facteurs agissant en trans: AngR et TAF. Ces facteurs induisent en synergie la transcription des gènes impliqués dans la captation du fer et dans la biosynthèse du sidérophore anguibactine. L'anguibactine est un facteur de virulence pour *V. anguillarum* (Salinas *et al.*, 1989). AngR est une protéine régulatrice qui possède deux motifs hélice-boucle-hélice typiques des protéines procaryotiques se liant à l'ADN et des "leucine zippers". Dans des conditions de carence martiale, l'expression du gène *angR* est régulé positivement par le produit TAF, suggérant une cascade d'événements régulateurs dans le contrôle des gènes impliqués dans la captation du fer et dans la virulence chez *V. anguillarum* (Chen *et al.*, 1996a). De plus, le sidérophore anguibactine lui même active la transcription des gènes impliqués dans le transport du fer indépendamment des produits AngR et TAF (Chen *et al.*, 1996b).

### 3.2.2.2. Régulation d'une protéine de la membrane externe par le fer chez *V. cholerae*

Goldberg *et al.* ont identifié un gène chez *V. cholerae*, *irgA*, par mutagenèse par transposition. Ce gène muté induisait une diminution de la virulence de la bactérie dans un modèle animal de cochon d'Inde. La perte concomitante d'une protéine de la membrane

externe de 77 kDa était observée (Goldberg *et al.*, 1990a). Récemment, Goldberg *et al.* ont démontré que Fur régule la transcription de *irgA* (Goldberg *et al.*, 1990b). Ils ont également montré qu'il existe, au niveau du promoteur de ce gène une boîte Fur. Une région, localisée 900 bp en amont du site d'initiation de transcription de *irgA*, est nécessaire pour la transcription de *irgA*. Une phase ouverte de lecture de 894 pb, *irgB*, en orientation inverse par rapport à *irgA*, est incluse dans cette région. IrgB est un activateur de la transcription de l'expression de *irgA*. L'expression de *irgB* est régulé négativement par le fer.

En présence de fortes concentrations en fer, la transcription des gènes *irgA* et *irgB* est réprimée par une protéine Fur-like. Ces deux gènes, *irgA* et *irgB*, sont régulés par le fer. Les gènes ont une orientation inverse et partagent le même site de fixation à Fur. Dans des conditions de carence martiale, la régulation négative de la transcription est supprimée et la production de IrgB induit l'activation positive de la transcription de *irgA*.

### 3.2.3. Mécanisme de contrôle post-transcriptionnel des gènes régulés par le fer

La régulation négative des gènes impliqués dans le transport du fer et certains facteurs de virulence, tels que l'anguibactine chez *V. anguillarum*, est médiée par la protéine Fur et par un ARN antisense, l'ARN $\alpha$ . L'ARN $\alpha$ , qui est seulement exprimé à des concentrations élevées en fer, agit comme un régulateur négatif post-transcriptionnel de la synthèse des protéines associées au transport du fer probablement par interaction avec l'ARNm. Ceci résulte en une modification de la structure secondaire de l'ARNm. La stabilité de l'ARN $\alpha$  dépend de la présence du fer. La protéine Fur est également indispensable pour l'expression de l'ARN $\alpha$  mais les mécanismes de régulation sont encore inconnus (Chen et Crosa, 1996b).

La régulation des gènes impliqués dans le transport du fer et notamment d'un certain nombre de facteurs de virulence est complexe et nécessite plus d'un facteur de régulation.



### 3.3. Conclusion

Nous avons tout d'abord vu dans les généralités de ce mémoire les fonctions essentielles du fer dans tout organisme vivant. Nous nous sommes ensuite intéressés aux différents systèmes de captation du fer développés par les micro-organismes en réponse à une carence martiale imposée par la faible disponibilité en fer libre *in vivo*.

Nous avons vu que chez les bactéries pathogènes, ces mécanismes d'absorption du fer sont étroitement liés à la virulence. Ainsi, le fer ou le manque de fer, joue un rôle important dans l'interaction hôte-pathogène. Le niveau très faible en fer présent chez l'hôte sert de signal à la bactérie pour réguler l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans les mécanismes de capture du fer et dans la virulence bactérienne. Il apparaît maintenant que la protéine Fur joue un rôle clé dans la régulation des gènes impliqués dans les systèmes de captation du fer.

Dans ce mémoire, nous allons présenter dans une première partie les travaux qui ont permis de déterminer, *in vitro*, les effets de la carence en fer sur certaines propriétés de *B. wadsworthia* et de *A. baumannii*. Dans une deuxième partie, nous présenterons les travaux qui ont permis d'identifier et de caractériser le gène qui code la protéine Fur-like chez *A. baumannii*.

Stratégie

---

---

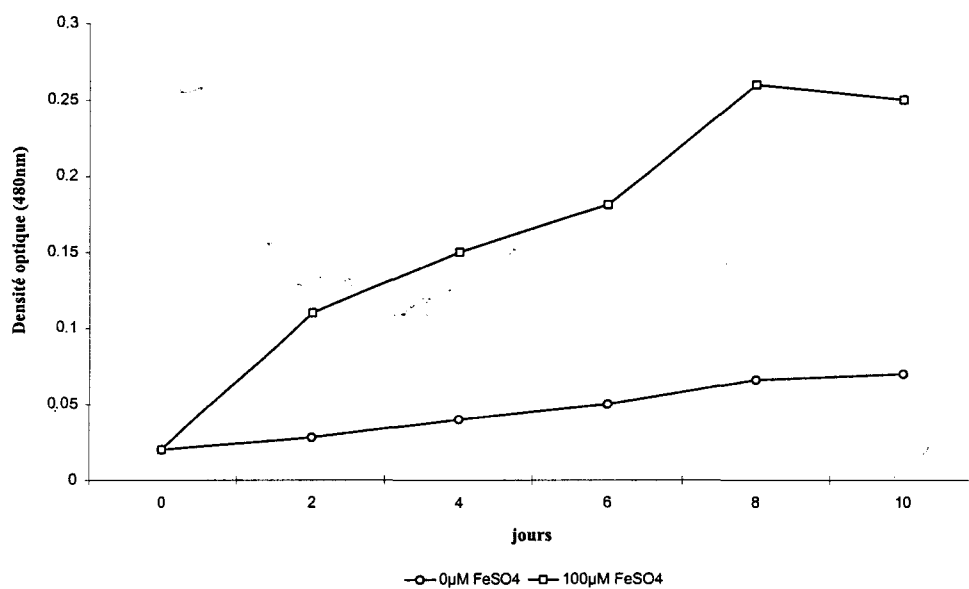
# STRATEGIE

## 1. DONNEES PRELIMINAIRES

### **1.1. Rappel des travaux du DEA: *Bilophila wadsworthia***

Jusqu'à ces dernières années, le rôle des bactéries anaérobies strictes dans les processus infectieux a été négligé. Ceci est dû en partie à une compréhension insuffisante et à un manque d'appréciation du rôle des bactéries anaérobies strictes dans les infections humaines. Par exemple, *B. wadsworthia* n'a été isolé qu'en 1989 alors qu'il est retrouvé dans de nombreux types d'infections chez l'homme et associé à d'autres bactéries pathogènes plus connues comme *E. coli* (Arseze *et al.*, 1997). Au début du travail de DEA, aucune étude n'avait été effectuée ni sur le métabolisme du fer ni sur les mécanismes de virulence de *B. wadsworthia*.

Afin d'initier l'étude de l'adaptation de *B. wadsworthia* dans des conditions de carence en fer, nous avons d'abord mis au point un milieu de culture carencé en fer dans lequel *B. wadsworthia* peut pousser dans des conditions d'anaérobiose stricte (voir appendice technique §1.2.). Nous avons ainsi pu étudier la croissance de *B. wadsworthia* dans le milieu carencé en fer en comparaison avec le milieu supplémenté en sulfate de fer ferrique (voir figure 1). La croissance de *B. wadsworthia* est presque totalement inhibée en cas de carence martiale et cette inhibition de croissance peut être levée par l'addition de sulfate de fer ferrique dans le milieu de culture carencé en fer. Il est nécessaire d'attendre un minimum de 6 jours de culture pour atteindre la fin de la phase exponentielle de croissance des bactéries.



**Figure 1:** Courbes de croissance de *B. wadsworthia* cultivé dans le milieu carencé en fer (○) et dans le milieu supplémenté en sulfate ferrique (100 μM; □), Les valeurs sont une moyenne de deux expériences.

Nous avons réalisé l'extraction des protéines la membrane externe de *B. wadsworthia* afin d'étudier les différences d'expression de celles-ci chez cette bactérie cultivée dans des conditions de carence en fer par comparaison avec des conditions riches en fer pendant 12 jours de croissance. Nous avons ainsi montré que deux protéines de 88 kDa et 190 kDa sont exprimées au niveau de la membrane externe des bactéries cultivées dans des conditions de carence martiale. Ces deux protéines sont réprimées en milieu supplémenté en fer ferrique. Ces résultats nous ont suggéré l'existence d'un ou plusieurs système(s) de captation du fer associé à la membrane externe de *B. wadsworthia*.

## **1.2. Etude de *A. baumannii***

*A. baumannii* est une bactérie fréquemment isolée au laboratoire au cours des infections nosocomiales responsable de septicémies ou de méningites qui sont parfois mortelles chez l'homme. Les études épidémiologiques ont montré que le contrôle de ces infections à *A. baumannii* est un véritable problème en raison de sa transmission rapide au sein d'un service hospitalier. De plus, le clinicien se trouve parfois désarmé devant une souche d'*A. baumannii* multi-résistante aux antibiotiques. Il est donc intéressant d'étudier les mécanismes de virulence de cette bactérie, notamment ses mécanismes d'adaptation à des conditions de carence martiale similaires à celles retrouvées chez l'homme.

## **2. OBJECTIFS DES TRAVAUX**

Le but de ces travaux a été:

- de déterminer, *in vitro*, les effets de la carence en fer sur les propriétés de *B. wadsworthia* et *A. baumannii* qui interviennent dans la virulence

- de déterminer si *B. wadsworthia* et *A. baumannii* développent des systèmes de captation du fer dans des conditions de carence en fer
- de déterminer s'il existe chez *B. wadsworthia* et *A. baumannii* une régulation des systèmes de captation du fer analogue à celle décrite jusqu'à présent chez les bactéries aérobies et anaérobies facultatives par l'intermédiaire d'une protéine Fur-like.

Ces travaux avaient pour objet d'apporter des réponses ou des éléments de réponse aux questions suivantes:

- Le fer est-il un élément indispensable à la croissance de *B. wadsworthia* et de *A. baumannii* ?
- *B. wadsworthia* et *A. baumannii* sont-ils capables de développer, *in vitro*, des systèmes de captation du fer ?
- Ces deux bactéries sont-elles capables de synthétiser des sidérophores ?
- Ces deux bactéries expriment-elles de nouvelles protéines au niveau de leur membrane externe en cas de carence martiale ?
- Ces deux bactéries sont-elles capables d'utiliser les différentes sources de fer présentes chez l'homme ?
- Les changements observés *in vitro* peuvent-ils être observés *in vivo* ?
- Comment le fer régule-t-il l'expression des systèmes de captation du fer développés chez *B. wadsworthia* et *A. baumannii* ?
- Est-ce que *B. wadsworthia*, bactérie anaérobie stricte, possède un gène *fur*-like analogue au gène *fur* identifié chez les bactéries aérobies et anaérobies facultatives sachant que jusqu'à présent aucun gène *fur*-like n'a été identifié chez une bactérie anaérobie stricte ? Quand est-il pour *A. baumannii* ?

L'étude de l'adaptation de *B. wadsworthia* et *A. baumannii* à des conditions de carence en fer nous ont permis d'appréhender l'adaptation de ces deux bactéries chez l'homme. De plus, l'identification d'un gène *fur*-like chez ces deux bactéries est un préalable indispensable à l'étude de la régulation de(s) système(s) de captation du fer développés respectivement par *B. wadsworthia* et *A. baumannii*.

### **3. STRATEGIE D'ETUDE**

#### **3.1. Etude de l'adaptation de *B. wadsworthia* et *A. baumannii* en milieu carencé en fer**

Dans la première partie de notre travail, nous avons cherché à déterminer, *in vitro*, les effets de la carence en fer sur certaines propriétés de *B. wadsworthia* et *A. baumannii*.

##### **3.1.1. Etude de *B. wadsworthia***

Nous avons d'abord confirmé nos résultats obtenus en DEA en comparant la croissance bactérienne, la production de sidérophore et l'expression des protéines de la membrane externe des bactéries cultivées dans le milieu carencé en fer ou dans le milieu supplémenté en fer précédemment décrit (§ 1.1.). Nous avons observé des différences dans la cinétique de croissance et dans l'expression des protéines de la membrane externe. Nous n'avons pas détecté d'activité sidérophore chez *B. wadsworthia*. De plus, afin de déterminer les propriétés immunogènes des protéines exprimées dans des conditions de carence martiale, nous avons réalisé au laboratoire un sérum polyclonal de lapin dirigé contre des bactéries entières *B. wadsworthia* tuées qui avaient été au préalable cultivées en milieu carencé en fer.

Ces résultats expérimentaux, et plus particulièrement l'absence de sécrétion de sidérophore, nous ont amené à rechercher si la bactérie était capable de développer un ou plusieurs système(s) de captation du fer par l'intermédiaire des sources de fer présentes chez l'hôte comme l'hémoglobine, l'hémine, la transferrine ou la lactoferrine. Nous avons ainsi montré que la bactérie était capable d'utiliser l'hémoglobine, la transferrine, la lactoferrine et l'hémine comme seule source de fer. Nous avons étudié l'expression des

protéines de la membrane externe des bactéries cultivées en milieu carencé en fer supplémenté en hémoglobine, transferrine, lactoferrine ou hémine.

Parmi les protéines de la membrane externe exprimées dans des conditions de carence martiale, nous nous sommes focalisés sur une seule protéine qui est toujours exprimée dans des conditions de carence martiale chez toutes les souches de *B. wadsworthia* étudiées et qui s'est révélée être immunogène chez un lapin hyperimmunisé. Cette protéine a été purifiée par électro-élution. Nous avons pu, avec la protéine purifiée, initier le clonage du gène correspondant. Deux stratégies différentes étaient possibles. Elles sont résumées sur la Figure 2. Pour des raisons pratiques, nous avons choisi la stratégie de clonage par des oligonucléotides dégénérés obtenus grâce au microséquençage de la protéine purifiée (Figure 3).

### 3.1.2. Etude de *A. baumannii*

Nous avons comparé la croissance bactérienne, l'expression de l'activité sidérophore et des protéines de la membrane externe de *A. baumannii* cultivé dans un milieu chimiquement défini carencé ou supplémenté en fer. Nous avons observé des différences dans la cinétique de croissance, l'expression de l'activité sidérophore et l'expression des profils protéiques de la membrane externe et des protéines cytoplasmiques.

### 3.1.3. Conclusion

Ces résultats ont montré que *B. wadsworthia* et *A. baumannii* s'adaptent à des conditions de carence martiale en développant un ou plusieurs système(s) de captation du fer. En conclusion, le fer joue un rôle primordial dans la régulation de ces différents systèmes de captation du fer. Comment le fer régule-t-il l'expression de tels systèmes ? Existe-t-il un gène codant une protéine *fur*-like chez *B. wadsworthia* et *A. baumannii* ?



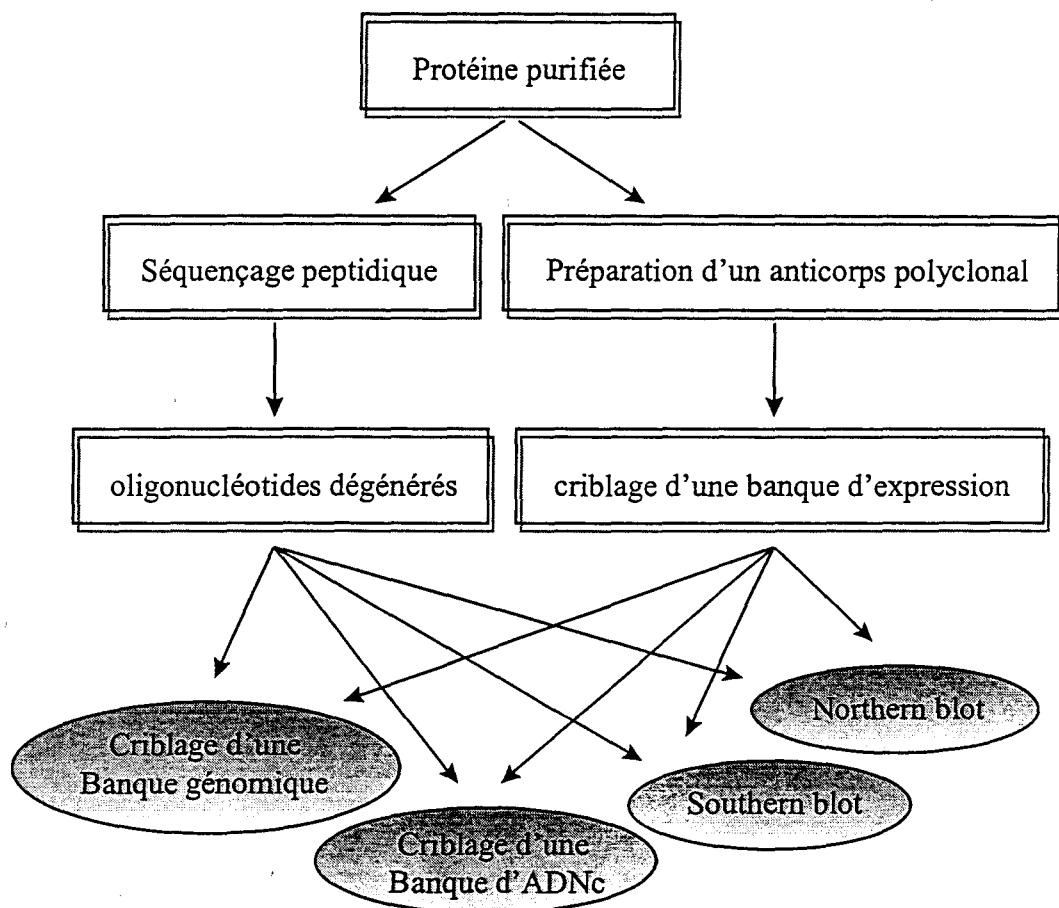
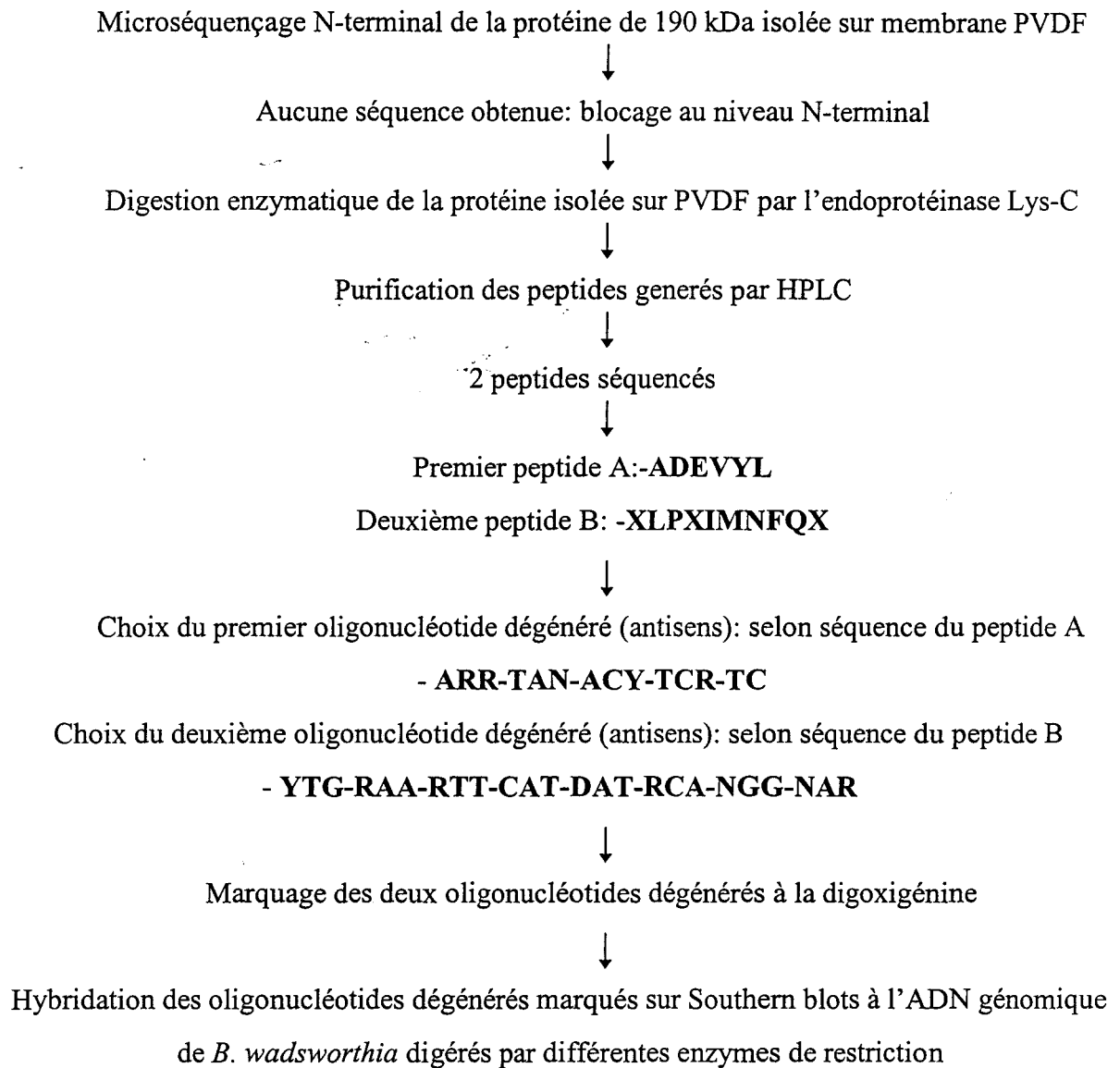


Figure 2: Stratégies de clonage à partir d'une séquence protéique



**Figure 3: Microséquençage de la protéine et stratégie de clonage du gène qui code la protéine à partir de deux séquences internes**

### **3.2. Identification du gène qui code une protéine Fur-like chez *B. wadsworthia* et *A. baumannii***

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons recherché un gène *fur*-like chez *B. wadsworthia* et *A. baumannii*.

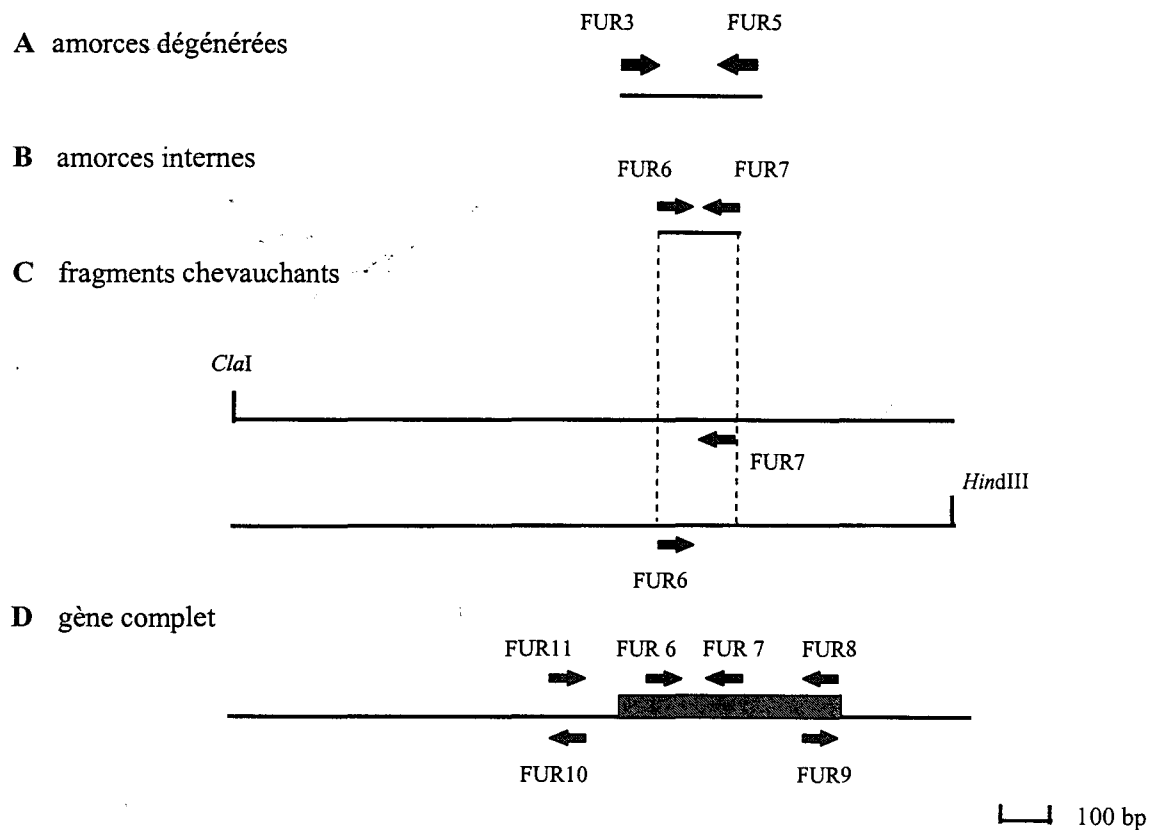
#### **3.2.1. Détection d'une protéine Fur-like**

Nous avons d'abord recherché par des immunoblots l'expression d'une protéine Fur-like parmi les protéines cytoplasmiques de *B. wadsworthia* et *A. baumannii*. Les protéines cytoplasmiques des deux bactéries ont été respectivement mises en contact avec un sérum polyclonal de lapin dirigé contre la protéine Fur de *E. coli*. Un immunoblot a révélé une forte immuno-réactivité entre le sérum et une protéine cytoplasmique de taille attendue (16-17 kDa) chez *A. baumannii*. Ce résultat nous a fortement suggéré l'existence d'une protéine Fur-like chez *A. baumannii* avec des déterminants antigéniques communs à la protéine Fur de *E. coli*. Un second immunoblot a révélé une faible immuno-réactivité entre le sérum et une protéine cytoplasmique de taille attendue chez *B. wadsworthia*. En opposition au résultat obtenu chez *A. baumannii*, ce résultat nous a conduit à émettre avec beaucoup de précaution l'hypothèse de l'existence d'une protéine Fur chez *B. wadsworthia*.

Ces résultats expérimentaux nous ont amené à rechercher un gène putatif *fur*-like chez ces deux bactéries.

#### **3.2.2. Clonage du gène *fur*-like chez *B. wadsworthia* et *A. baumannii***

La stratégie de clonage du gène *fur*-like chez *A. baumannii* est illustrée sur la Figure 4. Ce travail nous a permis de développer au laboratoire de nouvelles techniques de biologie moléculaire: le clonage et le séquençage.



**Figure 4:** Stratégie de clonage du gène *fur* de *A. baumannii* (voir texte pour légende). Les flèches ne sont pas à l'échelle, les flèches dirigées vers la droite représentent les amorces sens et les flèches dirigées vers la gauche les amorces antisens. La boîte hachurée représente la phase ouverte de lecture.



### 3.2.2.1. PCR utilisant des amorces dégénérées

Nous avons aligné les séquences peptidiques des protéines Fur des bactéries *E. coli* (Schaffer *et al.*, 1985), *Y. pestis* (Staggs et Perry, 1991), *V. anguillarum* (Tolmasky *et al.*, 1994), *V. vulnificus* (Litwin et Calderwood, 1993b), *P. aeruginosa* (Prince *et al.*, 1993) et *L. pneumophila* (Hickey et Cianciotto, 1994). Certaines régions de ces séquences peptidiques sont très conservées (Figure 5). Nous avons émis l'hypothèse que les protéines Fur de *B. wadsworthia* et *A. baumannii* sont similaires aux autres protéines Fur décrites précédemment. Une amorce sens, appelée FUR3, ayant une séquence dégénérée déduite de l'alignement des régions les plus conservées des parties amino-terminales des protéines Fur décrites, a été synthétisée (Tableau 1). Cette amorce est un 25-mers représentant 32 combinaisons possibles. De même, nous avons choisi, d'après les régions les plus conservées des parties carboxy-terminales des protéines Fur décrites, une deuxième amorce antisens dégénérée, appelée FUR5 (Tableau 1). Cette amorce est un 29-mers représentant 1152 combinaisons possibles.

Nous avons tout vérifié que les deux amorces dégénérées FUR3 et FUR5 permettaient d'amplifier chez *E. coli* un seul fragment d'ADN de taille attendue (260-pb) et que la séquence de ce fragment d'ADN cloné correspondait à la séquence nucléotidique du gène *fur* de *E. coli*. Cette expérience a permis de valider les deux amorces dégénérées FUR3 et FUR5. Cette expérience nous a également permis de mettre au point les différentes techniques qui permettent d'amplifier un fragment d'ADN en utilisant des amorces dégénérées et de cloner directement ce fragment d'ADN en vecteur plasmidique. De plus, nous avons montré que le fragment *fur* FUR3-FUR5 amplifié chez *E. coli* et utilisé comme sonde sur des dots blots, s'est hybridé à l'ADN génomique de *A. baumannii* ainsi qu'à l'ADN génomique de *B. wadsworthia*.

Les deux amorces FUR3 et FUR5 ont permis d'amplifier chez *A. baumannii* un fragment d'ADN FUR3-FUR5 de taille attendue (260-pb). La séquence peptidique, déduite de la séquence nucléotidique du fragment d'ADN FUR3-FUR5 cloné est similaire

aux autres séquences Fur décrites jusqu'à présent. Aucun résultat satisfaisant n'a été obtenu pour *B. wadsworthia*.

```

      1          10          20          30          40          50
EC MTD - NNTALKKKAGLKVTLPR LKILEVLQEPDNHHVSAEDLYKRLIDMGEEI
YP MTD - NNKALKKNAGLKVTLPR LKILEVLQNPACHHVS AEDLYKILIDIGEEI
VA MSD - NNQALKDAGLKVTLPR LKILEVLQQPEQCQHISA EELYKKLIDLGEEI
VV MSD - NNQALKDAGLKVTLPR LKILEVLQQPDCQHISA EELYKKLIDLGEEI
VC MSD - NNQALKDAGLKVTLPR LKILEVLQQPEQCQHISA EELYKKLIDLSEEI
PA MVE - - NSELRKAGLKVTLPR VKILQMLDSAEQRHMSAEDVYKALMEAGEDV
LP MEE - - SQQPKDAGLKITLPR I KVLQILEQSRNHHS AEA VYKALLESGEDV

      60          70          80          90          100
EC GLATVYRVLNQFDDAGIVTRHNFEGGKSVFELTQQHHHDHLICLDCGKVI
YP GLATVYRVLNQFDDAGIVTRHNFEGGKSVFELTQQHHHDHLICLDCGKVI
VA GLATVYRVLNQFDDAGIVTRHHFEGGKSVFELSTQHHHDHLVCLDCGEVI
VV GLATVYRVLNQFDDAGIVTRHHFEGGKSVFELSTQHHHDHLVCLDCGEVI
VC GLATVYRVLNQFDDAGIVTRHHFEGGKSVFELSTQHHHDHLVCLDCGEVI
PA GLATVYRVLTQFEAAGLVVRHNFDDGGHAVFELADSGHHDHMVCVDTGEVI
LP GLATVYRVLTQFEAAGLVSRHNFEGGHSVFELSQGEHHDHLVCKCGRVE

      110          120          130          140
EC EFSDDSI E ARQREI AAKHGIRL TNHSLYLYGHCAEGD - CREDEHAHEGK
YP EFSNESI E SLQREI AKQHGIKLTNHS LYLYGH CETGN - CREDESAHSKR
VA EFSGEVI EQ RQREI AEQYNVQLTNHSLYLYGKCA - DG SCKQNPNAHKS KR
VV EFSDDI I EERQKEI AAAYNVQLTNHSLYLYGKCGDGS - CKGNPDAHKRKS
VC EFSDDVI EQ RQKEI AAKY NVQLTNHSLYLYGKCGSDGS CKDNPNAHKPKK
PA EFMDAE I EKRQKEI VRERGFELVDHNLVLY - - - - - VRKK
LP EFVDE I I EQ RQKAI AERAHFKMTDHALNIY GICPQ - - - CQ

```

**Figure 5: Aligement des séquences des protéines Fur des bactéries *E. coli* (EC); *Y. pestis* (YP); *V. anguillarum* (VA); *V. vulnificus* (VV); *V. cholerae* (VC); *P. aeruginosa* (PA); *L. pneumophila* (LP) (voir texte pour légende). Les régions ombrées sont les plus régions les plus conservées à partir desquelles nous avons choisi les oligonucléotides dégénérés FUR3 et FUR5.**



Choix de l'oligonucléotide dégénéré FUR3 (sens)										
<i>E. coli</i>	A	G	L	K	V	T	L	P	R	
<i>Y. pestis</i>	A	G	L	K	V	T	L	P	R	
<i>V. anguillarum</i>	A	G	L	K	V	T	L	P	R	
<i>V. vulnificus</i>	A	G	L	K	V	T	L	P	R	
<i>V. cholerae</i>	A	G	L	K	V	T	L	P	R	
<i>P. aeruginosa</i>	A	G	L	K	V	T	L	P	R	
<i>L. pneumophila</i>	A	G	L	K	I	T	L	P	R	
Séquence peptidique consensus	A	G	L	K	V I	T	L	P	R	
Séquence nucléotidique consensus déduite	GCI	GGI	YTI	AAR	RTI	ACI	YTI	CCI	MG	
Choix de l'oligonucléotide dégénéré FUR5 (antisens)										
<i>E. coli</i>	H	D	H	L	I	C	L	D	C	G
<i>Y. pestis</i>	H	D	H	L	I	C	L	D	C	G
<i>V. anguillarum</i>	H	D	H	L	V	C	L	D	C	G
<i>V. vulnificus</i>	H	D	H	L	V	C	L	D	C	G
<i>V. cholerae</i>	H	D	H	L	V	C	L	D	C	G
<i>P. aeruginosa</i>	H	D	H	M	V	C	V	D	T	G
<i>L. pneumophila</i>	H	D	H	L	V	C	V	K	C	G
Séquence peptidique consensus	H	D	H	L M	V I	C	L V	D K	C T	G
Séquence nucléotidique consensus déduite (sens)	CAY	GAY	CAY	HTI	RTI	TGY	BTI	RAI	WSI	GG
Séquence nucléotidique consensus déduite (antisens)	CC	ISW	ITY	IAV	RCA	IAY	IAD	RTG	RTC	RTG

**Tableau 1: Choix des oligonucléotides dégénérés FUR3 et FUR5 (voir texte pour légende)**

Le clonage du gène *fur* de *A. baumannii* a été poursuivi.

### 3.2.2.2. PCR utilisant des amorces internes

Afin de cloner un fragment spécifique du gène *fur* de *A. baumannii*, une amorce sens, appelée FUR6, et une amorce antisens, appelée FUR7, ont été choisies d'après la séquence nucléotidique du fragment d'ADN FUR3-FUR5 de *A. baumannii*. Le couple d'amorces FUR6 et FUR7 a permis d'amplifier chez *A. baumannii* un fragment d'ADN de taille attendue FUR6-FUR7 (178-pb). Le fragment d'ADN FUR6-FUR7 a été cloné et séquencé afin de vérifier qu'il était spécifique et interne au fragment d'ADN FUR3-FUR5 de *A. baumannii*.

Le fragment d'ADN FUR6-FUR7, marqué à la digoxigénine, a été hybridé sur des Southern blots à de l'ADN de *A. baumannii* digéré par différentes enzymes de restriction. Ce fragment FUR6-FUR7 s'est hybridé entre autre à une bande unique *HindIII-ClaI* de 1,7 kb. Nous avons supposé que ce fragment de 1,7 kb était assez grand pour contenir le gène *fur*-like de *A. baumannii* dans son entier ainsi que ses régions flanquantes. Ce fragment d'ADN *HindIII-ClaI*, après purification, a été ligué dans le plasmide pBluescript KS(+) pour obtenir une mini-banque d'ADN *HindIII-ClaI* de *A. baumannii*.

### 3.2.2.3. Criblage de la mini-banque *HindIII-ClaI* de *A. baumannii*

A partir du produit de ligation *HindIII-ClaI*, vecteur plasmidique, nous avons utilisé deux méthodes différentes de criblage:

- transformation du produit de ligation, étalement des bactéries sur boîte et recherche des clones d'intérêt par hybridation à la sonde spécifique interne FUR6-FUR7
- amplification par PCR sur le produit de ligation en utilisant les amorces internes FUR6 et FUR7 couplées chacune à une amorce spécifique universelle du vecteur plasmidique.

La seconde méthode nous a donné de bons résultats exploitables. Deux fragments d'ADN d'environ 700-pb et 1300-pb, ont été amplifiés, clonés et séquencés. Ces fragments d'ADN se sont révélés être chevauchants sur 178-pb (équivalent à la taille du fragment d'ADN FUR6-FUR7).

#### 3.2.2.4. Clonage et séquençage complet du gène *fur*-like de *A. baumannii*

Afin de vérifier que ces deux fragments chevauchants sont issus du même gène *fur*-like de *A. baumannii*, nous avons synthétisé une amorce sens, FUR8, et une amorce antisens, FUR11, d'après la séquence nucléotidique de ces deux fragments chevauchants. Ces deux amorces bordent le gène *fur* complet. Ces deux amorces ont permis de cloner un seul fragment d'ADN amplifié par PCR sur l'ADN génomique de *A. baumannii*.

## Résultats

---

---

## RESULTATS

### 1. INFLUENCE DU FER SUR *B. WADSWORTHIA*

#### 1.1. Etude de la croissance de *B. wadsworthia* en milieu carencé en fer

##### 1.1.1. Présentation du travail

Par rapport aux bactéries aérobies, peu d'études ont été effectuées sur l'adaptation des bactéries anaérobies strictes en milieu carencé en fer. *B. fragilis* et *P. gingivalis* sont les deux seules bactéries anaérobies strictes chez lesquelles des études approfondies sur le métabolisme du fer ont été rapportées dans la littérature (Otto *et al.*, 1988; Bramanti et Holt, 1990; Otto *et al.*, 1994; Genco *et al.*, 1994; Otto *et al.*, 1996). Ces deux bactéries s'adaptent dans des conditions de carence en fer en développant essentiellement des mécanismes de captation du fer à partir des composés hémiques présents chez l'hôte (Otto *et al.*, 1990; Genco, 1995; Karunakaran *et al.*, 1997).

Il est cependant important de comprendre comment une bactérie s'adapte dans des conditions de carence en fer afin d'évaluer sa capacité de survivre et d'entraîner une infection chez l'hôte.

Notre étude sur l'adaptation de *B. wadsworthia* dans des conditions de carence en fer est la première étude réalisée sur le métabolisme du fer chez cette bactérie.

Dans l'article intitulé “ **Effect of iron depletion on protein profiles of *B. wadsworthia*** “, nous avons étudié la croissance, la recherche de la production d'un sidérophore et l'expression des protéines de la membrane externe de quatre souches de *B. wadsworthia* cultivées en milieu carencé et supplémenté en fer sur une période de 14 jours. De plus, afin de déterminer les propriétés immunogènes des protéines exprimées dans les conditions de carencé martiale, nous avons réalisé au laboratoire un sérum polyclonal de lapin dirigé contre des bactéries entières de *B. wadsworthia* tuées qui avaient été au préalable cultivées en milieu carencé en fer.

Ces travaux sont une première étape indispensable dans l'étude du métabolisme du fer chez *B. wadsworthia* et de l'adaptation de cette bactérie en milieu carencé en fer.

### 1.1.2. Article: Effect of iron depletion on protein profiles of *B. wadsworthia*

**Effect of Iron Depletion on Protein Profiles of *Bilophila wadsworthia*.** CATHERINE DANIEL, ELLEN J. BARON, AND RENÉ J. COURCOL. From the Bacteriology Laboratory, A. Calmette Hospital, Lille, France; and UCLA School of Medicine, Los Angeles, California

Pathogenicity of microorganisms is a multifactorial phenomenon. Host environment plays a role in the development of the infectious process. The presence of key nutrients, such as iron, may be important for the expression of virulence factors. Iron is an essential component of a wide variety of biochemical processes in microorganisms, and its availability is of major importance in bacterial pathogenesis. In response to a low level of available iron in vivo, the creation of high-affinity iron-uptake systems and of a number of iron-regulated membrane proteins is induced. Although relationships between iron and virulence factors of aerobes have been better studied, a few such studies have been carried out with regard to anaerobes (mainly *Bacteroides fragilis*) [1, 2].

As discussed by Duerden [3], there is as yet no clear understanding of many of the virulence factors of anaerobes. Little is known about the mechanisms of iron uptake used by anaerobic bacteria, and nothing about those of *Bilophila wadsworthia*. The purpose of this work was to study the properties of this recently recognized anaerobe in relation to iron metabolism. *B. wadsworthia* is an anaerobic, gram-negative, asaccharolytic, bile-resistant, and strongly catalase-positive bacillus [4]. This bacterium was first isolated from patients with gangrenous and perforative appendicitis. This study sought to determine whether *B. wadsworthia* expressed iron-regulated outer-membrane proteins (OMPs) in an iron-depleted environment and whether these proteins were immunogenic.

Iron-free reagents and materials were used to prepare the iron-free medium. In this work, all glassware was deferrated. Chemicals used to prepare the medium were of highest purity. The medium was one previously described, to which oxgall (2%) and pyruvate (10 mM) were added [5]. The medium components were deferrated with Chelex-100 resin (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), except for  $MgSO_4$ , amino acids, and vitamins. Medium without iron contained  $<0.04 \mu M Fe^{+++}$ . Iron was added to a concentration of  $100 \mu M$  in preparation of the iron-containing medium. The final pH was adjusted to 7.0–7.1.

Four strains of *B. wadsworthia* originally isolated from appendicitis case specimens were studied, including the reference strain ATCC 49260. They were all incubated for 14 days in 200-mL flask cultures (in media with and without iron) at 37°C in an anaerobic atmosphere. Detection of siderophores in culture supernatants was attempted by means of the method described by Schwyn and Neilands [6]. Preparation of the outer membrane was accomplished according to the method described by Sprott et al. [7]. Cells harvested by centrifugation were disrupted ultrasonically. Unbroken cells were discarded by centrifugation. The supernatant was treated with 2% Triton

X-100 (Sigma Chemical, St. Louis) to solubilize the cytoplasmic membranes and release cellular extract material. After centrifugation at 100,000g for 60 minutes at 4°C, the supernatant containing the soluble cellular extract was retained for detection of cellular proteins by SDS-PAGE. The detergent-insoluble fraction in the pellet was treated with lysozyme (1 mg/mL) to digest cell wall peptidoglycan. The remaining OMPs in this fraction were concentrated by further centrifugation. The resulting pellet contained the OMPs.

The results of this study show that treatment of complex media with resin removes sufficient iron to impose conditions of iron deprivation on these gram-negative bacteria, as judged on the basis of both the growth kinetics and the expression of iron-regulated OMPs in the outer-membrane preparations. Growth kinetics in the iron-restricted vs. iron-rich medium were compared over 7 days. Strains grew at the same rate in each medium; the logarithmic phase for bacteria grown in iron-restricted medium was longer, whatever the strain tested. Iron restriction also had a significant lengthening effect on the logarithmic-growth phase for all four strains, resulting in a slower overall growth rate. There were differences in final bacterial counts at 14 days due to the differences in the growth rates. Bacterial counts were lower in the iron-restricted medium.

Electrophoresis was performed on cell extracts to detect differences between bacterial cells cultured in iron-restricted vs. iron-rich medium. The cellular protein banding patterns were similar for both media. Results differed with regard to the OMP profiles. Of particular interest were four bands visualized at molecular weights of 190 kD, 88 kD, 29 kD, and 16 kD (figure 1). The two bands at molecular weights of 190 kD and 88 kD were expressed during the logarithmic-growth phase, while the 16-kD protein was expressed at the end of the logarithmic phase. The 29-kD protein appeared during the stationary phase. This OMP banding pattern was similar for all four strains studied.

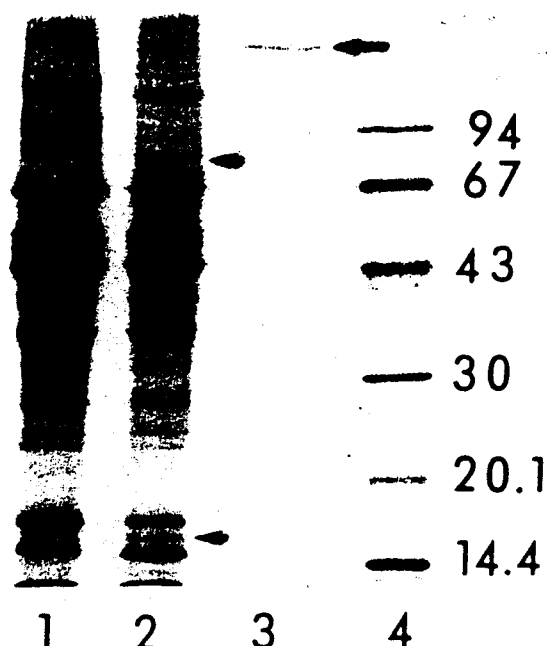
We can express only hypotheses regarding the function of these iron-regulated OMPs. The presence of such OMPs suggests the existence of a system for scavenging iron from the culture medium. One hypothesis is that proteins act as a channel through which the iron either diffuses or is actively transported. Such a channel may not be required in an iron-rich environment because there is enough iron to allow passive diffusion into the cell.

Another hypothesis is that these proteins could be receptors for exogenous siderophores that are present at the infectious site. As infections involving anaerobes are polymicrobial, anaerobes might use siderophores produced by aerobes. Under anaerobic conditions, *Escherichia coli* is known to synthesize siderophores. Thus, it is possible that one or several OMPs could be receptors for such exogenous siderophores. It will be important to determine if anaerobes are able to use iron from siderophores produced by other bacteria. To internalize a siderophore, three kinds of proteins are required: a protein on the outer membrane, a protein in the periplasmic space, and a protein in the cytoplasmic membrane. With use of the universal chemical reagent method of Schwyn and Neilands [6], siderophore production was not detected in the supernatants of these bacterial cultures.

Financial support: Conseil Régional Nord-Pas de Calais, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, and Direction de la Recherche et des Etudes Doctorales.

Reprints or correspondence: Dr. René J. Courcol, Bacteriology Laboratory, A. Calmette Hospital, 59037 Lille cédex, France.

Clinical Infectious Diseases 1995;20(Suppl 2):S158-9  
© 1995 by The University of Chicago. All rights reserved.  
1058-4838/95/2006-0050\$02.00



**Figure 1.** SDS-PAGE profiles of the OMPs of *B. wadsworthia*. Lane 1: OMPs prepared from bacteria cultured in iron-rich medium; lane 2: OMPs prepared from bacteria cultured in iron-depleted medium; lane 3: the 190-kD purified protein; lane 4: molecular weight standards, in kD (arrows indicate iron-regulated proteins with molecular masses of 190 kD, 88 kD, and 29 kD).

However, the existence of the strong catalase of *B. wadsworthia* suggests the existence of a siderophore. In an anaerobic environment, ferric iron is converted into ferrous iron. In the presence of catalase, this reaction could be reverted, creating an environment in which siderophore production is possible. Experiments confirming the lack of siderophore production are still in progress.

Two other iron-uptake systems are possible; the first is an interaction between transferrin and its receptor on the bacterial wall. To check this hypothesis, we plan to study the influence of transferrin on the growth of *B. wadsworthia*. The second system entails the release of iron from transferrin mediated by a reducing agent. The released iron could be taken up within the cell by a carrier of Fe<sup>++</sup>. In our experiments, the detected proteins were produced under metabolic stress. It is possible that their production was triggered in response to the bacteria's need for an additional transport system to facilitate the entrance of iron into the cell.

We produced an immune rabbit serum by inoculating rabbits intradermally with killed whole bacteria (10<sup>9</sup> bacteria in 1 mL of 0.85% saline solution mixed with 1 mL of incomplete Freund's adjuvant) grown in iron-depleted medium. Injections by the same route were repeated after 3 weeks. *B. wadsworthia* were grown in iron-depleted medium and treated as described to obtain OMPs. After separation on SDS-PAGE gel slabs and transference onto nitrocellulose membranes by electroblotting, proteins on membranes were exposed to the hyperimmune sera. Bands were visualized with anti-rabbit goat horseradish peroxidase conjugate and 3-3' diaminobenzidine. No reactive bands appeared with control sera collected before inoculation. Antibodies to the 190-kD OMP were first detected in the serum obtained during the third week after inoculation. The immune response increased after the second bacterial inoculation.

In conclusion, our work has shown that *B. wadsworthia* produces four proteins that were not expressed in an iron-rich medium. At sufficient intracellular concentrations, iron could act as a repressor of gene expression, preventing transcription of those proteins. The 190-kD protein was detected by anti-*Bilophila* hyperimmune rabbit serum.

**Acknowledgments**

The authors thank M. C. Limbert, C. Garcette (for technical assistance), and Claude Vandepierre (for photography).

**References**

1. Verweij-van Vught AMJJ, Otto BR, Namavar F, Sparrius M, MacLaren DM. Ability of *Bacteroides* species to obtain iron from iron salts, haem-compounds and transferrin. FEMS Microbiol Lett 1988; 49:223-8.
2. Otto BR, Verweij WR, Sparrius M, et al. Human immune response to an iron repressible outer membrane protein of *Bacteroides fragilis*. Infect Immun 1991;59:2999-3003.
3. Duerden BI. Virulence factors in anaerobes. Clin Infect Dis 1994; 18(suppl 4):S253-9.
4. Baron EJ, Summanen P, Downes J, Roberts MC, Wexler HM, Finegold SM. *Bilophila wadsworthia*, gen. nov. and sp. nov., a unique gram-negative anaerobic rod recovered from appendicitis specimens and human faeces. J Gen Microbiol 1989; 135:3405-11.
5. Courcol RJ, Lambert PA, Fournier P, Martin GR, Brown MRW. Effect of iron depletion and subinhibitory concentrations of antibiotics on siderophore production by *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 1991;28:663-8.
6. Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal Biochem 1987;160:47-56.
7. Sprott GD, Koval SF, Schnaitman CA. Cell fractionation. In: Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR, eds. Methods for general and molecular bacteriology. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994:72-103.



### 1.1.3. Résumé

Afin d'initier l'étude de l'adaptation de *B. wadsworthia* dans des conditions de carence en fer, nous avons mis au point un milieu de culture carencé en fer dans lequel *B. wadsworthia* peut pousser dans des conditions d'anaérobiose stricte (voir appendice technique §1.2.).

Nous avons ainsi montré que la croissance de *B. wadsworthia* est inhibée dans des conditions de carence en fer extrême et que celle-ci est fortement stimulée par l'addition de sulfate de fer dans le milieu de culture. Le fer est un élément indispensable à la croissance bactérienne et le sulfate ferrique est utilisé par *B. wadsworthia* comme seule source de fer *in vitro*.

Les bactéries cultivées en milieu carencé en fer expriment au niveau de leur membrane externe trois protéines de 190 kDa, 88 kDa et 16 kDa après 6 jours de culture (correspondant à la fin de la phase exponentielle de croissance). Les bactéries cultivées dans le milieu carencé en fer expriment une nouvelle protéine de 29 kDa après 14 jours de culture (phase stationnaire). Les quatre protéines de 190 kDa, 88 kDa, 16 kDa et 29 kDa sont complètement réprimées par le fer. De plus, la protéine de 190 kDa s'est révélée être immunogène chez un lapin hyperimmunisé par un antisérum anti-*B. wadsworthia* réalisé au laboratoire. Ce résultat a révélé l'expression de la protéine *in vivo*.

Aucune production de sidérophore n'a été détectée ni en milieu carencé en fer ni en milieu supplémenté en fer.

Les résultats de ces premiers travaux nous ont permis d'envisager de rechercher si la bactérie était capable de développer des mécanismes de captation du fer autres que la synthèse de sidérophores. De plus, le rôle des protéines de la membrane externe régulées par le fer restait à préciser.

Ces premiers résultats nous ont amené à nous intéresser plus particulièrement à la protéine de 190 kDa. Celle-ci a été purifiée. Le clonage du gène correspondant a été entrepris.

## **1.2. Influence de diverses sources de fer sur la croissance et l'expression des protéines de la membrane externe de *B. wadsworthia***

### **1.2.1. Présentation du travail**

Le succès d'un pathogène dépend de sa capacité à coloniser les tissus de l'hôte et à échapper aux mécanismes de défense de l'hôte. L'environnement de l'hôte joue un rôle important dans le développement des processus infectieux (Wooldridge et Williams, 1993). La presque totalité du fer dans un organisme de mammifère est maintenu au niveau intracellulaire dans la ferritine ou les composés hémiques. De plus, le fer présent au niveau extracellulaire est chélaté par les glycoprotéines de l'hôte: la transferrine et la lactoferrine (Otto *et al.*, 1992). Ainsi, les microorganismes doivent posséder des mécanismes pour accéder aux sources de fer de l'hôte. Un premier mécanisme implique la synthèse de sidérophores et le transport spécifique des complexes sidérophores-Fe<sup>3+</sup> à travers la membrane externe (Wooldridge et Williams, 1993). D'autres mécanismes reposent sur l'interaction entre des systèmes bactériens spécifiques de reconnaissance et de transport et la lactoferrine, la transferrine et les composés hémiques de l'hôte.

Dans l'étude précédente, nous avons montré que la croissance de *B. wadsworthia* est inhibée dans des conditions de carence en fer et que le sulfate ferrique est utilisé *in vitro* par la bactérie comme seule source de fer. *B. wadsworthia* exprime au niveau de sa membrane externe deux protéines majeures de 190 kDa et 88 kDa en réponse aux conditions de carence martiale. Alors qu'aucune activité sidérophore n'a été jusqu'à présent mise en évidence dans nos travaux (article 1), nous nous sommes posés la question: la bactérie peut elle développer des mécanismes de captation du fer autres que la synthèse de sidérophores pour sa croissance ?

L'article intitulé " **Effects of host iron transport compounds on growth kinetics and outer membrane expression of *B. wadsworthia*** " rapporte pour la première fois

l'étude de l'influence *in vitro* de diverses sources de fer présentes chez l'hôte comme d'une part la transferrine, la lactoferrine, l'hémine et l'hémoglobine et d'autre part des sources de fer inorganiques (sulfate ferreux et sulfate ferrique) sur la croissance de *B. wadsworthia* et les profils protéiques de sa membrane externe.

**1.2.2. Article: Effects of host iron transport compounds on growth kinetics and outer membrane expression of *B. wadsworthia***

**Effects of Host Iron Transport Compounds on Growth Kinetics and Outer-Membrane Protein Expression of *Bilophila wadsworthia*.**

**Catherine Daniel\***, Marie-Christine Bissinger and René J. Courcol

Bacteriology-Hygiene Laboratory, A. Calmette Hospital, Lille, France.

**Running title:** Iron acquisition in *Bilophila wadsworthia*.

**Key-Words:** *Bilophila wadsworthia* - iron - anaerobe - outer membrane protein - heme - transferrin - lactoferrin.

**\* Author's address for correspondence:**

Catherine Daniel

Bacteriology-Hygiene Laboratory

A. Calmette Hospital

59037 - Lille cédex

France

Telephone number: (33).3.20.44.54.80.

Fax number: (33).3.20.44.48.95.

**Abstract**

Since the environmental iron concentration has emerged as an important attribute in the expression of bacterial virulence, the purpose of this study was to determine the effects of transferrin, lactoferrin, heme compounds, and inorganic iron sources (ferric and ferrous sulfate) on the growth of *Bilophila wadsworthia* and to study its outer membrane composition when grown under these different simulated *in vivo* conditions. Lactoferrin, transferrin, hemin and hemoglobin supported full growth of the bacteria in media lacking other iron sources. *B. wadsworthia* was also capable of growing in the presence of ferrous and ferric sulfate. Profiles obtained by SDS-PAGE showed two iron-regulated outer membrane proteins (IROMPs) of 190 kDa and 88 kDa. The 190 kDa was susceptible to proteinase K cleavage in whole cells, indicating its exposure at the cell surface. These two major IROMPs were expressed in iron-restricted media supplemented with iron-bound organic sources and repressed by the addition of inorganic iron sources.

## Introduction

The success of a pathogen depends on its ability to colonize host tissues and counter host defense mechanisms. Host environment plays a role in the development of the infectious processes [1]. For instance, iron is an essential compound involved in a wide variety of biochemical processes in many microorganisms. Therefore, its availability is of major importance in bacterial pathogenesis. Virtually all iron within the mammalian body is held intracellularly as ferritin or as heme compounds, pools which are generally inaccessible to invading microorganisms. Additionally, the small amount of iron present in extracellular spaces is effectively chelated by high-affinity iron-binding host glycoproteins: transferrin is present in serum and lymph while lactoferrin functions to bind free iron present in secretory fluids and milk [2]. Thus, invading microorganisms must possess some mechanisms by which they gain access to host iron sources. One way of acquiring iron involves the synthesis of siderophores and specific transport systems for the uptake of the iron-loaded siderophores into the cell. Other mechanisms for obtaining iron from the host rely on the interaction between specific microbial recognition and transport systems and host transferrin, lactoferrin or heme-containing compounds [1].

While relationships between iron and virulence factors have been studied more extensively in aerobic and facultative anaerobic bacteria, only a few studies have been carried out for anaerobes [3]. In these limited studies, Otto *et al.* determined the existence of iron-repressible outer membrane proteins in *Bacteroides fragilis* and reported the presence of a specific heme-uptake system [4, 5]. Little is known about the mechanisms of iron uptake that are operating in anaerobic bacteria, including *Bilophila wadsworthia*, the organism of interest in the study reported here. *B. wadsworthia* is an anaerobic, Gram-negative, bile resistant and strongly catalase-positive bacillus. This bacterium was first isolated from

patients with gangrenous and perforated appendicitis [6]. It has also been isolated in association with other infectious processes such as peritonitis, abscess, empyema, and bacteremia, as well as from normal fecal specimens [7, 8].

In a previous study we showed that the growth of *B. wadsworthia* was inhibited under conditions of iron restriction and that sulfate could be used as a source of iron. *B. wadsworthia* expressed two iron-regulated outer membrane proteins (IROMPs) of 190 kDa and 88 kDa in response to iron-limitation [9].

Since the environmental iron concentration has emerged as an important attribute in the expression of bacterial virulence, this study examined the effects of various classical iron-containing molecules most frequently associated with bacterium-host interactions (transferrin, lactoferrin, hemin, hemoglobin) and inorganic iron sources on the regulation of growth of *B. wadsworthia*. In addition, we determined the outer membrane protein composition of *B. wadsworthia* when grown under these different simulated *in vivo* conditions.



## Materials and methods

### *Bacterial strains and growth conditions*

*Bilophila wadsworthia* strain WAL 8144 used in this study was originally isolated from appendicitis specimens and was kindly provided by Dr. E.J. Baron (UCLA, U.S.A). The strain was identified with use of routine methods and procedures previously described [6]. After thawing, it was subcultured and incubated in 200 ml of growth medium at 37°C in an anaerobic atmosphere (H<sub>2</sub>: 5%, CO<sub>2</sub>: 5%, N<sub>2</sub>: 90%). The growth was followed by measuring the optical density (OD) at 480 nm at different time intervals. All experiments were performed in triplicate. The coefficients of variation (C.V.) in all experiments were equal to or less than 15 %. Viability of the cultures was assessed by serial dilutions and plating on agar plates followed by incubation as described above.

### *Media and chemicals*

All glassware was immersed overnight in 5% (v/v) RBS-25 (Traitements Chimiques de Surfaces, Frelinghien, France). The glassware was then rinsed six times in double distilled water, soaked overnight in 0.01% (w/v) EDTA and rinsed six times in double distilled water. Chemicals of the highest purity were purchased from Prolabo (Paris, France), except for amino-acids and vitamins (Sigma Chemicals, France). The iron-restricted medium used was that previously described, to which oxgall (2%) and pyruvate (10 mM) were added [10]. The medium compounds were defferated with Chelex-100 resins (Bio-Rad, France).

Medium without iron contained equal to or less than  $0.04 \mu\text{M Fe}^{3+}$ : this medium will be referred to as the iron-restricted medium (medium-Fe). Iron (as ferric or ferrous sulfate) was added at a final concentration of  $15 \mu\text{M}$  and  $100 \mu\text{M}$  in the iron-containing medium (medium+Fe). The iron concentrations were measured before and after treatment by atomic absorption spectrophotometry. The final pH was adjusted to 7.0 - 7.1. Increasing concentrations of bovine hemin (from  $16 \mu\text{M}$  to  $48 \mu\text{M}$ ; equivalent to  $8 \mu\text{M}$  to  $24 \mu\text{M}$  iron), human hemoglobin (from  $0.5 \mu\text{M}$  to  $9 \mu\text{M}$ ; equivalent to  $2 \mu\text{M}$  to  $36 \mu\text{M}$  iron), apotransferrin ( $3 \mu\text{M}$ ), human holotransferrin (from  $0.1 \mu\text{M}$  to  $13.5 \mu\text{M}$ ; equivalent to  $0.2 \mu\text{M}$  to  $24 \mu\text{M}$  iron) and human lactoferrin (90% iron-saturated; from  $0.1 \mu\text{M}$  to  $10 \mu\text{M}$ ; equivalent to  $0.2 \mu\text{M}$  to  $17.5 \mu\text{M}$  iron) (Sigma Chemicals, France) were solubilized in deionized water. All reagent solutions were filter sterilized.

#### *Outer membrane preparation*

Outer membrane fractions were prepared using a slight modification of the method described by Sprott *et al.* [11]. Cells were harvested by centrifugation ( $8,000 g$  for 20 min at  $4^\circ\text{C}$ ). Cells were washed three times in buffered saline then disrupted ultrasonically 30 times for 30 s at 50 Hz each in an ice bath. The protease inhibitors phenylmethyl-sulfonyl fluoride and N- $\alpha$ -p-tosyl-L-lysine-chloro-methyl-ketone were added to the cell suspension to obtain a final concentration of 2 mM. DNase I and RNase A were then added ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) followed by centrifugation at  $5,000 g$  for 20 min at  $4^\circ\text{C}$  to remove the unbroken cells. The supernatant was again centrifuged ( $45,000 g$ , 45 min,  $4^\circ\text{C}$ ) to pellet the envelope material. The pellet containing the cell envelope was treated with 2% Triton X-100 at room

temperature for one hour to solubilize the cytoplasmic membranes. After centrifugation at 100,000 g for 60 min at 4°C, the detergent insoluble fraction in the pellet was treated with lysozyme (1 mg ml<sup>-1</sup>) to digest cell-wall peptidoglycan. The remaining outer membrane proteins in this fraction were concentrated by centrifugation at 100,000 g for 60 min at 4°C. The resulting pellet containing the outer membrane proteins was washed once in buffered saline and centrifuged once again before storage at -30°C.

#### *Exposure of outer membrane proteins in whole cells to proteinase K*

Whole cells expressing the iron-repressible outer membrane proteins were suspended to A<sub>660</sub> of 1.0 in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 2% NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.5 mg ml<sup>-1</sup> proteinase K (15-22 units ml<sup>-1</sup>) and incubated at 37°C for 1 h. After centrifugation at 4°C, the treated cells were extensively washed with the above-mentioned buffer (without proteinase K) containing 1 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride, and then subjected to sonication to extract the outer membrane.

#### *SDS-PAGE and protein determination*

Each preparation (20-30 µg of total protein) was mixed with an equal volume of sample loading buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, containing 1% SDS, 2.5% 2-mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue, 30% glycerol). Proteins were separated on 11% SDS-PAGE gel slabs by the method of Laemmli [12]. After electrophoresis, gels were stained with

Coomassie Brilliant Blue R. The protein concentration was determined by the Lowry method [13].

*Quantitative determination of hemoglobin and transferrin*

The amount of transferrin was determined by an immunochemical quantitative determination [14] and hemoglobin by using spectrophotometry in derivative double dash [15].

## Results

### *Effects of heme compounds, transferrin, and lactoferrin on the growth of B. wadsworthia*

Growth studies were performed to determine whether *B. wadsworthia* was able to use either heme compounds, transferrin, or lactoferrin as an iron source. The growth of *B. wadsworthia* was clearly inhibited under iron-restricted conditions whereas hemin, hemoglobin, iron-saturated transferrin, and lactoferrin stimulated its growing when added to the medium-Fe (Fig. 1). Addition of graded concentrations of these iron-containing compounds increased the growth rate of *B. wadsworthia* up to maximum concentrations which were 40  $\mu\text{M}$  (equivalent to 20  $\mu\text{M}$  iron), 3  $\mu\text{M}$  (12  $\mu\text{M}$  iron), 8.5  $\mu\text{M}$  (15  $\mu\text{M}$  iron), and 5  $\mu\text{M}$  (9  $\mu\text{M}$  iron) for hemin, hemoglobin, transferrin, and lactoferrin, respectively. Compared to either transferrin, hemoglobin, or hemin, iron-saturated lactoferrin stimulated the growth less significantly when added to medium-Fe, and apotransferrin hardly stimulated the growth. With equivalent iron concentrations (15  $\mu\text{M}$ ), growth was better with transferrin and hemoglobin than with ferrous or ferric sulfate (data not shown). Hemin induced a long lag phase of *B. wadsworthia* grown in hemin-repleted medium and a short exponential phase ending at day 6. Growth kinetics with hemoglobin showed the absence of lag phase and the initiation of the exponential growth phase at an earlier stage than when hemin was used. Therefore, higher concentrations of hemin than that of hemoglobin were needed in the medium-Fe to obtain, more or less, similar growth kinetics. Comparable concentrations of heme molecules in the medium-Fe (*i.e.*, 3  $\mu\text{M}$  hemoglobin or 24  $\mu\text{M}$  hemin equivalent to 12  $\mu\text{M}$  heme) resulted in enhanced growth in the culture medium containing hemoglobin (data not shown).

These growth kinetic studies with holotransferrin showed a longer lag phase than with hemoglobin as well as the initiation of the exponential growth phase. However, the durations of the exponential growths were similar in medium-Fe supplemented with hemoglobin and transferrin.

Quite similar growth kinetics have been obtained with the addition of ferric sulfate or ferrous sulfate in the medium-Fe as shown on Fig. 2 with a slightly enhanced growth of the bacteria grown with ferrous sulfate rather than ferric sulfate.

#### *Quantitative determinations of transferrin and hemoglobin*

Quantitative determinations of transferrin and hemoglobin added to the medium-Fe were performed over 8 days under anaerobic conditions at 37°C to evaluate their stability with and without bacteria. When no bacteria was added to the medium, the amount of transferrin and hemoglobin in the medium-Fe at day 8 remained stable and almost equivalent to the concentrations at day 0 (Table 1). When bacteria were added, a degradation of transferrin (20 % to 23 %) and hemoglobin (84 % to 88 %) was measured in the culture medium at day 8 (C.V.  $\pm$  3.8 %) (Table 1). Moreover, in both experiments, the pH of the culture medium, determined over the time course, remained stable at 7.0-7.1 (data not shown). Thus, the growth stimulation of bacteria observed when transferrin or hemoglobin was added to the medium-Fe was due to these two compounds and not to their possible breakdown over the time course.

*Effects of inorganic iron on the outer membrane composition*

In a previous study, we found that the two IROMPs of 190 kDa and 88 kDa were completely repressed when 100  $\mu\text{M}$  of inorganic iron (ferric sulfate) was added to the medium-Fe [9]. In the present study, a graded series of iron concentrations were added to the medium-Fe to determine the critical inorganic iron concentration (as ferric sulfate) repressing the expression of the 190 kDa and 88 kDa IROMPs. The expression of these two proteins was observed when concentrations of 1, 2, 3, 4, 5, and 6  $\mu\text{M}$  of inorganic iron were added to the medium-Fe. At 7  $\mu\text{M}$  of ferric sulfate, these two proteins were completely coordinately repressed (Fig. 3).

Furthermore, an indication of the cell-surface exposure of these proteins was obtained by incubation of whole cells grown in the iron-restricted medium with proteinase K prior to the preparation of the outer membrane. The 190 kDa outer membrane protein was susceptible to proteolytic cleavage in whole cells, whereas the 88 kDa was not susceptible. The proteolytic digestion also resulted in the appearance of additional protein bands, mainly 38 kDa, 30 kDa and 24 kDa (Fig.4). This result indicated that the 190 kDa protein was surface-exposed and that the 88 kDa protein was anchored in the outer membrane and was not a subunit of the 190 kDa protein. (Fig. 4).

*Effects of host iron transport compounds on the outer membrane protein pattern*

Cells grown either in the medium-Fe or in the medium-Fe added with either hemin, hemoglobin, transferrin, or lactoferrin gave similar protein patterns (Fig. 5, lanes 1, 2, 3, 4,

5) expressing the two IROMPs of 190 kDa and 88 kDa. These data suggest that when either hemin, hemoglobin, transferrin, or lactoferrin, were the only iron source, the growth medium remained iron-restricted. Hemin, hemoglobin, transferrin or lactoferrin did not appear to induce synthesis of any additional proteins *in vitro*. Moreover, similar outer membrane protein profiles were obtained in the presence of ferrous or ferric sulfate (Fig 5, lanes 6, 7).



## Discussion

Little is known about the iron metabolism in *B. wadsworthia*, prompting our investigation. Thus, this paper is the first to report for this bacteria the effects of host iron-transport compounds such as hemin, hemoglobin, transferrin, or lactoferrin and inorganic iron sources (ferric sulfate and ferrous sulfate) on the growth of *B. wadsworthia* and on its outer membrane protein patterns.

*B. wadsworthia* could use hemin, hemoglobin, transferrin, and lactoferrin as a sole iron source. *B. wadsworthia* was also capable of growing in the presence of ferrous or ferric sulfate. Hemoglobin and transferrin appeared to be better iron sources than inorganic iron sources. These results suggest that *B. wadsworthia* was not capable of processing as efficiently inorganic forms of iron and favored organic iron sources such as transferrin and hemoglobin as previously observed for another anaerobic bacteria, *Porphyromonas gingivalis* [16]. Since *B. wadsworthia* is capable of utilizing a large number of host iron transport compounds, it may provide this host-associated species with a selective ecological advantage through circumvention of host iron-withholding defenses.

Hemin and hemoglobin could enhance growth of *B. wadsworthia* but heme compounds are normally not available for infecting microorganisms because of their localization. Therefore, pathogenic bacteria can utilize heme compounds only after it is made available by some forms of tissue damages [2]. There is a first evidence for the destruction of the hemoglobin molecule by *B. wadsworthia*, suggested by its degradation over the time course in the culture medium in the presence of bacteria. Usually, the release of iron from hemin or hemoglobin requires destruction of the porphyrin moiety [2]. *B. wadsworthia* seemed able to degrade hemoglobin using such a mechanism to obtain iron from the host.

Human transferrin is found mainly in blood while lactoferrin is derived from various secretions such as saliva, tears, nasal secretions and intestinal secretions [2]. The mechanisms by which *B. wadsworthia* sequesters iron from transferrin or lactoferrin is unknown. Under normal physiological conditions, bacteria might be expected to assimilate the iron bound to transferrin in four ways. One way is by the production of iron-chelating compounds, known as siderophores, that are able to remove iron from transferrin [1]. However, so far, there is no evidence for the production of such chelators by *B. wadsworthia* [9]. The second way is through proteolytic cleavage of transferrin which disrupts the iron-binding site and releases iron. There is a degradation of transferrin in the culture medium over the time course in the presence of bacteria. The third way involves the removal of iron from transferrin by a reductive pathway [17]. It is possible that these last two mechanisms for iron acquisition are operative in *B. wadsworthia in vivo*. The fourth mechanism is a direct interaction between transferrin and a transferrin receptor on the cell wall. Such mechanisms have been described for pathogenic bacteria like *Neisseria* species and *Haemophilus influenzae* [18].

Similar growth kinetics and outer membrane protein patterns have been obtained with the addition of ferrous or ferric sulfate in the iron-restricted medium. These data suggest that *B. wadsworthia* was capable of transporting exclusively ferrous iron and that reduction of ferric iron prior to its transport across the outer membrane seemed obligatory. Either the anaerobic atmosphere reduced the ferric iron or *B. wadsworthia* is believed to reduce ferric iron before transporting it via a ferric reductase activity as already described in *Streptococcus mutans* by Evans et al. [19].

These iron uptake mechanisms from host iron-transport compounds are not uncommon. Such mechanisms have been described for other pathogenic bacteria like *Haemophilus*

*influenzae* and pathogenic *Neisseria* species which allow these pathogens to utilize host iron complexes such as transferrin, lactoferrin, and hemoglobin for growth [18]. Receptors for human transferrin and human lactoferrin have been identified in both *N. meningitidis* and *N. gonorrhoeae* [20, 21]. The transferrin and lactoferrin uptake are mediated by distinct receptor complexes, each consisting of two proteins. These proteins are expressed on the surface of these bacteria in response to iron limitation, and it is believed that these lactoferrin and transferrin receptors are essential for survival of these pathogens during *in vivo* infection [22]. Furthermore, the *N. meningitidis* *hpuAB* haemoglobin-haptoglobin utilization operon has been recently characterized [23]. The structure of this operon suggests that the complex HpuA-HpuB is a two-compound receptor analogous to the bipartite transferrin receptor.

The present study shows that *B. wadsworthia* can obtain the necessary iron for growth *in vitro* from either the human carrier proteins (transferrin and lactoferrin), or heme compounds (hemin, hemoglobin) associated with the expression of two high molecular weight IROMPs of 190 kDa and 88 kDa. The critical inorganic iron concentration repressing their expression was 7  $\mu\text{M}$  which was relatively higher than the critical inorganic iron concentrations for enteric bacteria (1  $\mu\text{M}$ ) [24], *Staphylococcus aureus* (0.04  $\mu\text{M}$ ) [25], and *Bacteroidaceae* (0.62  $\mu\text{M}$ ) [5] but lower than that for *Pseudomonas aeruginosa* which is 20 mM [26]. Under iron-supplemented conditions (addition of ferric sulfate or ferrous sulfate), the IROMPs of 190 kDa and 88 kDa were not detected, suggesting that these proteins were iron-repressible and could be important in mechanisms which allow *B. wadsworthia* to uptake and utilize iron. These results suggest that these new proteins may serve as specific receptors for iron acquisition. More extensive studies are warranted to determine the role of these iron-repressible proteins in the pathogenesis of

*B. wadsworthia* infections. Our previous results reported that anti-*B. wadsworthia* antiserum reacted with the 190 kDa protein but did not recognize the 88 kDa in outer membrane protein preparations [9]. Therefore, to further study the iron uptake and the pathogenic process of *B. wadsworthia* in human infections, the 190 kDa protein was purified. Cloning and sequencing of the gene coding for the 190 kDa IROMP are in progress.

*Acknowledgments*

This work was supported by the Conseil Régional Nord-Pas-de-Calais, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, and Direction de la Recherche et des Etudes Doctorales. We are grateful to Kristien Mortelmans, Stanford Research Institute, California, U.S.A., for critical review of the manuscript. We are most grateful to Bernadette Hennache for the quantitative determination of transferrin, to Annie Martin for the quantitative determination of hemoglobin in the culture medium, and to Claude Vandepierre for photography.

**References**

1. Wooldridge K.G. and Williams P.H. (1993) Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **12**: 325-348
2. Otto B.R., Verweij-van Vught A.M.J.J. and MacLaren D.M. (1992) Transferrins and heme compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Crit Rev Microbiol* **18**: 217-233
3. Duerden B.I. (1994) Virulence factors in anaerobes. *Clin Infect Dis* **18**: S253-S259
4. Otto B.R., Verweij-van Vught A.M.J.J., Van Doorn J. and MacLaren D.M. (1988) Outer membrane proteins of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides vulgatus* in relation to iron uptake and virulence. *Microb Pathog* **4**: 279-287
5. Otto B.R., Sparrius M., Verweij-van Vught A.M.J.J., van Doorn J. and MacLaren, D.M. (1990) Iron-regulated outer membrane protein of *Bacteroides fragilis* involved in heme uptake. *Infect Immun* **58**: 3954-3958
6. Baron E.J., Summanen P., Downes J., Roberts M.C., Wexler H.M. and Finegold S.M. (1989) *Bilophila wadsworthia*, gen. nov. and sp. nov., a unique gram-negative anaerobic rod recovered from appendicitis specimens and human faeces. *J Gen Microbiol* **135**: 3405-3411
7. Kasten M.J., Rosenblatt J.E. and Gustafson D.R. (1992) *Bilophila wadsworthia* bacteremia in two patients with hepatic abscesses. *J Clin Microbiol* **30**: 2502-2503
8. Arseze A., Mercuri F., Trevisan R., Menozzi M.G. and Botta G.A. (1997) Recovery of *Bilophila wadsworthia* from clinical specimens in Italy. *Anaerobe* **3**: 219-224
9. Daniel C., Baron E.J. and Courcol R.J. (1995) Effect of iron depletion on protein profiles of *Bilophila wadsworthia*. *Clin Infect Dis* **20**: S158-S159

10. Courcol R.J., Lambert P.A., Fournier P., Martin G.R. and Brown M.R.W. (1991) Effects of iron depletion and sub-inhibitory concentrations of antibiotics on siderophore production by *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **28**: 663-668
11. Sprott G.D., Koval S.F. and Schnaitman, C.A. (1994) Cell fractionation. In: Methods for general and molecular bacteriology (Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A. and Krieg, N.R., Eds.), pp. 72-103. Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C
12. Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Forr A.L. and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275
14. Whicher J.T. (1994) New international reference preparation for proteins in human serum (RPPHS). *Clin Chem* **40**:934
15. Taulier A., Levillain P. and Lemmonier A. (1986) Value of spectrophotometry for the determination of plasma and urinary hemoglobin. Comparison with the method using Allen's correction. *Ann Biol Clin* **44**: 367-373
16. Bramanti T.E. and Holt S.C. (1991) Roles of porphyrins and host iron transport proteins in regulation of growth of *Porphyromonas gingivalis* W50. *J Bacteriol* **173**: 7330-7339
17. Johnson W., Varner L., and Poch M. (1991) Acquisition of iron by *Legionella pneumophila* : role of iron reductase. *Infect Immun* **59** : 2376-2381
18. Gray-Owen S.D. and Schryvers A.B. (1996) Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol* **4** : 185-190
19. Evans S.L., Arceneaux J.E.L., Byers B.R., Martin M.E. and Aranha H. (1986) Ferrous iron transport in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **168**: 1096-1099

20. Legrain M., Mazarin V., Irwin S.W., Bouchon B., Quentin-Millet M.J., Jacobs, E. and Schryvers A.B. (1993) Cloning and characterization of *Neisseria meningitidis* genes encoding the transferrin-binding proteins Tbp1 and Tbp2. *Gene* **130**: 73-80
21. Schryvers A.B. and Morris L.J. (1989) Comparative analysis of the transferrin and lactoferrin binding proteins in the family of *Neisseriaceae*. *Can J Microbiol* **35**: 409-415
22. Banerjee-Bhatnagar N. and Frasch C.E. (1990) Expression of *Neisseria meningitidis* iron regulated proteins, including a 70-kilodalton transferrin receptor, and their potential for use as vaccines. *Infect Immun* **58**: 2975-2881
23. Lewis L.A., Gray E., Wang Y.P., Roe B.A. and Dyer D.W. (1997) Molecular characterization of *hpuAB*, the haemoglobin-haptoglobin-utilization operon of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **23**: 737-749
24. Payne S.M. (1988) Iron and virulence in the family of the Enterobacteriaceae. *Crit Rev Microbiol* **16**: 81-111
25. Courcol R.J., Trivier D., Bissinger M.C., Martin G.R. and Brown R.W. (1997) Siderophore production by *Staphylococcus aureus* and identification of iron-regulated proteins. *Infect Immun* **65**: 1944-1948
26. Kadurugamuwa J.L., Anwar H., Brown M.R., Shand G.H. and Ward K.H. (1987) Media for study of growth kinetics and envelope properties of iron-deprived bacteria. *J Clin Microbiol* **25**: 849-855



### Legends for figures

**Table 1.** Dosage of transferrin and hemoglobin in the culture medium over 8 days under anaerobic conditions with and without bacteria.

**Fig. 1.** Growth of *B. wadsworthia* WAL 8144 in the presence of hemoglobin, hemin, transferrin, or lactoferrin. Cells were grown with : iron-restricted medium ( $\leq 0.04 \mu\text{M}$  iron ; ■) ; 3  $\mu\text{M}$  of hemoglobin (◆) ; 8.5  $\mu\text{M}$  of transferrin (○) ; 40  $\mu\text{M}$  hemin (●) ; 5  $\mu\text{M}$  lactoferrin (\*).

**Fig. 2.** Growth of *B. wadsworthia* WAL 8144 in the presence of inorganic iron. Cells were grown with : iron-restricted medium ( $\leq 0.04 \mu\text{M}$  iron ; ■) ; 15  $\mu\text{M}$  ferric sulfate (▲) ; 15  $\mu\text{M}$  ferrous sulfate (●).

**Fig. 3.** SDS-PAGE of the OMPs of *B. wadsworthia* WAL 8144 collected at day 6 and grown with ferric iron: iron-restricted medium ( $\leq 0.04 \mu\text{M}$  ; lane 1) ; 4  $\mu\text{M}$  (lane 2) ; 5  $\mu\text{M}$  (lane 3) ; 6  $\mu\text{M}$  (lane 4) ; 7  $\mu\text{M}$  (lane 5) ; molecular weight markers (kDa) (lane 6). Arrowheads indicate proteins with molecular masses of 190 and 88 kDa.

**Fig. 4.** Susceptibility of the iron-repressible outer membrane proteins of *B. wadsworthia* to proteinase K. Lane 1 : OMPs of cells grown under iron-repleted conditions (100  $\mu\text{M}$  ferric sulfate) ; lane 2 : OMPs obtained from cells grown under iron-restricted conditions ( $\leq 0.04 \mu\text{M}$  iron) and incubated at 37°C for 1h without (lane 2) and with (lane 3) proteinase K prior to the preparation of the OMPs ; lane 4: molecular weight markers (kDa). Arrowheads indicate the iron-regulated proteins of 190 kDa and 88 kDa.

**Fig. 5 :** SDS-PAGE of the OMPs of *B. wadsworthia* WAL 8144 collected at day 6 and grown under iron-restricted conditions and with iron-containing molecules:  $\leq 0.04 \mu\text{M}$  iron (lane 1) ; 40  $\mu\text{M}$  hemin (lane 2) ; 3  $\mu\text{M}$  hemoglobin (lane 3) ; 8.5  $\mu\text{M}$  transferrin (lane 4) ; 5  $\mu\text{M}$  lactoferrin (lane 5) ; 15  $\mu\text{M}$  ferrous iron (lane 6) ; 15  $\mu\text{M}$  ferric iron (lane 7) ;

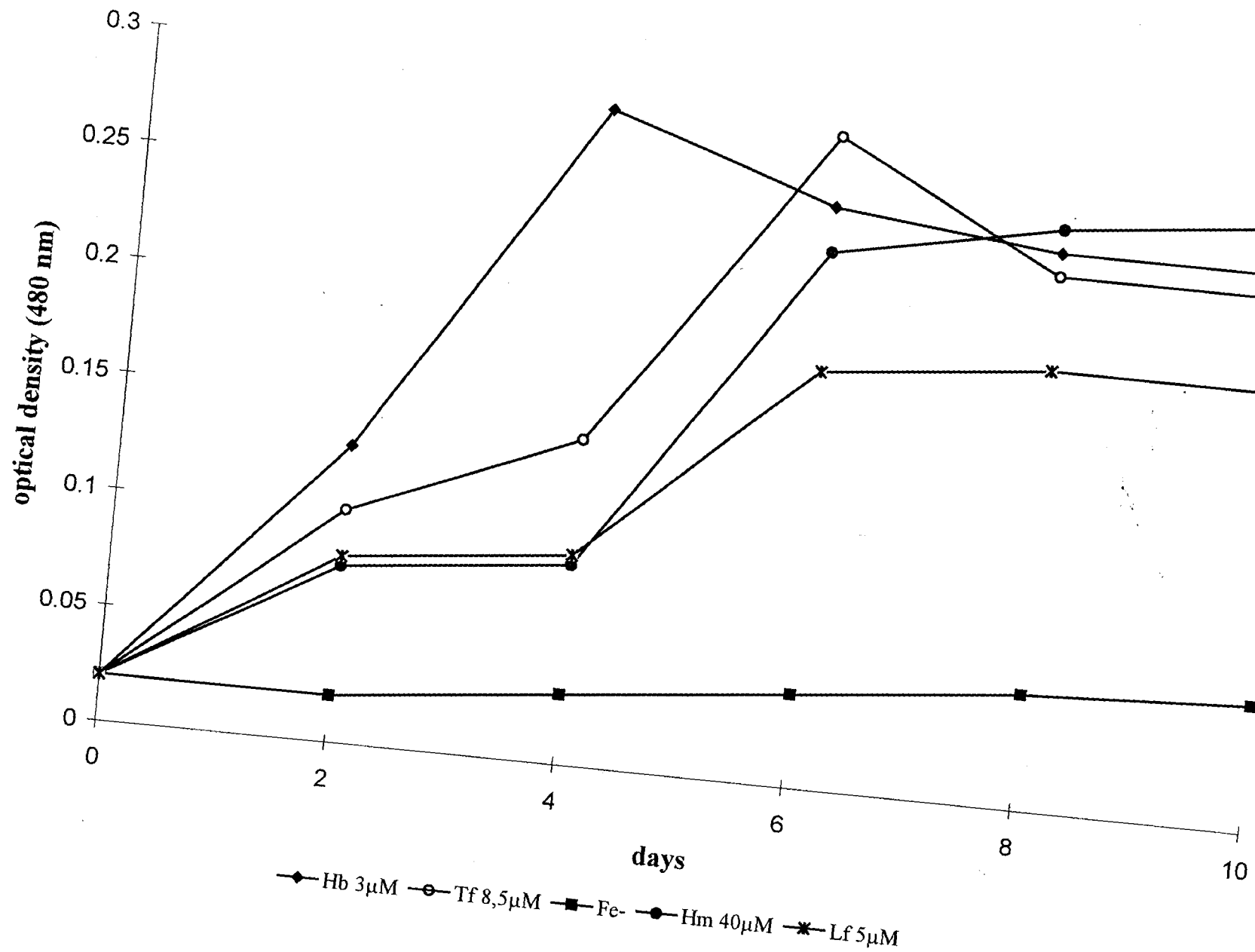
molecular weight markers (kDa) (lane 8). Arrowheads indicate proteins with molecular masses of 190 kDa and 88 kDa.

**Table 1**

	<b>Tf 1</b> -	<b>Tf 1</b> +	<b>Tf 2</b> -	<b>Tf 2</b> +	<b>Hb 1</b> -	<b>Hb 1</b> +	<b>Hb 2</b> -	<b>Hb 2</b> +
<b>day 0</b>	1.5 µM	1.5 µM	3.5 µM	3.5 µM	3 µM	3 µM	1 µM	1 µM
<b>day 2</b>	1.5 µM	1.3 µM	3.5 µM	3.1 µM	3 µM	1.5 µM	1 µM	0.5 µM
<b>day 4</b>	1.5 µM	1.2 µM	3.5 µM	2.9 µM	3 µM	0.8 µM	1 µM	0.3 µM
<b>day 6</b>	1.5 µM	1.2 µM	3.5 µM	2.8 µM	3 µM	0.7 µM	1 µM	0.2 µM
<b>day 8</b>	1.5 µM	1.2 µM	3.5 µM	2.7µM	3 µM	0.5 µM	1 µM	0.12 µM
<b>% degradation</b>	0%	20%	0%	23%	0%	84%	0%	88%

Two different concentrations of transferrin (Tf 1 and Tf 2), two different concentrations of hemoglobin (Hb 1 and Hb 2) have been used in the presence (+) or absence (-) of bacteria

Figure 1



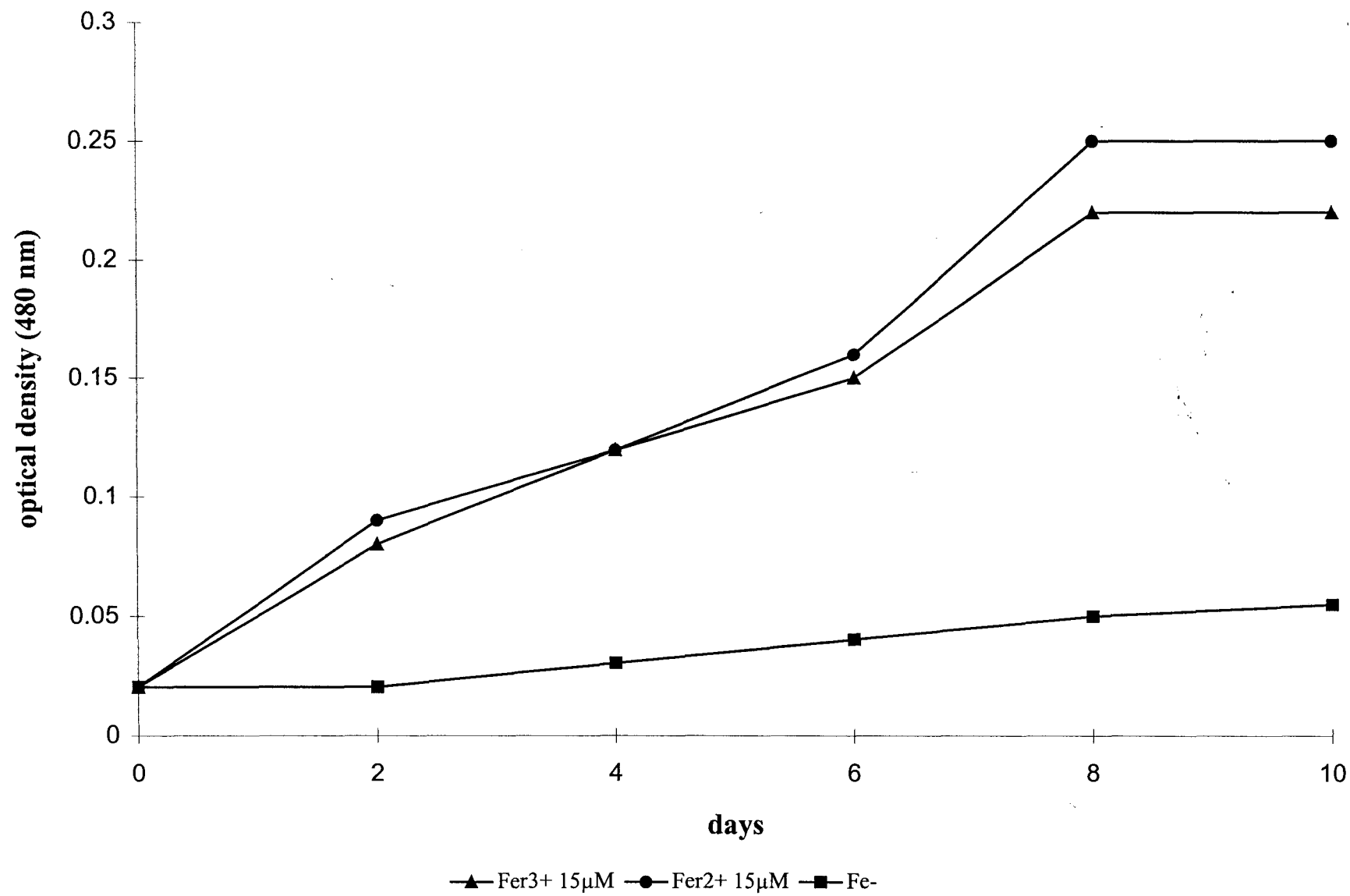


Figure 3

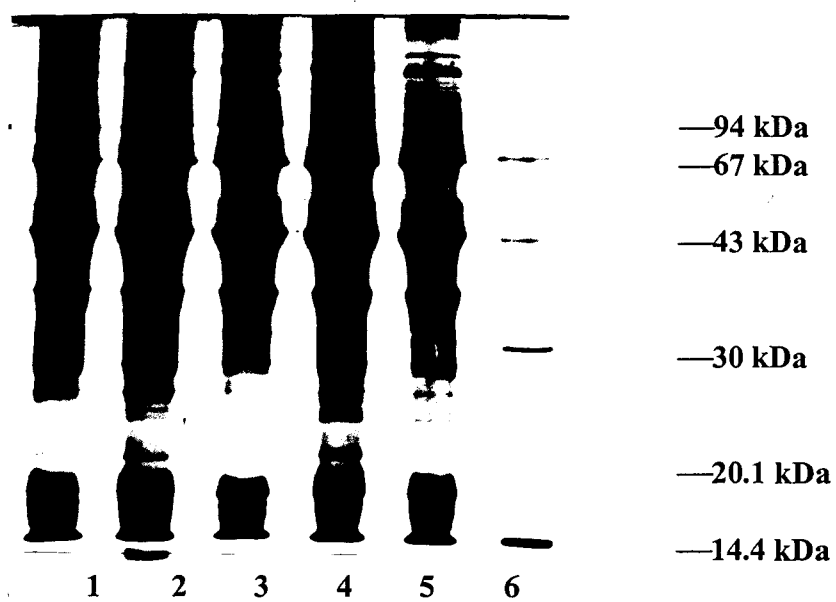


Figure 4

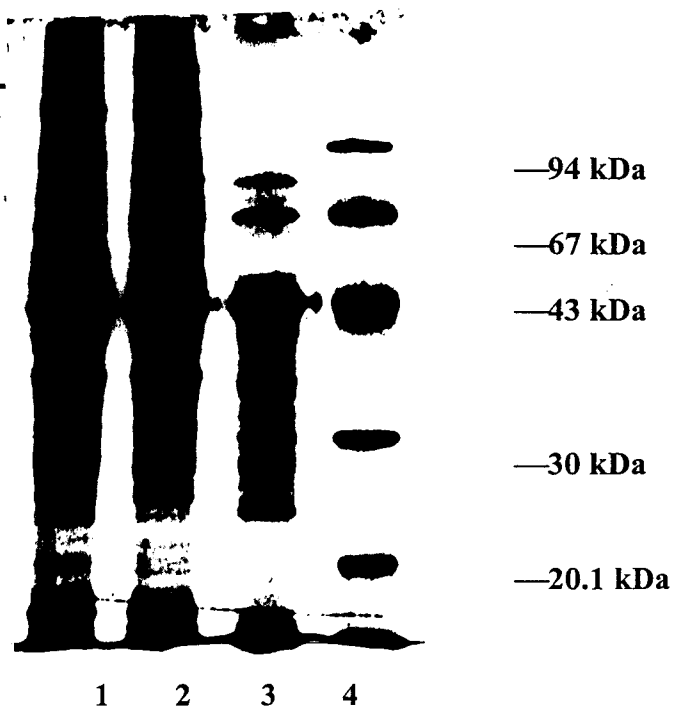
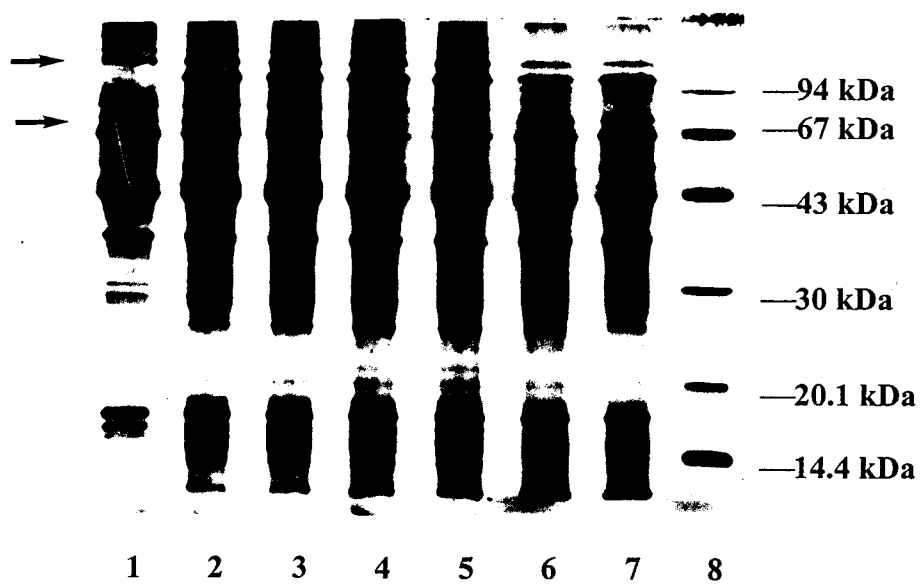


Figure 5





### 1.2.3. Résumé

*B. wadsworthia* est capable d'utiliser comme seule source de fer des sources organiques comme l'hémine, l'hémoglobine, la transferrine et la lactoferrine et des sources inorganiques comme le sulfate ferrique et le sulfate ferreux. L'hémoglobine et la transferrine stimulent plus fortement la croissance de *B. wadsworthia* que les sources de fer inorganiques. Ces résultats suggèrent que la bactérie n'assimile pas aussi efficacement les sources inorganiques et favorise donc les sources organiques comme l'hémoglobine et la transferrine.

Les mécanismes de captation du fer développés par *B. wadsworthia* à partir de l'hémoglobine et de la transferrine sont encore inconnus. En présence de *B. wadsworthia*, les molécules de transferrine et d'hémoglobine sont dégradées dans le milieu de culture au cours du temps. La dégradation de ces molécules *in vivo* pourrait permettre à la bactérie de se procurer du fer.

Les cinétiques de croissance et les profils protéiques de la membrane externe de la bactérie obtenus avec l'addition de sulfate ferreux ou ferrique en milieu carencé en fer sont similaires. Ces résultats suggèrent que *B. wadsworthia* transporte exclusivement du fer ferreux et qu'une réduction du fer ferrique semble être obligatoire avant de le transporter à travers la membrane externe.

Les protéines majeures de la membrane externe de *B. wadsworthia* de 190 kDa et 88 kDa exprimées exclusivement en milieu carencé en fer (article 1) sont toujours exprimées en présence d'hémine, de transferrine, d'hémoglobine ou de lactoferrine. Leur expression est totalement réprimée par une concentration minimale de 7  $\mu$ M de sulfate ferrique. Seule la protéine de 190 kDa est située à la surface de la bactérie ce qui est en accord avec nos précédents résultats obtenus avec un antisérum anti-*B. wadsworthia* qui ne réagissait qu'avec la protéine de 190 kDa (article 1). La protéine de 88 kDa est ancrée dans la

membrane externe. Ces deux protéines sont susceptibles de jouer un rôle important dans les mécanismes de captation du fer développés par *B. wadsworthia*.

## 2. ADAPTATION DE *A. BAUMANNII* EN CONDITIONS DE CARENCE EN FER: CLONAGE ET SEQUENÇAGE DU GENE *FUR* HOMOLOGUE

### 2.1. Présentation du travail

Peu d'études ont montré que *A. baumannii* était capable de pousser et de synthétiser des sidérophores dans des conditions de carence en fer (Smith *et al.*, 1990; Actis *et al.*, 1993; Yamamoto *et al.*, 1994). Récemment, un système de haute affinité impliquant des sidérophores a été décrit chez une souche clinique de *A. baumannii* (Echenique *et al.*, 1992). L'expression de ce type de système de captation du fer par un sidérophore représente un bénéfice pour la bactérie en lui permettant de rentrer en compétition avec les glycoprotéines de l'hôte pour le fer et pourrait représenter un facteur nuisible pour l'hôte car de tels systèmes se sont révélés être des facteurs de virulence (Litwin et Calderwood, 1993a).

Les gènes impliqués dans les mécanismes de captation du fer chez de nombreuses bactéries aérobies comme *E. coli* sont régulés par la protéine Fur. L'expression de ces gènes est induite quand la bactérie se retrouve dans un environnement carencé en fer (Litwin et Calderwood, 1993a). Les gènes impliqués dans les mécanismes de captation du fer par l'intermédiaire des sidérophores chez *A. baumannii* sont actuellement inconnus.

Dans la première partie du travail rapporté dans l'article " **Characterization of the *Acinetobacter baumannii* Fur regulator: cloning and sequencing of the *fur* homolog gene**", nous avons étudié les cinétiques de croissance, de production de sidérophores et de l'expression des protéines de la membrane externe et des protéines cytoplasmiques de *A. baumannii* BM2580 en milieu chimiquement défini carencé ou supplémenté en fer sur une période de 60 heures de culture.

Dans la deuxième partie de nos travaux, nous avons décrit pour la première fois l'existence d'un gène *fur* chez une souche d'*Acinetobacter*. Nous décrivons le clonage, l'analyse de la séquence du gène *fur* de *A. baumannii* et de ses régions flanquantes. Des analyses de séquence ont montré que la protéine Fur de *A. baumannii* ainsi que les autres protéines Fur disponibles dans la GenBank<sup>TM</sup>/EBI Data Bank possèdent trois motifs très conservés potentiellement requis pour la fonction de Fur, fixation à l'ADN et fixation au fer.

**2.2. Article: Characterization of the *Acinetobacter baumannii* Fur regulator: cloning and sequencing of the *fur* homolog gene**

CATHERINE DANIEL\*, STEPHANIE HAENTJENS, MARIE-CHRISTINE BISSINGER and RENÉ J. COURCOL

Bacteriology Laboratory, A. Calmette Hospital, Centre Hospitalier Régional et Universitaire, 59037 Lille cédex, France.

**Running title:** ACINETOBACTER BAUMANNII *fur* GENE

**\* Author's address for correspondence:**

Catherine Daniel

Bacteriology Laboratory

A. Calmette Hospital

Centre Hospitalier Régional et Universitaire

59037 - Lille cédex

France

Telephone number: (33).3.20.44.54.80.

Fax number: (33).3.20.44.48.95.

**ABSTRACT**

Growth kinetics, siderophore activity and iron-regulated bacterial proteins of *Acinetobacter baumannii* BM2580 were studied in iron-restricted and iron-supplemented chemically-defined media. Iron-regulated outer membrane proteins of 75 kDa and 80 kDa were expressed under iron restriction conditions whereas several cytoplasmic proteins were iron-induced or iron-repressed. Cloning and sequencing of the complete iron-uptake regulatory (*fur*) gene from *A. baumannii* BM2580 is reported for the first time. This gene is preceded by a single autoregulated promoter whose -10 region overlaps the Fur binding site. The open-reading frame identified encodes a polypeptide consisting of 145 aminoacids. The *fur* gene is followed by a divergent open-reading frame-coding for the C-terminus of a putative PilU protein. Sequence analysis indicates that the Fur protein of *A. baumannii* was 63% identical to the *E. coli* Fur protein. These results show that the *fur* gene is conserved within clinical strains of *A. baumannii*.

## INTRODUCTION

*Acinetobacter baumannii*, formerly known as *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus*, belongs to a bacterial species that is widely distributed throughout the environment. This microorganism can be isolated from the skin and respiratory tract of healthy ambulatory adults as well as from hospital personnel and equipment (31). Lately, numerous outbreaks of nosocomial infections caused by *A. baumannii* have been reported, which are of particular concern because of the widespread and increasing antibiotic resistance of the isolated strains (5, 15). Most infections occurred in patients compromised by either antibiotic therapy, respiratory instrumentation and manipulations, dialysis, or surgery (5).

*Acinetobacter* species are able to survive under restricted nutrient conditions, such as those imposed by the host. Iron is one of the essential bacterial nutrients that is tightly controlled by the host, through its chelation by the high-affinity binding glycoproteins, transferrin and lactoferrin. Thus, bacteria have developed efficient iron-uptake mechanisms that allow them to scavenge iron from these host proteins, either by direct interaction with the host proteins, by direct interaction with the iron protein complexes, or by the synthesis and secretion of high-affinity extracellular siderophore compounds (33). Only very few reports have shown the ability of clinical isolates of *A. baumannii* to grow and produce siderophore compounds under iron-deficient conditions (2, 27, 34). Recently, a high-affinity siderophore-mediated system has been described in a clinical strain of *A. baumannii* (10). The expression of this type of iron uptake system, involving the secretion of a soluble siderophore, represents a benefit for the invading bacterium by allowing it to compete with host binding proteins for essential iron and may also represent a detrimental factor for the host since such systems were demonstrated to be important virulence factors in the establishment of bacterial infections (33). The genes involved in iron uptake in several aerobic bacteria such as *Escherichia coli* are coordinately regulated by the ferric uptake regulator protein, Fur. The Fur repressor protein functions as a dimer with ferrous iron as a corepressor to bind the operator regions of genes under Fur control. Most of the genes in the Fur regulon are repressed by Fur and thus are induced when the bacterium enters a low iron environment such as a mammalian host (22).

In the present work, we cloned and sequenced the *A. baumannii fur* gene. The Fur protein was highly related (>60 %) to other Fur proteins. By sequencing the *fur* flanking regions, *pilU* related sequence was identified which suggests the presence of a type IV pilus in *A. baumannii*. This paper is also the first to report a kinetic study on siderophore production, bacterial growth, and iron-regulated proteins for this bacteria. This study is a contribution to a better understanding of the mechanisms involved in the pathogenicity of *A. baumannii*.



## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strain, plasmids, medium and growth conditions.** *A. baumannii* BM2580 was used in this study (17). Bacteria were grown at 37°C in 500 ml shake flask cultures in an orbital shaker (172 rpm). Chemically-defined media containing  $\leq 0.04 \mu\text{M}$  Fe (CDM-Fe) or  $100 \mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  (CDM+Fe) were used as previously described (8). Growth was monitored both spectrophotometrically ( $A_{600}$ ) and by colony counts, using a pour-plate procedure. All experiments were performed in duplicate. Bacterial cells were harvested at various stages of growth. The plasmid pMosBlue (Amersham) was the T/A cloning vector used for PCR product cloning whereas the plasmid pBluescript KS(+) (Stratagene) was used for DNA cloning.

**Siderophore detection.** Siderophore activity in culture supernatants was detected with the chrome azurol assay (CAS) prepared as described by Schwyn and Neilands (26). Results were expressed as equivalents of Desferrioxamine activity ( $\mu\text{M}$ ), with reference to a standard curve as previously described (8).

**Outer membrane preparation.** Outer-membrane proteins (OMPs) were prepared by a slight modification of the method reported by Sprott *et al* (29). Bacteria harvested by centrifugation (8,000g, 20 min, 4°C) were disrupted ultrasonically. Unbroken cells were discarded by centrifugation. The supernatant was separated into cytoplasmic and membrane fractions by further centrifugation (45,000g, 45 min, 4°C). The pellet containing the cell envelope was treated with 2% Triton X-100 (Sigma Chemical Co.) to solubilize the cytoplasmic membranes. The detergent-insoluble fraction in the pellet was treated with lysozyme ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) to digest cell-wall peptidoglycan. The remaining OMPs in this fraction were concentrated by further centrifugation. The resulting pellet contained the OMPs.

**SDS-PAGE and Western blot analysis.** Electrophoresis was performed under denaturing conditions. Proteins were separated either on 8 % or 11 % sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel slabs. Gels were fixed and stained with Coomassie Blue or were transferred by electroblotting onto nitrocellulose membrane (Amersham). After transfer, membranes were blocked with 5% skim milk - 0.3 % Tween-20, then probed with rabbit polyclonal anti-*E. coli* Fur serum (23), diluted 1:500 for 1 h. Proteins were detected

using anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugate (Bio-Rad Laboratories) diluted 1:3000. Reactive bands were visualized with 3-3' diaminobenzidine (Sigma Chemical Co.)

**DNA manipulations.** Genomic DNA was purified with the Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega) and digested with various restriction endonucleases: *Cla*I, *Hind*III, *Sma*I, *Xba*I, *Bst*XI, and *Eco*RI as instructed by the manufacturer (Boehringer Mannheim). Plasmid DNA was purified with spin columns (Qiagen).

The PCR products were separated by electrophoresis using 1% agarose gel. Parts of the gel, stained with ethidium bromide and containing bands of interest, were excised. The DNA was purified using the QIAEXII resin and ligated into the plasmid T/A cloning vector. Transformed cells were cultured on LB-agar supplemented with ampicillin, IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) and X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside).

**Cloning strategy, sequencing and analysis of *fur* homolog.** Amino acid sequences of Fur proteins of *Escherichia coli* (X02589), *Yersinia pestis* (Z12101), *Vibrio anguillarum* (L19717), *V. vulnificus* (L06428), *V. cholerae* (M85154), *Pseudomonas aeruginosa* (L00604), and *Legionella pneumophila* (U06072) were aligned. The following consensus sequences were deduced (Fig. 8) : sequence 1 : AGLK(V/I)TLPR where the A residue is positioned as A-11 in the *E. coli* Fur protein ; sequence 2 : HDH(L/M)(I/V)C(L/V)(D/K)CG where the first H residue is positioned as H-88 in the *E. coli* Fur protein.

Oligonucleotide primers (OligoExpress) used in this study are described in Table 1. We designed the 32-fold sense degenerate oligonucleotide primer FUR3 based on the first amino acid consensus sequence and the 1152-fold antisense degenerate oligonucleotide primer FUR5 based on the second amino acid consensus sequence (Table 1). The DNA template was mixed with 15 pmoles of each primer, 2 units of *Taq* DNA polymerase, 0.3 mM dNTP, and 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> in a final volume of 50  $\mu$ l, with the buffer recommended by the manufacturer (Boehringer Mannheim). PCR parameters were 94°C for 4 min followed by thirty-five cycles at 94°C for 4 min., followed by 35 cycles at 94°C for 20 s, at 57°C for 40 s, at 47°C for 30 s, at 37°C for 20 s, and at 72°C for 2 min., followed by a final extension at 72°C for 20 min.

*A. baumannii fur* gene probe FUR6-FUR7 was prepared by PCR amplification of *A. baumannii* BM2580 using the internal primers to the putative *fur* gene FUR6 and FUR7

(Table 1, Figure 4) resulting in a single band of the expected size (178-bp, data not shown). PCRs were performed at 94°C for 4 min, followed by 35 cycles at 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 1 min, followed by a final extension at 72°C for 20 min. The PCR product was labeled by random-primed incorporation of digoxigenin-labeled dUTP with the DNA labeling kit from Boehringer Mannheim.

Total genomic DNA (3 µg) from *A. baumannii* BM2580 was digested with various restriction enzymes and electrophoresed on 1% agarose gel prior to transfer to nylon membranes (Amersham) by capillary blotting overnight. Hybridization to the blot was performed at 42°C in DIG Easy Hyb (Boehringer Mannheim). Filters were washed in 0.1x SSC (0.15 M NaCl; 15 mM sodium citrate, pH 7.0); 0.1% SDS. Hybrids were detected by an enzyme-linked immunoassay with an antibody conjugate (anti-digoxigenin alkaline phosphatase conjugate) and the chemiluminescent substrate CSPD (Disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3-2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1]decan}-4-yl)phenyl phosphate; Boehringer Mannheim). For the detection of the chemiluminescent signal, the membranes were exposed to a Hyperfilm ECL (Amersham).

To construct a *Hind*III-*Cla*I minilibrary, genomic DNA from *A. baumannii* BM2580 was digested with *Hind*III and *Cla*I and was size-fractionated (1600-bp to 1750-bp). DNA bands of appropriate size were extracted from the gel with the QIAEXII resin (Qiagen) and ligated into the plasmid pBluescript KS(+) vector using the restriction enzymes *Hind*III and *Cla*I. The ligated DNA was used as template for PCR amplification of the *fur* gene of *A. baumannii* with two primer sets hybridizing to the vector pBluescript KS(+) and to the *fur* gene of *A. baumannii*, respectively. PCR parameters were 94°C for 4 min, followed by 35 cycles at 94°C for 1 min, 57°C for 1 min, and 72°C for 1 min, followed by a final extension at 72°C for 20 min.

Nucleotide sequence of both strands of plasmid DNA, both the T/A cloning vector pMosBlue and the pBluescript KS(+) vector, were determined by the dideoxy method using the ABI Prism™ Ready Reaction AmpliTaq® FS, DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) and an automated DNA sequencer (model ABI 373A, Applied Biosystems). Analysis of nucleotide sequences was performed using the Sequence Navigator computer program.

**Nucleotide sequence accession number.** The GenBank™/EBI Data Bank accession number for the nucleotide and amino acid sequence of Fur is Y14980.

## RESULTS

**Effect of iron-depletion on growth, siderophore activity, and protein composition.** Expression of proteins under iron restriction was investigated in *A. baumannii* strain. In a preliminary step, bacterial growth was studied. As shown on Fig. 1, *A. baumannii* BM2580 cells grew properly under iron-restricted conditions. Iron-restriction did not show any initial delay in the growth of the strain compared to the cells grown under iron-supplemented conditions. Growth kinetics of *A. baumannii* BM2580 were almost identical in both media until 18 h of growth. However, after 18 h of growing, cell lysis was observed in CDM-Fe followed by a steady-state at 24 h resulting in a final reduced growth yield compared to the bacteria cultured in CDM+Fe (Fig. 1).

Siderophore activity was investigated at each sampling time. No siderophore activity was detected in CDM+Fe (data not shown) indicating that the siderophore production was tightly regulated by the availability of iron in the growth medium. By using CAS for detection, siderophore production reached a maximum after 24 h of incubation, during the stationary phase. During that phase, siderophore production increased steadily reaching a maximum at 24 h and decreased slightly afterwards (Fig. 1).

Kinetics of the outer membrane proteins of *A. baumannii* collected at different times was performed to detect differences between bacterial cells cultured in iron-restricted vs. iron-supplemented medium. Bacteria growing in CDM-Fe expressed several new outer membrane proteins distributed in the range 70 - 80 kDa from 6 h of culture onwards as it is shown on Fig. 2 (lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14). These proteins were completely iron-repressed. Two prominent proteins of 80 kDa and 75 kDa were more strongly expressed in the outer membrane of *A. baumannii* cultured in CDM-Fe and were expressed after only 6 h of culture (lane 2). These two proteins of 80 kDa and 75 kDa were produced more abundantly after 12 h of culture, during the stationary phase (lanes 6, 8, 10, 12, 14). The expression of these proteins appeared and increased simultaneously with the siderophore synthesis (Fig. 2). In CDM+Fe, proteins appeared either during the log phase (19.5 kDa, 84 kDa) or the stationary phase (22 kDa, 24 kDa) (Fig. 2; lanes 5, 7, 9, 11, 13). Expression of these four proteins was time-dependent and iron-inducible. In each respective medium, the protein profiles obtained at 48 h and 60 h were identical to those obtained at 36 h (data not shown).

Kinetics of the cytoplasmic proteins of *A. baumannii* collected at different times was performed to detect differences between bacterial cells cultured in iron-restricted vs. iron-supplemented medium. Two proteins were characterized in the cytoplasm of bacteria growing in CDM-Fe : 24.5 kDa and 68 kDa (Fig. 3 ; lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14). These two proteins were completely repressed by iron. Five other proteins were expressed by bacteria growing in CDM+Fe : 25 kDa, 62 kDa, 72 kDa, 83 kDa, and 87 kDa (Fig. 3, lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13). These five proteins expressed in CDM+Fe were completely repressed in CDM-Fe and were induced by iron. Expression of all cytoplasmic proteins was time-dependent.

**Cloning of the *A. baumannii fur* homolog.** Two degenerate primers FUR3 and FUR5 were designed. From the alignment of the *E. coli*, *Y. pestis*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, and *L. pneumophila* sequenced Fur proteins, a 260-bp fragment was amplified from *A. baumannii* BM2580 with these primers and was subsequently cloned into the pMOSBlue T vector. Nucleotide-sequencing confirmed the identity of a *fur* homolog gene from *A. baumannii*. Using this sequence, two internal primers of the putative *fur* gene, FUR6 and FUR7 (Table 1, Fig. 4) were designed to amplify, as predicted, a specific 178-bp DNA fragment from *A. baumannii* BM2580. This specific 178-bp DNA fragment was labeled, hybridized, under high stringency conditions, with endonuclease digested DNA from strain BM2580. As shown on Fig. 5, the probe gave a strong signal in each lane (except lane 3) to a single band from *A. baumannii* BM2580 chromosomal DNA digested with different restriction enzymes. The probe hybridized strongly to a single *HindIII-ClaI* band of approximately 1.7-kb in size (Fig. 5, lane 4). A single fragment of 1.7-kb was hypothesized to be large enough to contain the *fur* homolog structural gene and flanking regions at both ends. The DNA band containing the 1.7-kb fragment was extracted from the gel then ligated into the plasmid pBluescript KS(+) vector to construct a *HindIII-ClaI* minilibrary.

The ligated DNA was used subsequently as a template for PCR amplification of the *fur* region with two primer sets, RV and T7 primers hybridizing to the vector plasmid pBluescript KS(+) and the internal primers FUR6 and FUR7, hybridizing to the *fur* gene of *A. baumannii* DNA, respectively. Two ethidium bromide-stainable bands of approximately 700-bp and 1300-bp were amplified. When cloned and sequenced, both of these PCR products were found to represent a fragment of a putative *fur* gene. The two

overlapping products had overlapping sequences of 178 nucleotides (equivalent to the FUR6-FUR7 fragment). To verify that these two overlapping amplified fragments belonged to the same *fur* gene, two novel oligonucleotide primers flanking the entire *fur* gene, FUR8 and FUR11, were synthesized using the nucleotide sequences (Table 1). Total genomic DNA of *A. baumannii* BM2580 was amplified by PCR with the primers FUR8 and FUR11 giving the expected fragment of 747-bp in length which was cloned.

**DNA sequence of the *A. baumannii fur* gene.** The PCR amplification of total genomic DNA of *A. baumannii* BM2580 with the two primers FUR8 and FUR11 and nucleotide-sequencing of several clones from each amplification containing the 747-bp fragment were repeated several times to confirm our results. Several clones containing the 747-bp fragment were sequenced using the universal primers of the plasmid pMosBlue and the specific nucleotide primers FUR6, FUR7, FUR8 and FUR11. Nucleotide-sequencing of the 747-bp fragment confirmed that the two overlapping fragments described above belong to the same *fur* gene of *A. baumannii*. The *A. baumannii fur* gene sequence revealed an open-reading frame (ORF) of 435-bp. The open-reading frame started at position 179 and coded for a 145-amino-acid protein, rich in histidine residues (7.5 %), and having a calculated molecular mass of 16,060. This value was in good agreement with the estimated molecular weight of approximately 16 kDa which was observed when Western blots of cytoplasmic proteins from *A. baumannii* grown in iron-restricted media and iron-supplemented media were probed with rabbit polyclonal anti-*E. coli* Fur serum with no major effect on the expression of the Fur protein (Fig. 6). The *fur* ORF was preceded by a putative ribosome binding site (Fig. 7). Upstream of the AUG start codon, there were sequences similar to the -35 and -10 hexamers of promoters used by the major form of RNA polymerase in *E. coli*. However, the two hexamers were separated by 16 bases instead of the consensus 17 bases (13). An imperfect inverted repeat that overlaps the -10 region was identified. This region whose sequence was 5'-AATTATGATGCATTTIGATC-3', possessed a 11-of-19-base match (identical bases to the consensus are underlined) with the *E. coli* Fur binding site (Fur box, GATAATGATAATCATTATC), indicating that the *A. baumannii fur* gene was probably autoregulated in a manner similar to *E. coli* (20). A palindromic region, indicated on Fig. 7 by arrows in the 3' untranslated region, capable of forming a stem-loop structure reminiscent of a putative transcriptional terminator was located downstream from the *fur*

coding sequence. Loci homologous to the *A. baumannii* BM2580 *fur* gene were identified by PCR amplification of total genomic DNA with the primers FUR8 and FUR11 from 4 other different clinical strains of *A. baumannii* (including *A. baumannii* BM2686 previously described (18)). In the nucleotide sequence, only one codon differs, since the alanine in position 337 in our sequence (Fig. 8) was coded by GCG instead of GCA in the sequence of the *fur* gene of three strains out of the five strains studied (data not shown). Consequently, these results confirmed our nucleotide sequence of the *fur* gene of *A. baumannii* BM2580 and show that the *fur* gene was highly conserved within clinical strains of *A. baumannii*.

**Homology with the PilU protein of *P. aeruginosa*.** A search of GenBank™ /EBI Data Bank was performed on the 3' flanking region of the *fur* gene of *A. baumannii* BM2580 (4) and revealed that the deduced amino acid sequence of the 3' flanking region exhibited high similarity to the PilU protein of *P. aeruginosa* (Fig. 9). We thus identified, downstream of the putative transcriptional terminator, the 3' end of a divergent partial open reading frame (orf2) with homology to the PilU protein (42 % identity over a 60-residue overlap) of *P. aeruginosa* (Fig. 7). Evidently, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* do not share a common gene arrangement downstream of *fur*, since in *P. aeruginosa* *fur* and *pilU* were not linked (32). The upstream region of the *fur* gene did not reveal any homology to any protein currently released in the GenBank™ /EBI Data Bank.

**Similarity of *A. baumannii* Fur with other bacterial Fur.** The deduced amino acid sequence of the *A. baumannii* Fur protein was aligned with the other 22 Fur amino acid sequences currently released in the GenBank™ /EBI Data Bank. It was 63 % identical to the *E. coli* Fur sequence. A comparable level of similarity was shared between the *A. baumannii* Fur protein and the Fur proteins of other Gram-negative pathogens listed on Fig. 8 except for the *Campylobacter* strains and *Helicobacter pylori* from which the *A. baumannii* Fur protein highly diverged.

Given the sufficiently large database of Fur amino acid sequences available from the GenBank™/EBI Data Bank, it was possible to identify with some reliability the regions which were highly conserved and the potentially required for Fur functions. Three highly-conserved motifs have been identified from the Fur amino acid sequences alignment: the first domain in the N-terminal region **GLATVYRVL** (positions 51 to 59 of the *E. coli* Fur, bold and underlined letters represent residues that were found in all the Fur

protein sequences currently released in the GenBank<sup>TM</sup>/EBI Data Bank); the second domain in the C-terminal region HHDHX<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>CGXVIEF (X represents intervening residues, positions 87 to 102 of the *E. coli* Fur ); and the third domain in the N-terminal region LX<sub>2</sub>GLKVTLP (positions 8 to 19 of the *E. coli* Fur, X represents intervening residues).



## DISCUSSION

Little is known about the iron metabolism in *A. baumannii*, thus prompting our investigation. It is important to understand the potential of *Acinetobacter* to respond to iron-stressed conditions as it may reflect their ability to survive and cause infections in the human host. Thus, for this bacteria this paper is the first to report a kinetic study on siderophore production and bacterial growth, data on iron-regulated proteins, and identification of a *fur* gene homolog.

As there was no difference between the growth curves of bacteria with the two kinds of chemically-defined medium during the exponential phase, iron might act as a growth factor rather late, especially during the stationary phase, and therefore delaying the cell lysis observed early with the iron-restricted medium. Our results suggest that *A. baumannii* required a low concentration of iron which was illustrated by a proper growth in the CDM-Fe, and that an active iron-uptake mechanism was operational. These results are consistent with those obtained by Echenique et al. (10) who showed that *A. baumannii* grew well under iron-restricted conditions and also reported an increased generation time compared with bacteria cultured in iron-supplemented conditions.

Yamamoto et al. (34) purified a novel catecholate/hydroxamate siderophore, different from the catecholate siderophore described by Echenique et al., called acinetobactin. However, few studies have been done on kinetics of siderophore secretion by *A. baumannii*. The siderophore production described in our study seemed to be population-dependent as siderophore activity could not be detected before 6 hours of culture when the number of bacteria was under  $10^8$  ml<sup>-1</sup> (data not shown). As it started to be detected from 6 h of culture onwards, these results suggest that a high-affinity siderophore-dependent system for iron uptake, as described by Echenique et al. (10), was rapidly set up only a few hours after incubation. This is supported by the good growth observed during the first hours of culture. However, during the exponential phase, siderophore-secretion increased weakly during the first 9 h of incubation suggesting a certain bacterial adaptation to growth conditions. To precede or accompany exponential growth, an active iron-uptake system was presumably required within the lag phase and the first hours of the exponential phase during which siderophore secretion was undetectable. This implies that the CAS assay used for detection was not sufficiently sensitive to detect the early secretion or that bacteria in the lag phase used a siderophore-

independent pathway for iron-uptake. During cell lysis period, siderophore activity increased, which might be due to a cytoplasmic release of siderophore from death cells. Then, from 24 h onwards, as growth curve and siderophore kinetics evolved similarly, a metabolic cycle implying secretion and reabsorption of the siderophore by the bacteria might be suggested (11).

The iron-regulated outer membrane proteins identified in our study may play an important role as components of the cell membrane receptors that recognize and internalize the iron-siderophore complexes, as described for other bacterial iron-uptake systems (10, 27). Some of the outer membrane proteins had been already identified by Coomassie blue-staining by Echenique et al. (10), or by immunoblotting with serum from septicemic patients (28) although no iron-inducible outer membrane proteins and no iron-regulated cytoplasmic proteins have been previously described in *Acinetobacter* species.

This expression of such a siderophore-mediated iron uptake system represents a benefit for the invading bacteria by allowing it to compete with host-binding proteins for essential iron and may also represent a detrimental factor for the host since such systems were demonstrated to be important virulence factors in the establishments of bacterial infections. The genes encoding the structural and regulatory components of this siderophore-mediated iron uptake system have not been yet identified in *A. baumannii*. The genes involved in iron uptake in *E. coli* and other aerobic bacteria are coordinated by the ferric uptake regulator protein Fur.

To date, *fur* genes from many pathogenic organisms such as *E. coli* (25), *V. cholerae* (19), *Bordetella pertussis* (7), and *Neisseria gonorrhoeae* (6) have been cloned and sequenced. We report in this work for the first time the existence of a *fur* gene originating from *Acinetobacter*. Our results show that the *fur* gene is conserved within clinical strains of *A. baumannii*. Western blot analysis did not suggest a major effect of iron on the expression of the Fur protein of *A. baumannii* as already shown with the Fur protein of *V. cholerae* and *V. vulnificus* (19, 21). Our results showed that *E. coli* Fur protein, *P. aeruginosa* Fur protein, and *A. baumannii* Fur protein shared antigenic determinants.

The three highly-conserved motifs identified in our study (GLATVYRVL, HHDHX<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>CGXVIEF, LX<sub>2</sub>GLKVTLPR; X represent intervening residues) approximated to the three motifs noted by Achenbach et al. (1) when reporting the

sequence of the *Klebsiella pneumoniae fur* gene. The amino acid sequence of the first two highly conserved motifs of the Fur proteins of *E. coli*, *Y. pestis*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa* and *L. pneumophila* were aligned to design the two degenerate primers used to clone the *fur* gene from *A. baumannii*. The deduced amino acid sequence of the *A. baumannii* Fur protein was aligned afterwards with the other Fur aa sequences currently released in the GenBank™/EBI Data Bank. The *A. baumannii* Fur contains the three highly-conserved motifs LRKAGLKVTLPR, GLATVYRVL, HHDHLVCQNCNKVIEF (where G was substituted by the second N in the case of *A. baumannii*).

Several laboratories have started to define the functional domains of Fur *E. coli* protein involved in metal-binding and in DNA binding (9, 24, 30). Coy and Neilands (9) proposed a functional model of the Fur repressor in which the C-terminal region Fur(C) is responsible for oligomerization and metal binding whereas the N-terminal region, Fur(N) is involved in DNA recognition and binding. These results were confirmed more recently by Stojiljkovic and Hantke (30) with the results of fusion protein studies combining different domains of Fur and the  $\lambda$  repressor cI857 indicating that the N-terminus of Fur is involved in DNA binding while the C terminus is required for dimerization and metal-binding. Fe(II)-binding induces a conformational change in the N-terminal domain which subsequently permits operator binding (30).

The most likely ligands for ferrous iron binding were histidine and cysteine residues. Histidines and cysteines shaded on Fig. 8 were highly conserved in the C-terminal region of all the different aligned Fur proteins. The *A. baumannii* Fur protein had all the conserved histidine and cysteine residues described previously containing 11 histidine residues and 4 cysteine residues.

Three different iron-binding motifs in Fur have been identified. The Cys-X<sub>2</sub>-Cys-Gly (X represents intervening residues) Fur motif, at positions 93 to 97 of the *E. coli* Fur, present in the metal-binding centers of ferredoxins and many other metal-binding proteins, was absent from the *A. baumannii* Fur protein: Gly was replaced by Asp (9). It was unlikely that a sequencing error was made since we repeated the experiments of PCR amplification, cloning and sequencing of the 747-bp fragment several times. A second suggested iron-binding motif in Fur is Cys-X<sub>4</sub>-Cys-X<sub>4</sub>-His-X-His (X represents intervening bases) at the carboxyl-terminal end at positions 133 to 145 of *E. coli* Fur has

been proposed to be involved in metal-binding (14). This sequence also resembles a DNA-binding motif (zinc finger) found in some eucaryotic DNA-binding proteins (16). This motif was absent in *A. baumannii*-Fur. However, a comparison of the twenty-two Fur sequences, currently available in the GenBank™/EBI Data Bank, revealed that this domain was absent from more than 50% of the Fur predicted amino acid sequences suggesting that it might not be the major metal-binding domain. A third suggested iron-binding motif in Fur is His-His-X-His-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys (X represents intervening residues) at positions 87 to 96 of *E. coli* (14). This iron-binding domain overlaps with the first described above. The *A. baumannii* Fur protein contains this motif rich, in histidine and cysteine. This motif is the best conserved among all the different sequenced *fur* genes currently available in the GenBank™/EBI Data Bank as shown on Fig. 8 and thus a potential metal-binding site in the Fur protein.

The deduced amino acid sequence of the 3' flanking region of the *fur* gene exhibits high homology (42 % identity) to the PilU protein of *P. aeruginosa*. These results suggest that *A. baumannii* has type IV pili (32). In the *P. aeruginosa* type-4 fimbrial system, the *pilU* gene encodes a 38 kDa protein involved in the type-4 pili synthesis. Adhesion to host epithelial cells is required for successful colonization and subsequent infection by most bacterial pathogens. To achieve this, many pathogenic bacteria possess filamentous polymeric surface structures named pili (3). Our results suggest that type-4 pili may also be involved in the mucosal colonization process of *A. baumannii*.

Whereas *A. baumannii* is an opportunistic human pathogen that presents a potential risk of severe infections for patients, the nature of the factors affecting the virulence of this bacterium is not yet fully understood. While considerable attention has focused on the ferric uptake regulator (*fur*) locus and the iron metabolism of important pathogenic bacteria, only very few reports have been published on iron metabolism in *A. baumannii*. Therefore, this study reports that *A. baumannii* is able to respond to the availability of iron in its environment and codes for a protein homolog to *E. coli* Fur protein. The expression of a high affinity-mediated iron uptake system and the expression of several proteins under iron limitation as well as the existence of a *fur* gene could be important virulence factors in the establishment of bacterial infections. Since Fur and Fur-like repressors are known to regulate some virulence-determinant genes in other bacteria (33), the *A. baumannii* Fur-like repressor protein may also regulate a subset of genes with a role in pathogenesis.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Conseil Régional Nord-Pas-de-Calais, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, and Direction de la Recherche et des Etudes Doctorales. We are extremely grateful to Dr. Michael Vasil for the gift of the rabbit polyclonal anti-*E. coli* serum. We are also grateful to Professor Michel Simonet for critical review of the manuscript and to Claude Vandepierre for photography.

## REFERENCES

1. Achenbach, A., and W. Yang. 1997. The *fur* gene from *Klebsiella pneumoniae*: characterization, genomic organization and phylogenetic analysis. *Gene* **185**:201-207.
2. Actis, L. A., M. E., Tomalsky, L. M. Crosa, and J. H. Crosa. 1993. Effect of iron-limiting conditions on growth of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* **25**:488-490.
3. Alms, R. A., and J. S. Mattick. 1997. Genes involved in the biogenesis and function of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **192**:89-98.
4. Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
5. Bergogne-Bérézin, E., and K. J. Towner. 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**:148-165.
6. Berish, S. A., S. Subbarao, C. Y. Chen, D. L. Trees, and S. A. Morse. 1993. Identification and cloning of a *fur* homolog from *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* **61**: 4599-4606.
7. Brickman, T. J., and S. K. Armstrong. 1995. *Bordetella pertussis fur* gene restores iron repressibility of siderophore and protein expression to deregulated *Bordetella bronchiseptica* mutants. *J. Bacteriol.* **177**: 268-270.
8. Courcol, R. J., P. A. Lambert, P. Fournier, G. R. Martin, and M. R. W. Brown. 1991. Effects of iron depletion and sub-inhibitory concentrations of antibiotics on siderophore production by *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **28**:663-668.
9. Coy, M., and J. B. Neilands. 1991. Structural dynamics and functional domains of the Fur protein. *Biochemistry* **30**:8201-8210.
10. Echenique, J. R., H. Arienti, M. E. Tolmasy, R. R. Read, R. J. Staneloni, J. H. Crosa, and L. A. Actis. 1992. Characterization of a high-affinity iron transport system in *Acinetobacter baumannii*. *J. Bacteriol.* **174**:7670-7679.
11. Guerinot, M. L. 1994. Microbial iron transport. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 743-772.

12. **Hall, H. K., and J. W. Foster.** 1994. The role of Fur in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *J. Bacteriol.* **178**:5683-5691.
13. **Hawley, D. K., and W. R. McClure.** 1983. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **11**:2237-2255.
14. **Hennecke, H.** 1990. Regulation of bacterial genes expression by metal-protein complexes. *Mol. Microbiol.* **4**:1621-1628.
15. **Jiménez-Mejias, M. E., J. Pachon, B. Becerril, J. Palomino-Nicas, A. Rodriguez-Cobacho, and M. Revuelta.** 1997. Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitidis with ampicillin/sulbactam. *Clin. Infect. Dis.* **24**:932-935.
16. **Klug, A., and D. Rhodes.** 1987. Zinc fingers: a novel protein motif for nucleic acid recognition. *Trends Biochem. Sci.* **12**:464-469.
17. **Lambert, T., G. Gerbaud, and P. Courvalin.** 1988. Transferable amikacin resistance in *Acinetobacter* spp. due to a new type of 3'-aminoglycoside phosphotransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**:15-19.
18. **Lambert, T., G. Gerbaud, and P. Courvalin.** 1994. Characterization of the chromosomal *aac (6')-Ij* gene of *Acinetobacter* sp.13 and the *aac (6')-Ih* plasmid gene of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**: 1883-1889.
19. **Litwin, C. M., S. A. Boyko, and S. B. Calderwood.** 1992. Cloning, sequencing, and transcriptional regulation of the *V. cholerae fur* gene. *J. Bacteriol.* **174**: 1897-1903.
20. **Litwin, C. M., and S. B. Calderwood.** 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**:137-149.
21. **Litwin, C. M., and S. B. Calderwood.** 1993. Cloning and genetic analysis of the *Vibrio vulnificus fur* gene and construction of a *fur* mutant by in vivo marker exchange. *J. Bacteriol.* **175**: 706-715.
22. **Litwin, C. M., and S. B. Calderwood.** 1994. Analysis of the complexity of gene regulation by Fur in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **176**:240-248.
23. **Prince, R. W., C. D. Cox, and M. L. Vasil.** 1993. Coordinate regulation of siderophore and exotoxin A production: molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa fur* gene. *J. Bacteriol.* **175**:2589-2598.

24. Saito, T., M. R. Wormald, and R. P. J. Williams. 1991. Some structural features of the iron-uptake regulation protein. *Eur. J. Biochem.* **197**:29-38.
25. Schaffer, S., K. Hantke, and V. Braun. 1985. Nucleotide sequence of the iron regulatory gene *fur*. *Mol. Gen. Genet.* **200**: 110-113.
26. Schwyn, B., and J. B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**:47-56.
27. Smith, A. W., S. Freeman, W. G. Minett, and P. A. Lambert. 1990. Characterisation of a siderophore from *Acinetobacter calcoaceticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**:29-32.
28. Smith, A. W., and K. E. Alpar. 1991. Immune response to *Acinetobacter calcoaceticus* infection in man. *J. Med. Microbiol.* **34**:83-88.
29. Sprott, G. D., S. F. Koval, and C. A. Schnaitman. 1994. Cell fractionation. In: *Methods for general and molecular bacteriology* (Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A. and Krieg, N.R., Eds.), pp. 72-103. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
30. Stojiljkovic, I., and K. Hantke. 1995. Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein (Fur). *Mol. Gen. Genet.* **247**:199-205.
31. Wendt, C., B. Dietze, E. Dietz, and H. Rudden. 1997. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1394-1397.
32. Whitchurch, C. B., and J. S. Mattick. 1994. Characterization of a gene, *pilU*, required for twitching motility but not phage sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **13**:1079-1091.
33. Wooldridge, K. G., and P. Williams. 1993. Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**:325-348.
34. Yamamoto, S., N. Okujo, and Y. Sakakibara. 1994. Isolation and structure elucidation of acinetobactin, a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii*. *Arch. Microbiol.* **162**:249-254.



## LEGENDS FOR TABLE AND FIGURES

**Table 1.** Primers used for DNA cloning and sequencing.

**Fig. 1.** Kinetics of growth (bacterial counts expressed in number of cells ml<sup>-1</sup>; CDM+Fe \* ; CDM-Fe ◇) and siderophore production (siderophore expressed in μM Desferal equivalents ;□) of *A. baumannii* BM2580 in CDM-Fe. Values are means of two experiments.

**Fig. 2.** SDS-PAGE profiles of outer membrane proteins from *A. baumannii* BM2580. Lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 : CDM+Fe ; lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 : CDM-Fe ; lane 15: molecular weight markers (kDa).

**Fig. 3.** SDS-PAGE profiles of cytoplasmic proteins from *A. baumannii* BM2580. Lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 : CDM+Fe ; lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 : CDM-Fe ; lane 15: molecular weight markers (kDa).

**Fig. 4.** Strategy for cloning the complete *fur* gene. A) FUR3 and FUR5 were designed on the basis of sequence data from other Fur proteins. B) FUR6 and FUR7 were designed on the basis of the nucleotide sequence of the DNA fragment obtained from *A. baumannii* by PCR using the FUR3 and FUR5 primers. C) The fragment FUR6-FUR7 was used as a probe on Southern transfers of *A. baumannii* BM2580, digested with various restriction enzymes, and hybridized to a single *Hind*III-*Cla*I band. D) FUR8 and FUR11 were designed on the basis of the nucleotide sequence of the two overlapping PCR products. Arrows represent sense primers and the left arrows represent antisense primers. The shaded box represents the ORF.

**Fig. 5.** Southern hybridization of *A. baumannii* BM2580 DNA with the 178-bp FUR6-FUR7 nick-translated *fur* probe. Genomic digests were as follows: lane 1, *Cla*I, lane 2, *Hind*III, lane 3, *Sma*I, lane 4, *Hind*III and *Cla*I, lane 5, *Hind*III and *Xba*I, lane 6, *Bst*XI, lane 7, *Bst*XI and *Eco*RI, lane 8, *Hind*III and *Sma*I, lane 9, *Cla*I and *Xba*I. The arrow indicates the single-hybridizing band *Hind*III and *Cla*I of 1700-bp.

**Fig. 6.** Detection of *A. baumannii* BM2580 Fur by immunoblotting with rabbit polyclonal antiserum to *E. coli* Fur. Lane 1 : iron-supplemented medium ; lane 2 : iron-restricted medium ; lane 3: molecular weight markers in kDa. Arrow indicates the Fur protein. Other bands are non-specific.

**Fig. 7.** DNA sequence of the *A. baumannii fur* gene and flanking regions. Amino-acids are indicated by single letter designations and numbered 1-145 in the left margin. Putative -35

and -10 regions are overlined, as are the putative ribosomal binding sites (RBS). A sequence similar to the consensus Fur-binding site (Fur box) is highlighted by shading and identical bases to the consensus are underlined. Asterisks indicate stop codons. Arrows indicate a transcription termination signal (palindromic sequence). Downstream of the transcription termination signal is the 3' end of a divergent open reading frame (orf 2) with homology to the 3' region of the *pilU* gene of *Pseudomonas aeruginosa*. The sequence reported in this article has been assigned the GenBank™/EBI Data Bank accession number Y14980.

**Fig. 8.** Comparison of Fur proteins sequences from the following GenBank accession numbers: EC, *E. coli* (X02589); YP, *Y. pestis* (Z12101); VA, *V. anguillarum* (L19717); VV, *Vibrio vulnificus* (L06428); VC, *V. cholerae* (M86629); PA, *P. aeruginosa* (L00604); LP, *L. pneumophila* (U06072); PP, *P. putida* (X82037); BP, *B. pertussis* (U11699), KP, *K. pneumoniae* (L23871); NG, *N. gonorrhoeae* (L11361); NM, *N. meningitidis* (L19777); ST, *S. typhimurium* (Hall and Foster, 1994); HI, *H. influenzae* (HI0190); HD, *H. ducreyi* (U37224); CU, *C. upsaliensis* (L77075); CJ, *C. jejuni* (Z35165); HP, *H. pylori* (HP1027); SY, *Synechococcus* sp. (L41065); SE, *S. epidermidis* (X97011); SP, *S. pyogenes* (U76538); *Synechocystis* sp (D90903), AB, *A. baumannii*. Amino acids are indicated by a single letter designation and numbered 1-148 for the *E. coli* Fur protein. Dashes indicate gaps introduced in the sequence for alignment purposes. Identical amino acids in at least 19 Fur proteins are shaded. Shown in bold letters are the residues Cys and His that are thought to be critical to metal binding.

**Fig. 9.** Amino acid alignment of the downstream region of the *fur* gene of *A. baumannii* BM2580 (orf2) and the C-terminus of the PilU protein of *P. aeruginosa* (GenBank accession number S54702). Amino acids are indicated by a single letter designation and numbered 321-382 for the PilU protein of *P. aeruginosa*. Dashes indicate gaps introduced in the sequence for alignment purposes. Capital letters between the compared sequences indicate conserved amino acids. Periods indicate substitutions of functionally similar amino acids.

**Table 1. Primers used for DNA cloning and sequencing**

<b>Primer designation</b>	<b>Primer sequence (5' to 3')</b>	<b>Position</b>	<b>Orientation*</b>
FUR 3	GCIGGIYTIAARRTIACIYTICCIMG	209-234	S
FUR 5	CCRCAITYIAVRCAIAYIADRTGRTCRTG	440-468	AS
FUR 6	CAAACAACATCATCTTAGCGCCG	264-287	S
FUR 7	TGATGATCTTCTTGCATGATTCG	418-441	AS
FUR 8	GCAGATGGGGTCCTGATCAAT	727-747	AS
FUR 9	ATTGATCAGGACCCCATCTGC	727-747	S
FUR 10	GGTTGTTCAATCTTTGGTGTAT	1-22	S
FUR 11	ATACACCAAAGATTGAACAACC	1-22	S

\* Strand orientation: sense (S), antisense (AS).

Figure 1

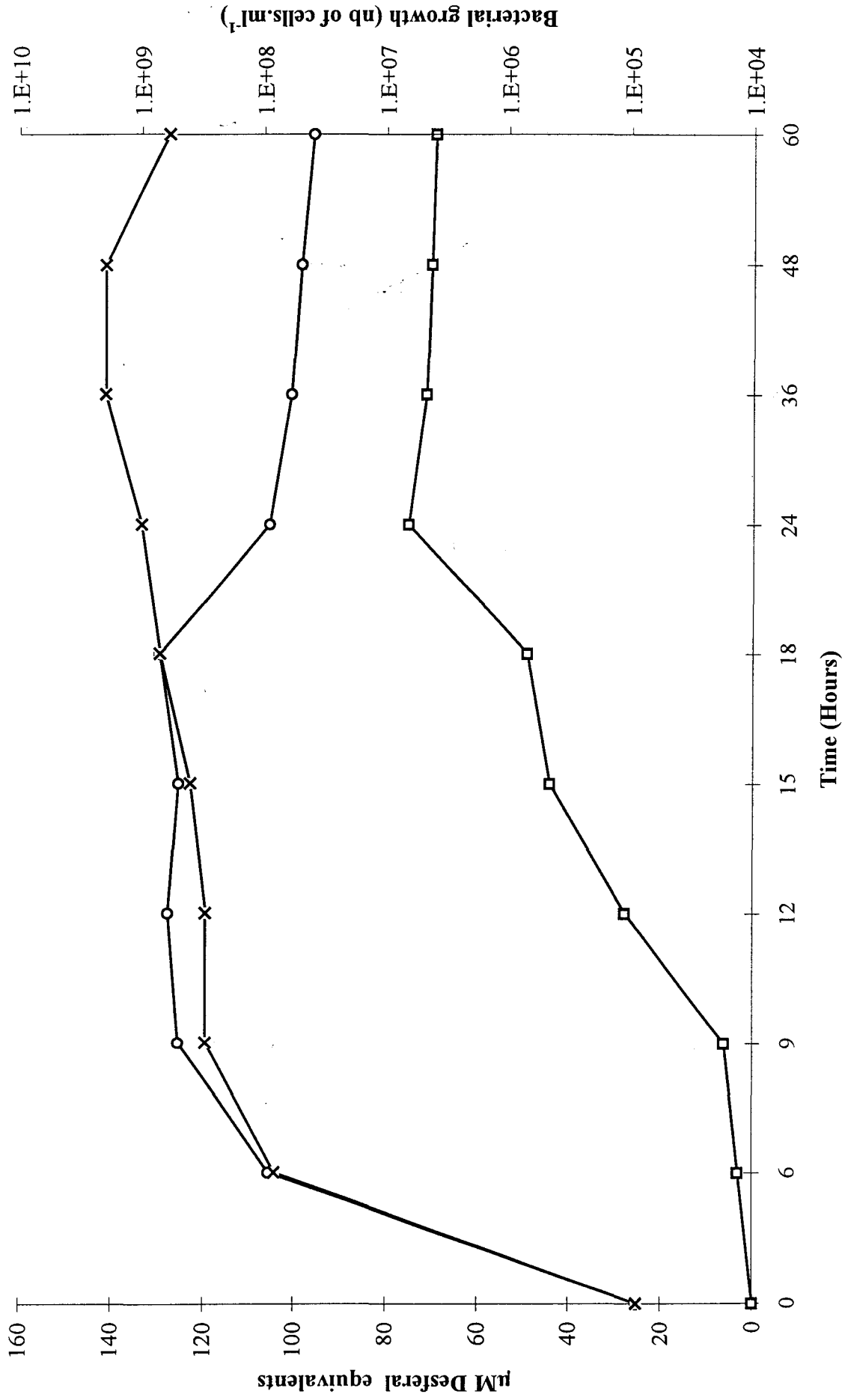


Figure 2

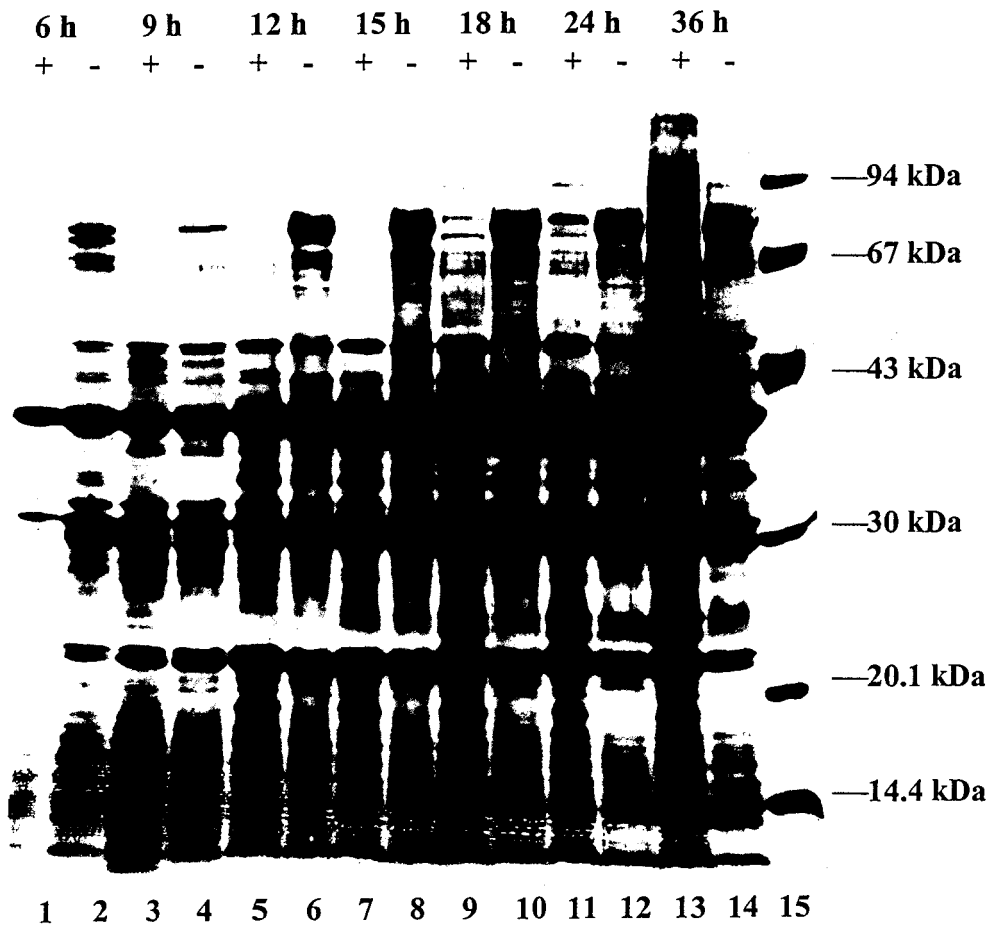
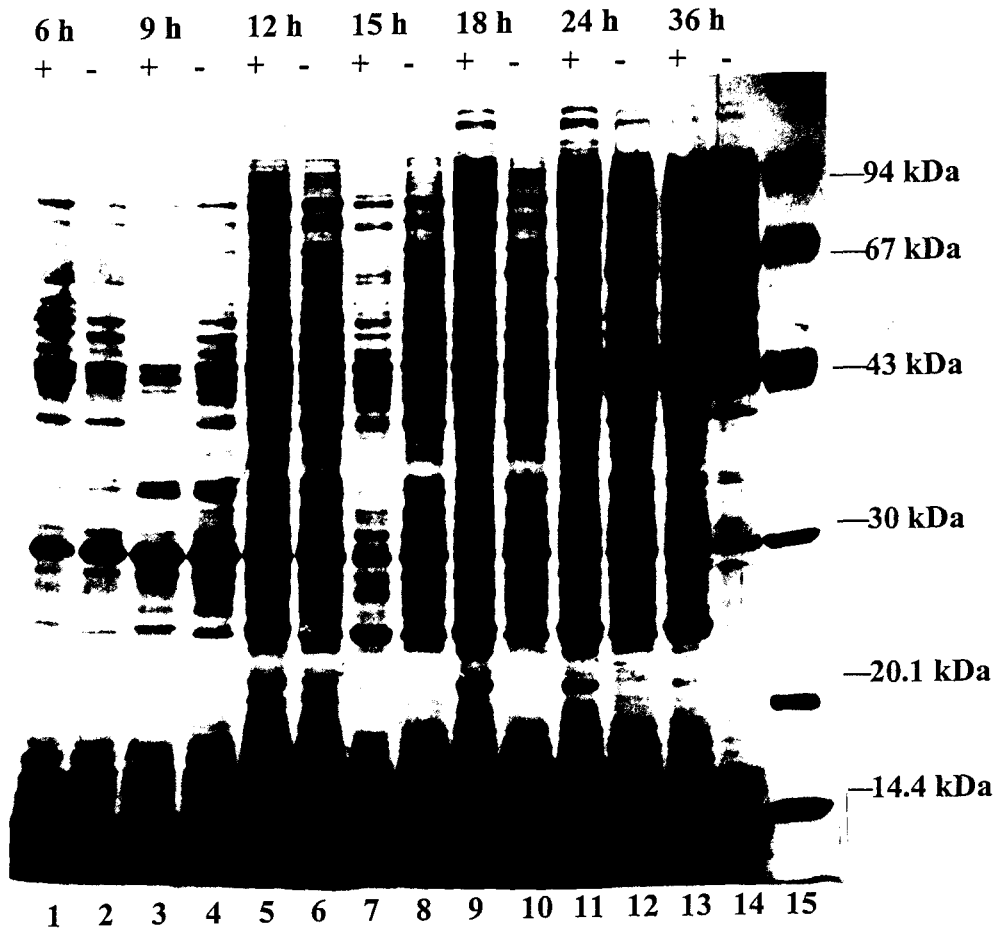
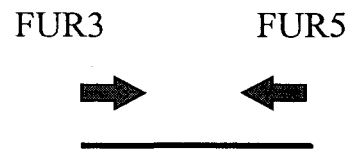


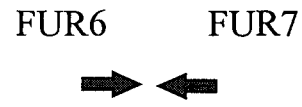
Figure 2



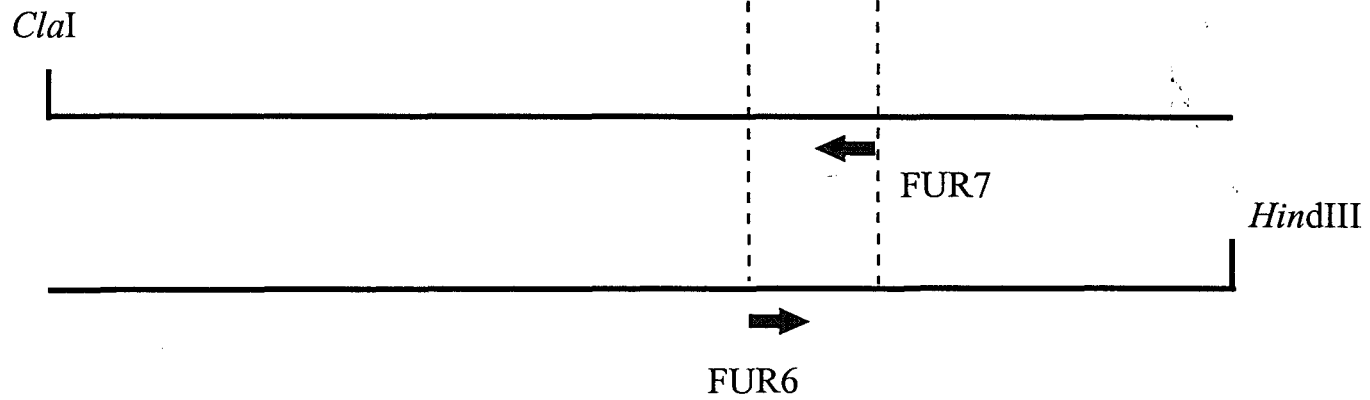
**A** degenerate primers



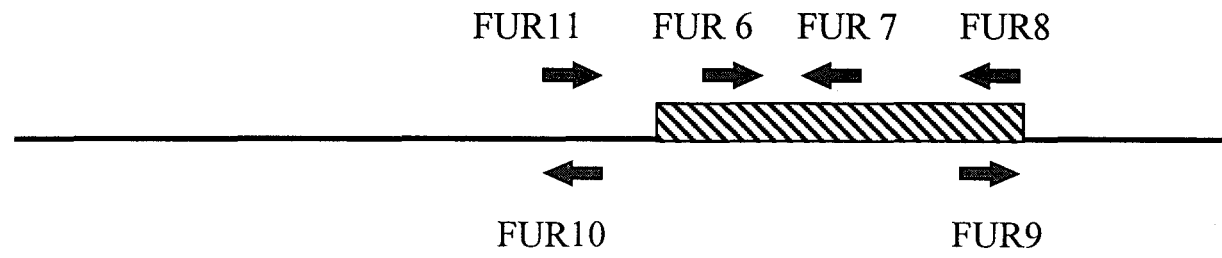
**B** internal primers



**C** overlapping fragments



**D** complete gene



154

└─┬─┘ 100 bp

1 2 3 4 5 6 7 8 9

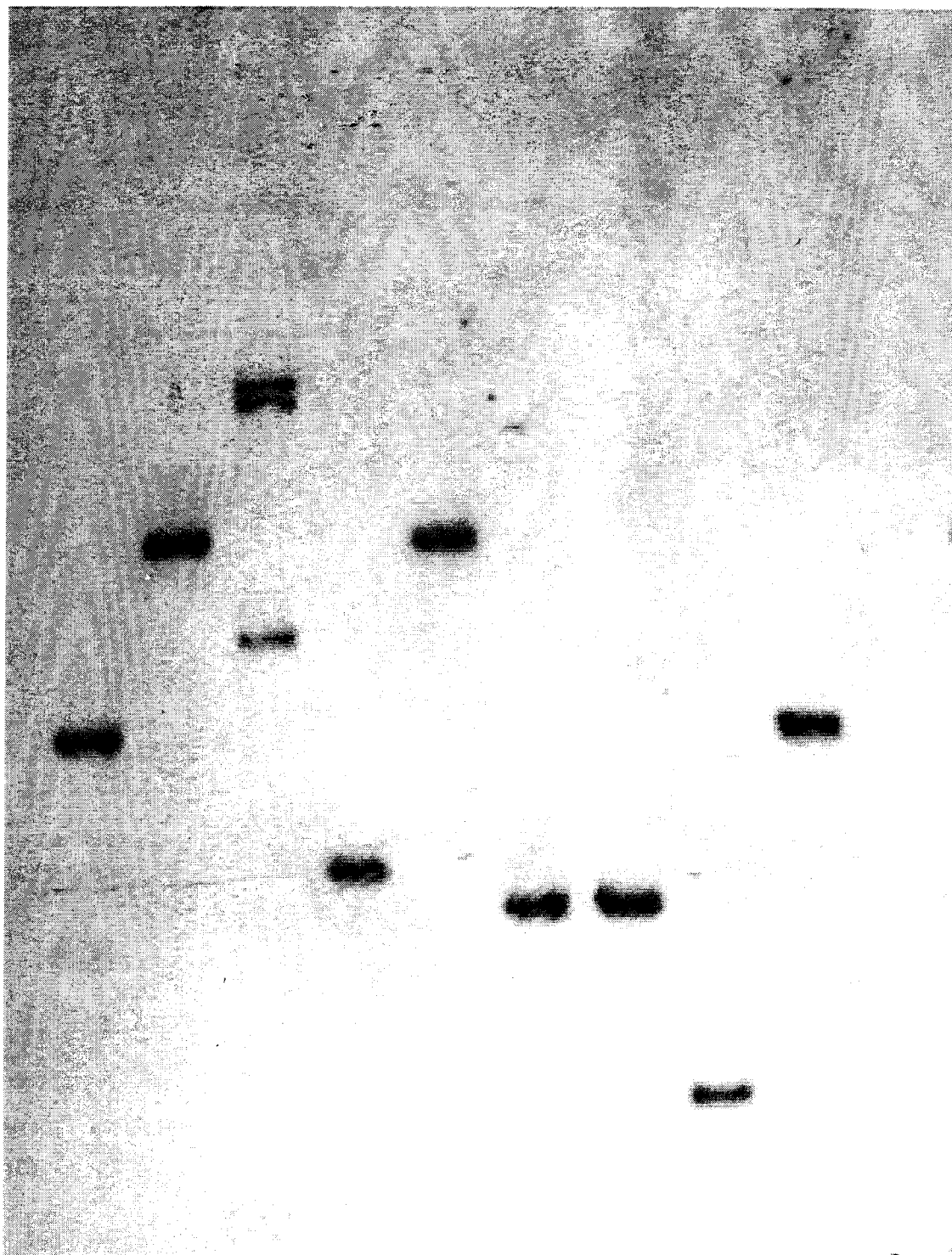
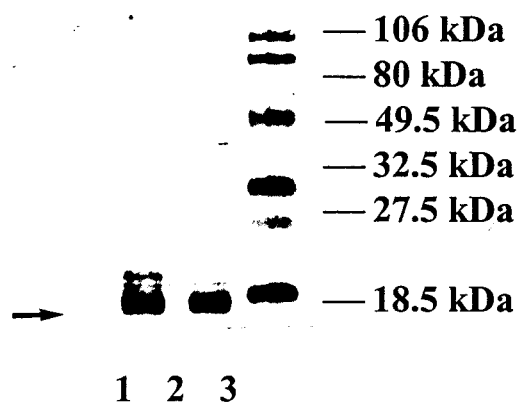
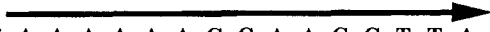
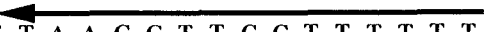




Figure 6



A T A C A C C A A A G A T T G A A C A A C C A G C T A G G A G T G A A G T G A C G A A T A A C G T C A G C A C G A G 58  
 T T T T T G C A T T T T T G C T A C A C T A T C C C A A T A A A T T A T G A T G C A T T T G A T C A A A G G A T A G A T C 118  
 A T A C T T C A T C T A A A T T C T A T T G C C T A T T C C A A C T T G A G A T T T G T T G A G A G A C C T T T T T T C 178  
 A T G C C T A T T T C C A A T C A A G A T T T G C G C A A A G C T G G A C T T A A A G T T A C C C T T C C A C G A A T T 238  
 1 M P I S N Q D L R K A G L K V T L P R I  
 A A G A T T T T G G A A T T A T T A G A A A A T T C A A A A C A A C A T C A T C T T A G C G C C G A A G A T A T T T A C 298  
 21 K I L E L L E N S K Q H H L S A E D I Y  
 A A G A C T T T G T T A G A G C A A G G G G A A G A T G T C G G A C T T G C G A C A G T T T A C C G T G T G T T A A C A 358  
 41 K T L L E Q G E D V G L A T V Y R V L T  
 C A A T T T G A A G C T G C G G G T A T T A T T C A A C G T C A T C A T T T T G A A A A T A A C C A T T C T G T T T T C 418  
 61 Q F E A A G I I Q R H H F E N N H S V F  
 G A A A T C A T G C A A G A A G A T C A T C A C G A T C A C T T A G T A T G C C A A A A C T G T A A C A A A G T C A T T 478  
 81 E I M Q E D H H D H L V C Q N C N K V I  
 G A A T T T A C T A A T G A T G T T A T C G A G A A A G A A C A G C A T T C T G T A G C A G A A C A A C A T G G G T T T 538  
 101 E F T N D V I E K E Q H S V A E Q H G F  
 A C C T T A A C G G G T C A C T C A T T A A A T C T C T A T G G T T A C T G T A A T G A A C C T G A A T G T C A G G A A 598  
 121 T L T G H S L N L Y G Y C N E P E C Q E  
 G C A T T G C G C A A G A A A T A A T C G T T T T C A C A T A A A G A A A A C A A A T A A A A A A G G A A G G T T A C G 658  
 141 A L R K K \* fur stop   
 T T T A A C C T T C C T T T T T T A T G A A G A A A T T A C T G G C G G T C A A A A G T T A A A T G C T G T T T T C C 718  
 G T C T G A T A A T T G A T C A G G A C C C C A T C T G C A A G T T T A A T G G T T A A A C G T A A A T C G T T C G G T 778  
 G A G T C A G C A T G T T T A A G T G C A T C T T T G T A G G T A A T T T G A C C A G C T T T A T A T A A A T C A A A T 838  
 A A 840  




PilU            321 L Y Q L Y T Q G E I T Y E D A L A H A D S A N D L R L M I K L  
 putative PilU        |    | |    |    | | |    | | |    | | |    | | |    | | |    | | |    | | |  
                       L F D L Y K A G Q I T Y K D A L K H A D S P N D L R L T I K L

PilU            352 G S E S D A D H L S S L T Q G L E I T D D D P A G R R F R stop  
 putative PilU        - - - - - A D G V L I N Y Q T E N S I stop - - - - -

### 2.3. Résumé

Les cinétiques de croissance des bactéries en milieu carencé et supplémenté en fer sont similaires jusqu'en fin de phase exponentielle de croissance. Ces résultats suggèrent que le fer agit tardivement comme facteur de croissance et que la captation du fer en milieu supplémenté en fer ne se fait qu'à la fin de la phase exponentielle de croissance. Ces résultats suggèrent également que *A. baumannii* nécessite une concentration faible en fer pour sa croissance et qu'un mécanisme actif de captation du fer est opérationnel.

Aucune activité sidérophore n'a été détectée dans le milieu supplémenté en fer, ce qui indique que la production de sidérophores est strictement régulée par la concentration en fer. La sécrétion de sidérophores n'a pas été détectée dans le milieu carencé en fer pendant la phase de latence et le début de la phase exponentielle. Ces résultats suggèrent que la détection des sidérophores par le chrome azurole est peu sensible ou que les bactéries utilisent un système de captation du fer autre pendant la phase de latence et le début de la phase exponentielle. La production de sidérophores augmente pendant la phase de lyse cellulaire ce qui suggère une libération du contenu cytoplasmique des bactéries. Ensuite, les cinétiques de croissance et de production de sidérophores ont évolué de manière similaire. Un cycle métabolique qui implique la sécrétion et la réabsorption du sidérophore par la bactérie a été suggéré.

Les bactéries cultivées en milieu carencé en fer expriment au niveau de leur membrane externe plusieurs protéines entre 70 et 80 kDa qui sont complètement réprimées par le fer ferrique. L'expression de deux protéines plus marquées de 75 et 80 kDa apparaît et augmente simultanément avec la sécrétion de sidérophores.

Nous avons montré que *A. baumannii* s'adapte dans des conditions de carence martiale en synthétisant des sidérophores et en exprimant des protéines de la membrane externe et des protéines cytoplasmiques spécifiques. Le fer semble jouer un rôle

primordial dans la régulation de ce système de captation du fer. Est-ce une régulation analogue à celle décrite jusqu'à présent par l'intermédiaire d'une protéine Fur-like ? Ces résultats expérimentaux nous ont amené à rechercher dans la deuxième partie de notre travail un gène *fur*-like chez *A. baumannii*.

La séquence complète du gène *fur* de *A. baumannii* révèle une phase ouverte de lecture unique de 435 pb qui code une protéine de 145 acides aminés riche en résidus histidine (7,5%) avec une masse moléculaire de 16060. Un site potentiel de fixation du ribosome et des séquences promotrices se trouvent en amont du codon start AUG. Une séquence imparfaite répétée inversée chevauche la région -10 et possède 11 bases communes par rapport aux 19 bases du site de fixation de la protéine Fur de *E. coli*. Ce résultat indique que le gène *fur* de *A. baumannii* est probablement autorégulé de manière similaire au gène *fur* de *E. coli* (Litwin et Calderwood, 1993a). Une région palindromique, capable de former une structure en boucle qui rappelle un terminateur transcriptionnel potentiel est localisée en aval de la région *fur* codante. Le gène *fur* est très conservé parmi les souches d'*A. baumannii*.

La séquence peptidique déduite de la région 3' flanquant le gène *fur* de *A. baumannii* montre de nombreuses similarités avec la protéine PilU de *P. aeruginosa*. De manière évidente, *P. aeruginosa* et *A. baumannii* ne partagent pas une disposition commune des gènes en aval du gène *fur* puisque *fur* et *pilU* ne sont pas liés chez *P. aeruginosa* (Whitchurch et Mattick, 1994). Néanmoins, ces similarités avec la protéine PilU suggère l'existence de pili de type IV chez *A. baumannii*.

La séquence peptidique Fur de *A. baumannii* est identique à 63% avec la séquence Fur de *E. coli*. Un niveau comparable de similarité est retrouvé entre la protéine Fur de *A. baumannii* et les protéines Fur des autres pathogènes à Gram négatif sauf pour les souches de *Campylobacter* et *Helicobacter pylori* qui divergent beaucoup de la protéine Fur de *A. baumannii*.

Nos analyses de séquences sur un grand nombre de protéines Fur de bactéries différentes ont confirmé que la protéine Fur de *A. baumannii* ainsi que les autres protéines

Fur possèdent trois motifs très conservés, décrits par Achenbach *et al.*, potentiellement requis pour la fonction de Fur, fixation à l'ADN et fixation au fer:

- ① le motif GLATVYRVL dans la région N-terminale
- ② le motif HHDHX<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>CGXVIEF dans la région C-terminale
- ③ et le motif LX<sub>2</sub>GLKVTLPR dans la région N-terminale (Achenbach *et al.*, 1997).

De plus, nos analyses montrent que le motif His-His-X-His-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys, proposé par Hennecke comme étant impliqué directement dans la liaison au fer (Hennecke, 1990) est le plus conservé parmi les différentes séquences Fur jusqu'à présent disponibles dans la Genbank<sup>TM</sup>/EBI Data Bank. La protéine Fur de *A. baumannii* possède ce motif.

Discussion  
et Perspectives

---

---



## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

### 1. ADAPTATION DE *B. WADSWORTHIA* ET *A. BAUMANNII* EN MILIEU CARENCE EN FER

Dans la première partie de notre travail, l'étude de la croissance de *B. wadsworthia* et de *A. baumannii* dans des conditions de carence en fer nous ont permis d'appréhender l'adaptation de ces deux bactéries pathogènes chez l'homme.

#### **1.1. *B. wadsworthia***

Ces travaux sur *B. wadsworthia* constituent la première étude réalisée sur la croissance et l'adaptation de *B. wadsworthia* dans un milieu carencé en fer.

##### **1.1.1. Différents mécanismes de captation du fer**

Nous avons montré que *B. wadsworthia* est capable de s'adapter dans des conditions de carence martiale similaires à celles retrouvées *in vivo* chez l'homme en utilisant différents mécanismes de captation du fer. Ce travail montre que le fer est un élément indispensable à la croissance de *B. wadsworthia*. Cette bactérie en milieu carencé en fer, exprime au niveau de sa membrane externe des protéines de 16 kDa, 88 kDa et 190 kDa qui sont réprimées par l'addition de fer dans le milieu de culture. Nous avons également montré que *B. wadsworthia* est capable d'utiliser *in vitro* diverses sources de fer présentes

chez l'homme comme la lactoferrine, la transferrine, l'hémine et l'hémoglobine. Les protéines de 16 kDa, 88 kDa et 190 kDa s'expriment aussi au niveau de la membrane externe de *B. wadsworthia* cultivé en milieu carencé en fer supplémenté en lactoferrine, en transferrine, en hémine, ou en hémoglobine.

#### 1.1.1.1. Mécanismes de captation du fer à partir de l'hémoglobine

L'hémoglobine et l'hème sont présents au niveau intracellulaire et ne sont disponibles aux microorganismes qu'à la suite d'une altération des tissus (Otto *et al.*, 1992). Nous avons montré que *B. wadsworthia* est capable de dégrader la molécule d'hémoglobine dans le milieu de culture. La bactérie est alors susceptible de dégrader l'hémoglobine *in vivo* pour obtenir le fer de l'hôte.

#### 1.1.1.2. Mécanismes de captation du fer à partir de la transferrine

La transferrine est présente principalement dans le sérum ou la lymphe (Otto *et al.*, 1992) alors que la lactoferrine est retrouvée dans les sécrétions des muqueuses, notamment au niveau de la bile, et au niveau des polynucléaires (Lonnerdal et Iyer, 1995). Les mécanismes de captation du fer à partir de la transferrine ou de la lactoferrine sont actuellement inconnus chez *B. wadsworthia*. Dans les conditions physiologiques normales, les bactéries sont susceptibles d'assimiler le fer lié à la transferrine de quatre manières différentes.

La première voie utilise la sécrétion de sidérophores. Cependant, aucune production de sidérophore n'a été mise en évidence au cours de nos travaux.

La deuxième voie implique un clivage protéolytique de la transferrine qui libère le fer. Nous avons montré que *B. wadsworthia* est capable de dégrader la molécule de transferrine dans le milieu de culture au cours du temps.

La troisième voie implique la libération du fer par la réduction du fer ferrique en fer ferreux. Nous avons montré que *B. wadsworthia* est capable de transporter exclusivement du fer ferreux et qu'une réduction du fer ferrique semble obligatoire avant le transport du fer à travers la membrane externe. La bactérie serait-elle susceptible de réduire le fer ferrique via une Fe (III) réductase ? Il est possible que ces deux derniers mécanismes d'assimilation du fer lié à la transferrine soient utilisés par *B. wadsworthia in vivo*.

La dernière voie possible est une interaction directe entre la transferrine et un récepteur de la transferrine situé à la surface bactérienne. Les protéines de la membrane externe de *B. wadsworthia* exprimées en milieu carencé en fer peuvent-elles jouer le rôle de récepteurs ?

La capacité que possède *B. wadsworthia* d'utiliser ces diverses sources de fer permet maintenant d'expliquer en partie comment cette bactérie réussit à survivre *in vivo* dans des niches écologiques différentes (sang, muqueuses, liquides biologiques) en échappant aux défenses de l'hôte et en entraînant des infections.

### **1.1.2. Hypothèses sur les fonctions des protéines de la membrane externe réprimées par le fer**

Dans l'état actuel de nos travaux, nous pouvons émettre quelques hypothèses concernant les fonctions des protéines de la membrane externe de *B. wadsworthia* régulées par le fer. Les protéines de la membrane externe peuvent jouer trois rôles différents:

- le rôle de porines qui permettent la simple diffusion passive de certains nutriments à travers la membrane,
- le rôle de canaux spécifiques possédant un site de fixation spécifique pour un soluté et facilitant sa diffusion,
- le rôle de récepteurs de haute affinité qui permettent le transport actif de certains composés (Nikaido, 1993; Nikaido, 1994).

### 1.1.2.1. Porines et canaux spécifiques

Des porines non spécifiques ou des canaux possédant un site de fixation spécifique pour le fer peuvent être nécessaires pour permettre la simple diffusion passive ou accélérer la diffusion du peu de fer libre disponible dans l'organisme à travers la membrane externe (Nikaido, 1993). Cependant, peu de canaux de ce type ont été décrits. En effet, le fer libre se trouve en très faible quantité dans l'organisme et les bactéries ont développé des mécanismes de captation du fer plus efficaces par des sidérophores ou des sources de fer présentes chez l'hôte qui nécessitent des mécanismes de transport spécialisés.

### 1.1.2.2. Récepteurs

#### 1.1.2.2.1. Récepteurs des protéines de l'hôte

La capacité de *B. wadsworthia* à utiliser différentes sources de fer présentes chez l'hôte (transferrine, lactoferrine, hémine, hémoglobine) laisse supposer l'existence de mécanismes de captation du fer par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques de haute affinité analogues aux récepteurs identifiés chez d'autres bactéries aérobies-anaérobies facultatives (Wooldridge et Williams, 1993).

Les récepteurs de la transferrine et de la lactoferrine ont été les plus étudiés jusqu'à présent chez les *Neisseria* et *H. influenzae*. Ces récepteurs sont composés de deux protéines différentes de la membrane externe de poids moléculaire variant de 65 à 100 kDa environ situées à la surface bactérienne (Gray-Owen et Schryvers, 1996). Les récepteurs de l'hémoglobine et/ou des complexes hémiques ont été identifiés chez de nombreuses bactéries comme *N. meningitidis* dont le récepteur de l'hémoglobine et du complexe hémoglobine-haptoglobine est constitué de deux protéines différentes: d'une protéine de la membrane externe de 85 kDa et d'une lipoprotéine de 34,8 kDa (Lewis *et al.*, 1997), *H. influenzae* (récepteur de l'hème-hémopexine: HxuA, 100 kDa), *V. cholerae* (récepteur de l'hème: HutA, 78 kDa; Henderson et Payne, 1993), *Y. enterocolitica* (récepteur de

l'hème: HemR, 77 kDa; **Stojiljkovic et Hantke, 1992**), et *Shigella dysenteriae* (ShuA, récepteur de l'hème, 70 kDa, **Mills et Payne, 1997**).

#### 1.1.2.2.2. Récepteurs de sidérophores exogènes

Les protéines de la membrane externe de *B. wadsworthia* exprimées en milieu carencé en fer peuvent être des récepteurs de sidérophores exogènes synthétisés par d'autres bactéries. En effet, les infections anaérobies où est retrouvé *B. wadsworthia* sont souvent polymicrobiennes et associent *B. wadsworthia* à des bactéries anaérobies-facultatives et anaérobies strictes comme le plus souvent *E. coli* ou *B. fragilis* (**Arseze et al., 1997**). *B. fragilis* ne synthétise pas de sidérophores (**Otto et al., 1988**) mais *E. coli* est toujours capable de synthétiser des sidérophores en anaérobiose stricte (**Lodge et Emery, 1984**). D'autre part, *E. coli* possède des récepteurs pour des sidérophores exogènes comme le récepteur du coprogène par exemple (**Guerinot, 1994**). *B. wadsworthia* est susceptible d'utiliser pour sa croissance les mécanismes de captation du fer d'autres bactéries mais aussi de partager ses propres systèmes de capture du fer avec d'autres bactéries. Ces travaux peuvent ainsi permettre en se rapprochant des conditions retrouvées *in vivo* de mieux appréhender la virulence de *B. wadsworthia* et également la virulence et les mécanismes de captation du fer d'autres bactéries associées à *B. wadsworthia*.

La protéine de 190 kDa semble être la meilleure candidate à la fonction de récepteur car celle-ci est située à la surface de la bactérie et est immunogène chez un lapin hyper immunisé. Cette protéine est cependant originale car elle possède un haut poids moléculaire plus élevé que le poids moléculaires des protéines "récepteurs" classiques des complexes du fer identifiées jusqu'à présent chez les bactéries (ne dépassent pas les 120 kDa). La protéine de 88 kDa est ancrée au niveau de la membrane externe sans exposition à la surface de la bactérie et n'est donc certainement pas une protéine avec une fonction de récepteur mais une protéine de l'enveloppe nécessaire au transport du fer libre ou complexé. Nous avons donc décidé de nous intéresser plus particulièrement à cette protéine de 190 kDa car elle est probablement essentielle au transport du fer et participe à la virulence bactérienne.

### 1.1.3. Caractérisation de la protéine de la membrane externe de 190 kDa régulée par le fer

Après purification de la protéine, nous avons décidé d'adopter la stratégie de clonage du gène correspondant en utilisant des oligonucléotides dégénérés déduits d'après la séquence peptidique de la partie amino-terminale de la protéine. Le microséquencage peptidique de la protéine au niveau amino-terminal n'a pas abouti car la protéine est certainement bloquée dans sa région amino-terminale. La protéine a alors été digérée par l'endoprotéinase Lys-C et les deux fragments générés par la coupure enzymatique ont été séparés par chromatographie en HPLC et séquencés. Ces deux fragments nous ont permis d'obtenir deux séquences peptidiques très courtes. Les oligonucléotides déduits de ces séquences peptidiques trop courtes ne nous ont pas permis de cloner le gène correspondant. Il existe à présent d'autres outils plus performants, dont l'utilisation a été rendue plus simple, pour cloner les gènes qui codent des protéines régulées par le fer, par exemple, chez *B. wadsworthia* comme l'hybridation soustractive de l'expression différentielle des gènes bactériens et la technique d'"ADNc display" (RAP-PCR) différentielle (Sagerstrom *et al.*, 1997; Quinn *et al.*, 1997).

#### 1.1.3.1. Technique d'hybridation soustractive

L'hybridation soustractive basée sur l'ARN a été développée spécifiquement dans le but d'identifier des gènes eucaryotes et procaryotes qui sont exprimés de façon différentielle dans des conditions définies (Figure 1). On aurait pu adapter cette méthode à l'identification des gènes exprimés chez *B. wadsworthia* dans des conditions de carence en fer et ainsi identifier entre autre le gène qui code la protéine de 190 kDa. L'ARN de la souche positive (souche avec le phénotype d'intérêt, comme la virulence dans l'exemple illustré sur la figure 1) et de la souche négative (souche sans la virulence dans notre exemple) est extrait. L'ARN est ensuite rétrotranscrit en ADNc et on hybride les molécules

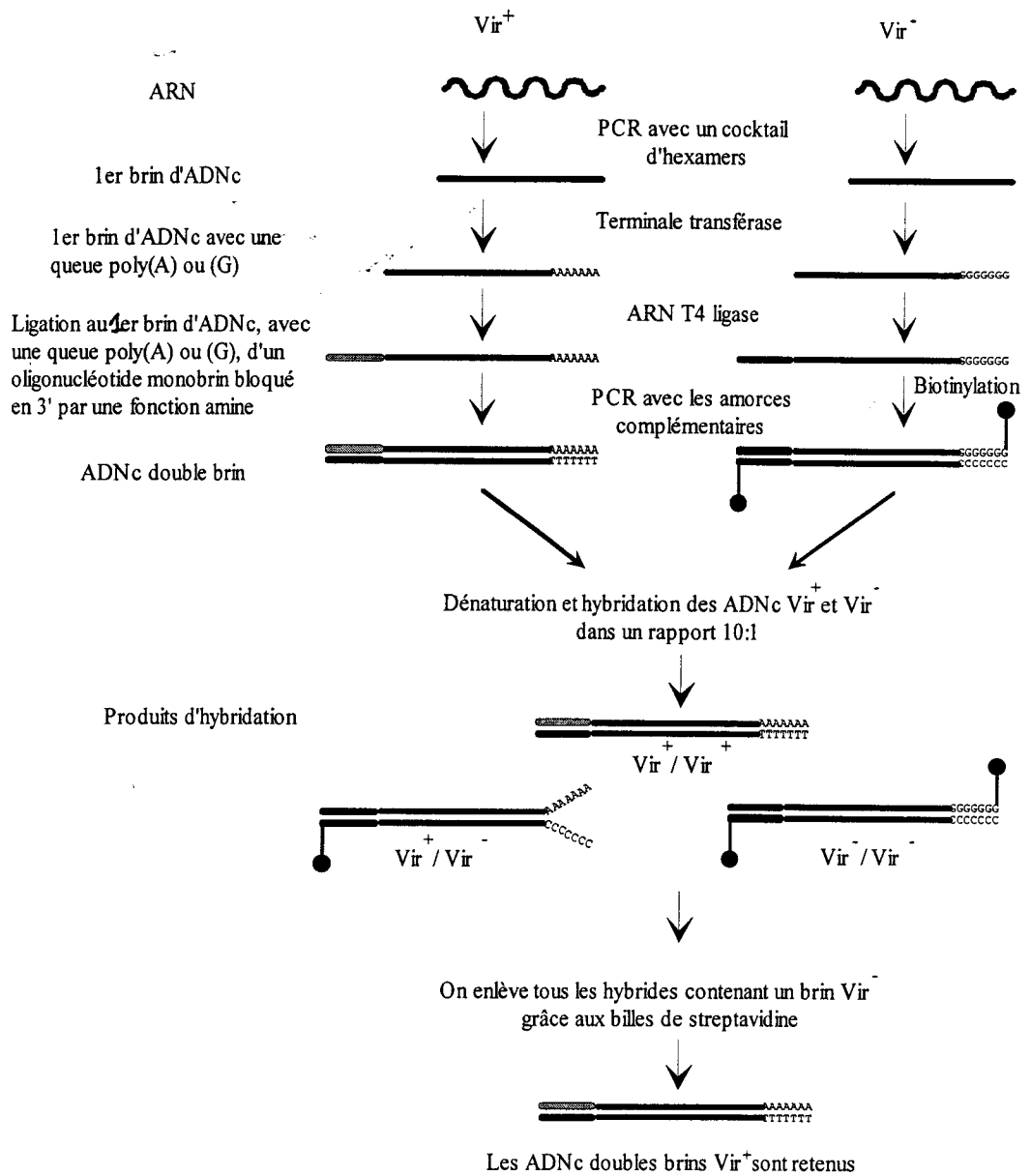
d'ADNc des deux souches. Les molécules d'ADNc de la souche positive qui restent contiennent les gènes d'intérêt exprimés de manière différentielle.

#### 1.1.3.2. Technique de RAP-PCR

La technique de RAP-PCR ("random arbitrary-primed polymerase chain reaction") est une modification de la technique classique de la PCR. Contrairement à la technique de PCR classique où les conditions sont optimisées pour amplifier un seul fragment cible, les conditions de stringence dans la technique de RAP-PCR sont modifiées pour amplifier simultanément une multitude de fragments. La technique de "RAP-PCR" différentielle est basée sur l'amorçage aléatoire et a été utilisée récemment pour identifier des différences d'expression génique entre deux populations de cellules (Kwaik et Pederson, 1997) (Figure 2).

#### 1.1.4. Conclusion

Il est nécessaire, après avoir étudié l'adaptation de *B. wadsworthia* *in vitro*, d'étudier la signification de ces résultats *in vivo* dans la niche écologique de *B. wadsworthia*. Nous avons montré que la protéine de 190 kDa est immunogène chez un lapin hyperimmunisé mais il sera nécessaire de montrer que cette protéine est immunogène *in vivo* dans le sérum de patients atteints d'infections où est retrouvé *B. wadsworthia*. Ces résultats acquis *in vitro* sont ils significatifs *in vivo* ?



**Figure 1:** Représentation schématique de la méthode d'hybridation soustractive de l'expression différentielle de gènes bactériens (Quinn *et al.*, 1997).



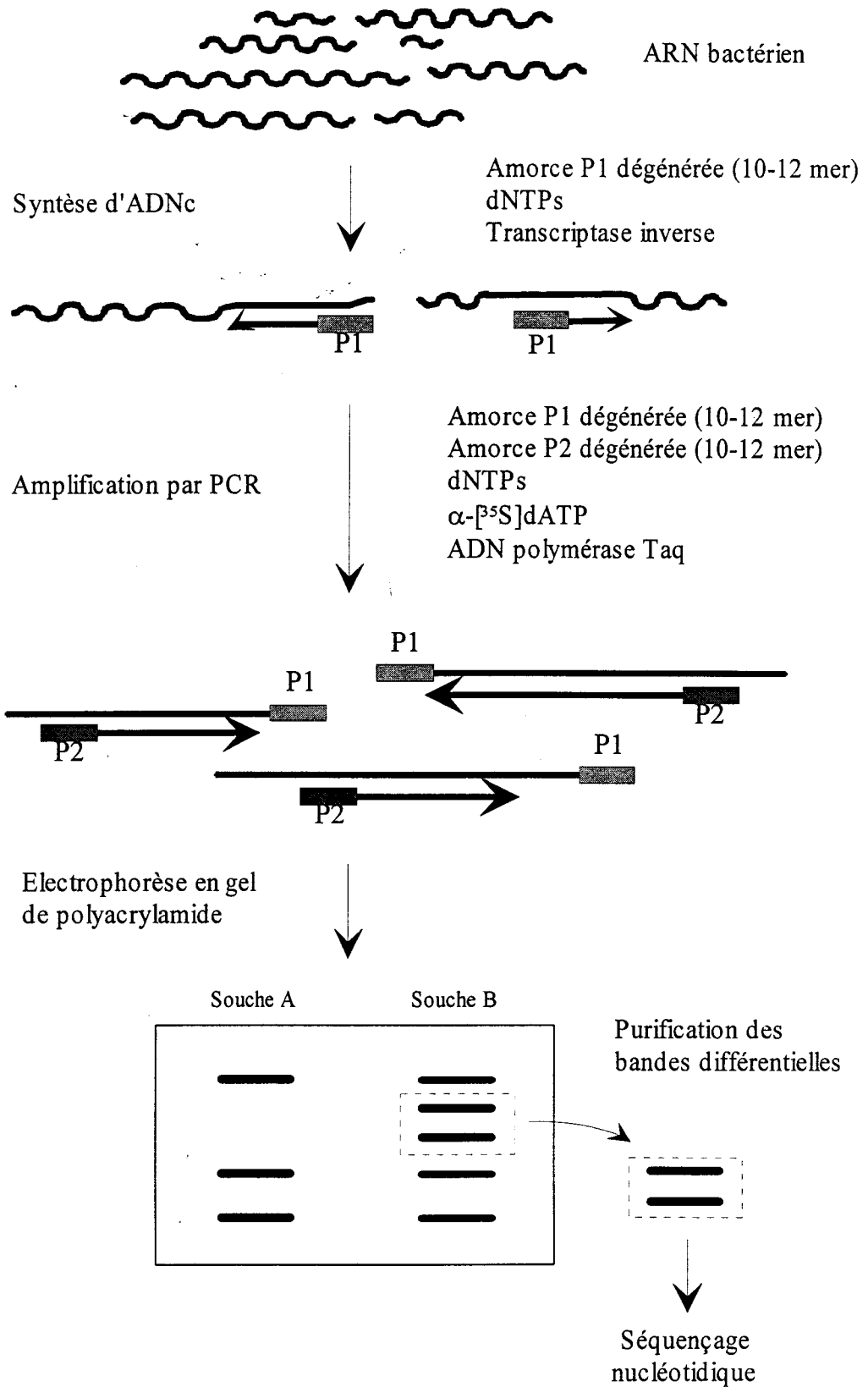


Figure 2: Représentation schématique de la technique d'«ADN-c display (RAP-PCR)» (Quinn *et al.*, 1997)

## 1.2. *A. baumannii*

Peu d'études ont été effectuées sur l'adaptation de *A. baumannii* dans des conditions de carence martiale. Il est cependant important de comprendre comment *A. baumannii* s'adapte à des conditions de carence en fer afin d'évaluer sa capacité de survivre et d'entraîner des infections chez l'homme. Nous avons décrit pour la première fois la cinétique de l'activité sidérophore et de la production des protéines régulées par le fer. De plus, ce travail décrit pour la première fois des protéines de la membrane externe dont l'expression est induite par le fer et des protéines cytoplasmiques régulées par le fer.

*A. baumannii* s'adapte dans des conditions de carence martiale en synthétisant des sidérophores et en exprimant simultanément au niveau de sa membrane externe deux protéines de 75 kDa et 80 kDa. Ces deux protéines sont susceptibles de jouer un rôle important comme composés de la membrane cellulaire qui reconnaissent et internalisent les complexes sidérophore-Fe<sup>3+</sup>. L'expression d'un tel système de captation du fer par l'intermédiaire de sidérophores représente un avantage pour la bactérie en lui permettant de rentrer en compétition avec les protéines de l'hôte (comme la transferrine, par exemple) dans l'acquisition du fer et pourrait donc être un facteur de virulence important chez *A. baumannii*.

*A. baumannii* produit-il un ou plusieurs types de sidérophores ? Il est probable que *A. baumannii* produise plusieurs types de sidérophores. *E. coli*, par exemple, synthétise deux types de sidérophores, l'aérobactine et l'entérochéline. *P. aeruginosa* produit également deux types de sidérophores, la pyoverdine et la pyochéline (Guerinot, 1994). De plus, le sidérophore acinéto-bactine, identifié par Yamamoto *et al.* chez *A. baumannii* est clairement différent de celui isolé par Echenique *et al.* (Echenique *et al.*, 1992). Seules 4 souches parmi les 12 souches étudiées par Yamamoto *et al.*, produisent de l'acinéto-bactine suggérant ainsi une variation de souche à souche dans la capacité de produire un sidérophore particulier. Par contre, les 8 autres souches qui ne produisent pas l'acinéto-bactine ont une bonne croissance dans des conditions de carence en fer. Ceci laisse

supposer la production de plusieurs types de sidérophores chez *A. baumannii* (Yamamoto *et al.*, 1994). Parce que la résistance multiple de *A. baumannii* aux antibiotiques est un véritable problème de santé, on peut maintenant envisager de caractériser de façon plus complète la structure chimique du ou des sidérophores. En effet, il a été montré chez *P. aeruginosa* qu'un sidérophore couplé à une  $\beta$ -lactamine peut être utilisé. La protéine Cir impliquée dans le transport du sidérophore joue le rôle de voie d'introduction (Ward *et al.*, 1996).

Il est maintenant nécessaire de comprendre les mécanismes de captation du fer mis en oeuvre par l'intermédiaire des sidérophores au niveau moléculaire en précisant le rôle exact des deux protéines de la membrane externe de 75 kDa et 80 kDa. Les protéines de 75 kDa et 80 kDa sont-ils les récepteurs du ou des sidérophores produits par *A. baumannii* ? Ces deux protéines de 75 kDa et 80 kDa ont un poids moléculaire très similaire à celui des récepteurs de sidérophores d'*E. coli* FepA (81 kDa), IutA (77 kDa), FhuA (78 kDa), et FhuE (76 kDa) (voir Généralités §2.2.3.1.) (Guerinot, 1994). Ainsi la connaissance plus approfondie du métabolisme du fer chez *A. baumannii* pourrait servir à mieux maîtriser l'infection à *A. baumannii*.

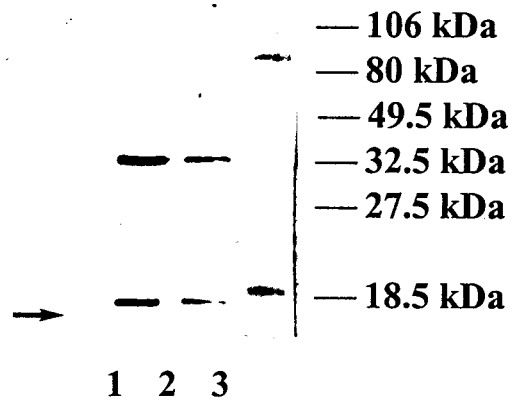
## **2. REGULATION DES MECANISMES DE CAPTATION DU FER**

Nous avons montré que *B. wadsworthia* s'adapte à des conditions de carence martiale en exprimant des protéines de la membrane externe spécifiques. *B. wadsworthia* est capable d'utiliser des sources de fer présentes chez l'hôte comme la lactoferrine, la transferrine, l'hémine et l'hémoglobine. De plus, nous avons montré que *A. baumannii* s'adapte à des conditions de carence martiale en synthétisant des sidérophores et en exprimant des protéines de la membrane externe et des protéines cytoplasmiques spécifiques. Dans tous les cas, le fer semble jouer un rôle primordial dans la régulation des système de captation du fer. Nous avons recherché l'existence d'une protéine Fur-like chez

*B. wadsworthia* et *A. baumannii*, analogue à celle décrite jusqu'à présent chez les bactéries aérobies et anaérobies facultatives.

## 2.1. Recherche d'un gène *fur* homologue chez les bactéries anaérobies strictes

Chez les bactéries anaérobies strictes, aucun gène homologue au gène *fur* identifié chez les bactéries aérobies et anaérobies facultatives n'a été identifié jusqu'à présent. Un immunoblot réalisé entre les protéines cytoplasmiques de *B. wadsworthia* et le sérum polyclonal de lapin dirigé contre la protéine Fur de *E. coli* a révélé une faible immunoréactivité entre le sérum polyclonal de lapin et plusieurs protéines cytoplasmique dont une de taille attendue de 16-17 kDa (Fig. 3). Ce résultat nous a conduit à émettre avec beaucoup de précaution l'hypothèse de l'existence d'une protéine Fur chez *B. wadsworthia*. Cette protéine de 16-17 kDa identifiée est-elle la protéine Fur de *B. wadsworthia* ? Y-a-t-il une protéine Fur chez *B. wadsworthia* ? Chez *P. gingivalis*, Genco a identifié en 1994 une pseudo-protéine Fur par des immunoblots (Genco, 1995) mais aucun gène *fur* chez *P. gingivalis* n'a jusqu'à présent été rapporté. Cependant une séquence homologue à la séquence consensus "Fur box" de *E. coli* a été identifiée en amont du gène *hupA*, gène codant une protéine qui fixe l'hémine chez *B. fragilis* (Otto *et al.*, 1996) et en amont du gène *hemR*, gène codant une protéine régulée par l'hémine chez *P. gingivalis* (Karunakaran *et al.*, 1997). Ces résultats suggèrent l'existence d'une protéine Fur chez *B. fragilis* et *P. gingivalis*. Afin de cloner le putatif gène *fur* de *B. wadsworthia*, l'utilisation des oligonucléotides dégénérés que nous avons déterminés ne s'est pas révélée concluante. En effet, la séquence peptidique de la protéine Fur de *B. wadsworthia*, si elle existe chez cette bactérie, est probablement peu similaire aux autres séquences peptidiques Fur répertoriées jusqu'à présent. Achenbach *et al.* ont montré que la protéine Fur est soumise à des contraintes de sélection et, en tant que marqueur de l'évolution, peut être utilisée pour refléter la phylogénie des organismes (Achenbach *et al.*, 1997). Le genre *Bilophila*, dans la phylogénie, se situe dans la subdivision  $\delta$  des bactéries pourpres entre deux espèces de *Desulfovibrio* (Sapico *et al.*, 1994). Aucun gène *fur* de bactéries appartenant à la subdivision  $\delta$  des bactéries pourpres n'a jusqu'à présent été rapporté.



**Figure 3:** Immunoblot des protéines cytoplasmiques de *B. wadsworthia* 8144 cultivé pendant 6 jours en présence de fer (piste 1) et dans des conditions de carence en fer (piste 2) avec le sérum polyclonal de lapin anti-Fur de *E. coli*; piste 3: marqueurs de poids moléculaires en kDa.

## 2.2. Identification et analyse de la séquence du gène *fur* homologue chez *A. baumannii*

Dans ces travaux, nous avons décrit pour la première fois l'existence d'un gène *fur* chez une souche *Acinetobacter*. Le clonage, l'analyse de la séquence du gène *fur* et des régions flanquantes de *A. baumannii* facilitera des études plus approfondies sur le rôle essentiel de l'acquisition du fer dans la virulence de *A. baumannii*. Nos analyses sur un très grand nombre de séquences Fur de bactéries différentes disponibles dans la Genbank<sup>TM</sup>/EBI Data Bank, ont confirmé que la protéine Fur de *A. baumannii* ainsi que les autres protéines Fur possèdent trois motifs très conservés, décrits par Achenbach *et al.*, potentiellement requis pour la fonction de la protéine Fur, fixation à l'ADN et fixation à un métal (Achenbach *et al.*, 1997). De plus, nos analyses montrent que le motif His-His-X-His-X2-Cys-X2-Cys, proposé par Hennecke comme étant impliqué directement dans la fixation du fer ferreux (Hennecke, 1990), est le plus conservé parmi les différentes séquences Fur jusqu'à présent disponibles dans la Genbank<sup>TM</sup>/EBI Data Bank. La protéine Fur de *A. baumannii* possède ce motif riche en histidines et cystéines. Ces travaux sont une première étape indispensable dans l'étude de la régulation des mécanismes de captation du fer chez *A. baumannii*.

L'expression de la protéine Fur de *A. baumannii* semble indépendante de la concentration en fer comme cela a déjà été suggéré pour les autres protéines Fur identifiées jusqu'à présent chez les bactéries aérobies et anaérobies facultatives pathogènes (Crosa, 1997). Il est important d'essayer de faire le lien entre le(s) système(s) de captation du fer développé(s) par *A. baumannii* et la protéine régulatrice Fur. La protéine Fur régule-t-elle l'expression des systèmes de captation du fer par l'intermédiaire des sidérophores ? Ces mécanismes jouent-ils un rôle dans la virulence bactérienne ? Il est très probable que la protéine Fur identifiée chez *A. baumannii* régule, de manière analogue aux autres systèmes bactériens comme celui de *E. coli* par exemple (Guerinot, 1994), le(s) système(s) de captation du fer par l'intermédiaire des sidérophores et ainsi la virulence bactérienne. Il

sera nécessaire de cloner le ou les gène(s) qui codent les composants de la membrane cellulaire qui reconnaissent et internalisent les complexes  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophores.

### 2.3. Similarités de séquence avec la protéine PilU de *P. aeruginosa*

La séquence peptidique déduite de la région 3' flanquant le gène *fur* de *A. baumannii* montre de nombreuses similarités avec la protéine PilU de *P. aeruginosa* (Whitchurch et Mattick, 1994). Le gène *pilU* chez *P. aeruginosa* code une protéine de 38 kDa impliquée dans la synthèse des pili de type IV. Ces pili permettent l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales et sont associées avec une forme de translocation de surface nommée "twitching motility" (Alm et Mattick, 1997). La protéine PilU fait partie de la famille des protéines qui sont capables de fixer des nucléotides et cette protéine est impliquée dans le "twitching motility". Jusqu'à présent, 30 gènes impliqués dans la synthèse des pili de type IV ont été identifiés chez *P. aeruginosa* (Alm et Mattick, 1997). Certains de ces gènes ont été retrouvés chez d'autres bactéries comme chez les *Neisseria* (Lauer *et al.*, 1993; Tonjum *et al.*, 1995). De plus, le pili de type IV est le principal facteur d'adhésion chez *P. aeruginosa* et semble être l'adhésine majeure associée à la virulence de *P. aeruginosa* chez la souris (Hahn, 1997). Ce mécanisme de "twitching motility" a déjà été décrit chez une souche *Acinetobacter*, *A. calcoaceticus*, bactérie capable de se transformer naturellement et possédant des pili de type IV (Henrichsen, 1984; Palmen et Hellingwerf, 1997). Il est donc très probable que *A. baumannii* possède une protéine fonctionnelle de type pilU analogue à la protéine pilU de *P. aeruginosa*. Les pili de type IV pourraient-ils être des facteurs de virulence chez *A. baumannii* ?

L'ensemble des résultats présentés nous permettent d'entreprendre l'identification des gènes régulés par la protéine Fur chez *A. baumannii* qui interviennent dans les mécanismes de captation du fer et la virulence de *A. baumannii*.

# Appendice technique

---

---



## APPENDICE TECHNIQUE

### 1. CROISSANCE ET ADAPTATION DES BACTERIES EN MILIEU CARENCE EN FER

#### 1.1. Souches bactériennes et conditions de culture

##### 1.1.1. *Bilophila wadsworthia*

Quatre souches de *Bilophila wadsworthia* sont étudiées. Ces souches ont été isolées de patients atteints d'appendicites gangrénées et perforées. Elles sont dénommées comme suit: WAL8144, WAL9128, WAL8868. La quatrième souche est la souche de référence ATCC 49260 (ou WAL7959). Les souches ont été conservées à -80°C dans du sang de mouton supplémenté à partie égale avec du glycérol. Elles ont étéensemencées en milieu liquide (voir §1.2.) à partir d'un isolement sur gélose Columbia additionnée de 5% de sang de cheval, supplémentée en oxgall (2%), sodium pyruvate (1%), hémine (0,5%), et phytoménadione (0,1%). Les bactéries ont été mises en culture sans agitation dans des conditions d'anaérobiose stricte à 37°C jusqu'en fin de phase exponentielle de croissance (8 jours). La croissance bactérienne a été contrôlée chaque jour par dénombrement des bactéries sur le milieu gélosé précédemment décrit. Les cellules bactériennes ont été recueillies par centrifugation (8000xg, 20 min, 4°C); les surnageants de culture ont été stockés à 4°C pour les mesures de sidérophores.

### 1.1.2. *Acinetobacter baumannii*

La souche *A. baumannii* BM2580 utilisée dans notre étude a été isolée initialement dans un prélèvement d'urine d'un patient au cours d'une épidémie nosocomiale (Lambert, 1988). La souche a été conservée à -80°C dans du sang de mouton supplémenté à partie égale par du glycérol. Cette souche a été ensemencée en milieu liquide (voir §1.2.) à partir d'un isolement effectué sur gélosé BCP (Bromocrésol pourpre) et incubée à 37°C en agitation constante et en aérobose stricte. La croissance a été contrôlée par des mesures de densité optique à 600 nm et par dénombrement des bactéries sur le milieu gélosé BCP. Les cellules bactériennes ont été recueillies par centrifugation (8000g, 20 min, 4°C); les surnageants de culture ont été stockés à 4°C pour les mesures de sidérophores.

## 1.2. Milieu de culture carencé en fer

Toute la verrerie a été traitée dans le but d'éliminer les traces de fer selon le processus décrit ci-après:

- immersion pendant 24 heures dans un détergent à 5% (RBS-25, Traitement Chimique de Surface, Frelinghien), 6 rinçages à l'eau ultra pure (Milli Q, Millipore),
- immersion pendant 24 heures dans de l'EDTA à 0,01% (Prolabo) suivi de 6 rinçages à l'eau ultra pure.

Tous les produits utilisés étaient de qualité ultra pure. *A. baumannii* a été cultivé dans le milieu de culture suivant:

- Solution de base:  $C_5H_8NO_4Na$ : 59mM;  $Na_2HPO_4$ : 12mM; NaCl: 69mM;  $NH_4Cl$ : 9,3mM;  $KH_2PO_4$ : 7,3mM
- $MgSO_4$ : 2,8mM
- Solution d'acides aminés (concentration en mg/ml): acide L-glutamique: 1,2; acide L-aspartique: 1,2; L-tyrosine: 0,1; L-tryptophane: 0,03; L-cystine: 0,12; L-isoleucine: 0,3; L-valine: 0,24; L-méthionine: 0,09, L-phénylalanine: 0,1; L-leucine: 0,3;

L-glycine: 1,2; L-alanine: 1,2; L-proline: 1,2; L-lysine: 0,3; L-histidine: 0,24; L-arginine: 0,360; L-thréonine: 2,4; L-sérine: 2,4

- Solution de vitamines (concentration en  $\mu\text{g/ml}$ ): acide nicotinique: 0,5; Calcium-D(+)-panthoténate: 0,5; thiamine: 0,5; biotine: 0,003; phytoménadione: 100

- Solution d'oligo-éléments:  $\text{CaCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ :  $0,5\mu\text{M}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_4(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7)$ :  $0,5\mu\text{M}$ ;  $\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ :  $0,05\mu\text{M}$ ;  $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ :  $0,05\mu\text{M}$ ;  $\text{ZnSO}_7, \text{H}_2\text{O}$ :  $0,05\mu\text{M}$ ;  $\text{MnSO}_4$ :  $0,1\mu\text{M}$ ;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4\text{H}_2\text{O}$ :  $0,005\mu\text{M}$

Le milieu de culture chimiquement défini carencé en fer (MCD-Fe) a été obtenu après 6 passages des différents composés sur résines Chelex-100 (Bio-Rad Laboratories) afin de diminuer la quantité de fer libre. La solution de base, une partie de la solution d'acides aminés (Glu, Asp, Tyr, Trp, Cys), ont été traitées avec ces résines. Le pH de la solution reconstituée a été ajusté à 7,0. Le milieu chimiquement défini avec fer (MCD+Fe) a été réalisé à partir du milieu précédent auquel a été ajouté du  $\text{FeSO}_4$  afin d'obtenir une concentration finale de  $100\mu\text{M}$ . Un dosage de fer libre a été réalisé par spectrométrie d'absorption atomique (Varian, modèle Spectra AA30). Le milieu sans fer contenait moins de  $0,04\mu\text{M}$  de fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ).

Le milieu de culture carencé en fer utilisé pour *B. wadsworthia* a été réalisé à partir du précédent auquel a été ajouté:

- du pyruvate de sodium (oxid): concentration finale 10mM
- Oxgall: 2%.

Les deux solutions de pyruvate de sodium et d'oxgall ont été traitées avec des résines Chelex-100 pour diminuer la quantité de fer libre. Le milieu avec fer a été réalisé à partir du milieu précédent auquel a été ajouté du  $\text{FeSO}_4$  afin d'obtenir une concentration finale de  $100\mu\text{M}$ .

### 1.3. Détection des sidérophores

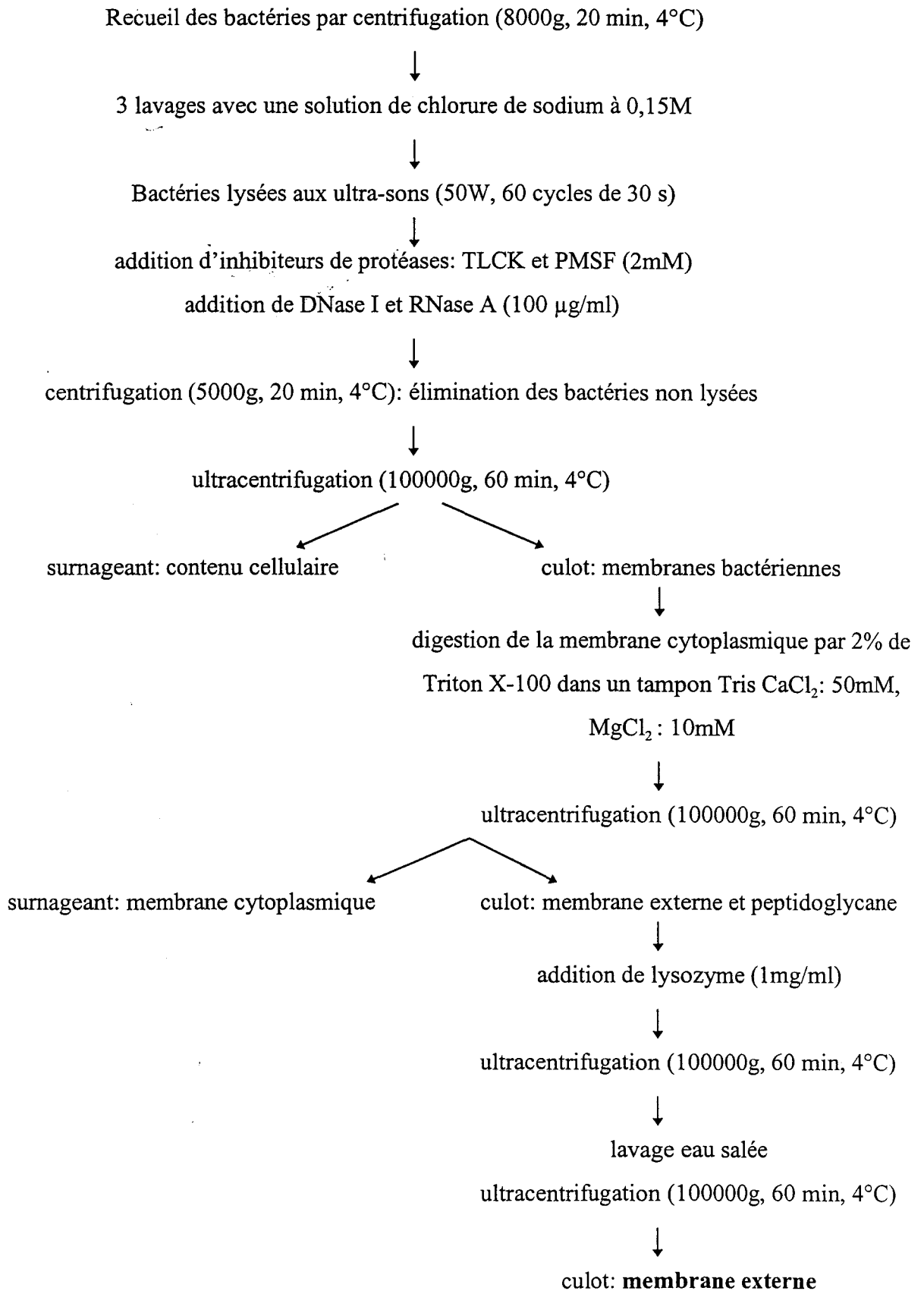
La détection des sidérophores a été réalisée selon la méthode de Schwyn et Neilands au chrome azurol S avec les surnageants de culture obtenus par centrifugation à 8000g (Schwyn et Neilands, 1987). Le complexe fer-chrome azurol présente un maximum d'absorption à 630 nm. En présence de sidérophore, on observe une diminution de cette absorbance par déplacement du fer du chrome azurol vers le sidérophore. Le maximum d'absorption (100%) est obtenu en absence de sidérophore. Les dosages doivent rester supérieurs à 50% pour être dans la limite de linéarité. Une courbe standard a été réalisée avec des dilutions de Desféral (Ciba-Geigy), qui est un chélateur du fer, dans de l'eau bidistillée incubées pendant 1 heure avec le réactif de Schwyn et Neilands au chrome azurol S (Hexadecyltriméthylammonium bromide 10mM; FeCl<sub>3</sub> 1mM; chrome azurol S 2mM; pipérazine anhydre 4%; acide 5-sulfosalicyclique 4mM). Les concentrations standard de Desféral ont été préparées dans la gamme 2.5µM à 20µM. Les résultats ont été exprimés en équivalents d'activité Desféral en µM en se référant à la courbe standard.

### 1.4. Préparation des protéines de la membrane externe

#### 1.4.1. Protocole d'extraction

La membrane externe des bactéries a été extraite selon le protocole de Sprott *et al* (Sprott *et al.*, 1994). Le principe repose sur la lyse des bactéries suivie d'une ultracentrifugation pour séparer le constituant cellulaire des membranes bactériennes; la membrane cytoplasmique a été digérée par le Triton X-100 et le peptidoglycane a été ensuite séparé de la membrane externe par le lysozyme (Figure 1).

Le Triton X-100 qui a permis la digestion de la membrane cytoplasmique a été en grande partie éliminé par précipitation à l'éthanol absolu froid et les protéines ont été collectées par centrifugation.



**Figure 1: Extraction des protéines la membrane externe selon la méthode de Sprott *et al.* (Sprott *et al.*, 1994)**

### 1.4.2. Exposition des cellules à la protéinase K

Afin d'identifier les protéines de la membrane externe qui sont situées au niveau de la surface bactérienne, les cellules entières ont été mises en contact avec la protéinase K avant l'extraction de leur membrane externe. Les cellules entières ont été suspendues dans un tampon (10mM Tris-HCl pH 8,0; NaCl 2%; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mg/ml de protéinase K) et incubées à 37°C pendant 1 heure. Après une centrifugation (10000g, 20 min, 4°C), les cellules traitées à la protéinase K ont été lavées dans le tampon de lavage (10mM Tris-HCl pH 8,0; NaCl 2%; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 2mM PMSF). Les cellules ont été ensuite cassées aux ultra-sons dans le but d'extraire leur membrane externe. Seules les protéines exposées en surface ont été digérées par la protéinase K et sont ainsi absentes de la membrane externe.

## 1.5. Etude des protéines

### 1.5.1. Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de Lowry (**Lowry *et al.*, 1951**). Cette méthode repose sur la quantification, par la mesure de l'absorbance à 660 nm de la couleur obtenue par réaction du réactif de Folin sur les résidus tyrosyls de la protéine dont on veut connaître la concentration. Une courbe standard a été réalisée avec des dilutions de SAB dans de l'eau bidistillée incubées 30 min avec le réactif de Biuret (Carbonate de sodium 4%; tartrate de sodium et de potassium 0,02%; sulfate de cuivre 0,02%; NaOH 0,1N qsp 100 ml) puis 15 min avec le réactif de Folin à l'obscurité.

### 1.5.2. PAGE-SDS

Les protéines ont été séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide avec du sodium dodécyl sulfate (PAGE-SDS) et avec un gel de concentration à 5% d'acrylamide et

un gel de séparation à 8 ou 11% d'acrylamide (Bioprobe Systems). Les échantillons ont été mélangés à volume égal avec une solution dénaturante (SDS 1%, Tris 0,5%,  $\beta$ -mercapto-éthanolamine, glycérol 10%, bleu de bromophénol 5%) puis chauffés 5 min à 100°C. Les électrophorèses ont été réalisées dans un tampon Tris 1,5%, glycine 7,2%, SDS 0,5%, à température ambiante et à voltage constant (200 volts). Les gels ont été ensuite fixés et colorés dans une solution de bleu de Coomassie (acide acétique 10%, bleu de Coomassie 0,02%). Les gels ont été décolorés dans une solution de décoloration (acide acétique 10%, eau 90%).

Trois types de marqueurs de poids moléculaires ont été utilisés :

- phosphorylase b (94 kDa), SAB (67 kDa), ovalbumine (43 kDa), anhydrase carbonique (30 kDa), inhibiteur de trypsine (20,1 kDa), et  $\alpha$ -lactalbumine (14,4 kDa) (Pharmacia).
- myosine (205 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97,4 kDa), SAB (66 kDa), ovalbumine (45 kDa), anhydrase carbonique (29 kDa) (Sigma).
- marqueurs de poids moléculaire pré-colorés (Bio-Rad): phosphorylase b (106 kDa), SAB (80 kDa), ovalbumine (49,5 kDa), anhydrase carbonique (32,5 kDa), inhibiteur de trypsine (27,5 kDa), lysozyme (8,5 kDa).

## 1.6. Western blots

### 1.6.1. Réalisation d'un sérum polyclonal de lapin anti-*B. wadsworthia*

Un lapin de race HY/CR (Charles Rivers-France) a été immunisé avec des bactéries entières de *B. wadsworthia* tuées par l'oxygène de l'air. Les bactéries injectées ont été cultivées dans le milieu carencé en fer. Le lapin a reçu une dose d'un milliard de bactéries émulsionnées dans 1 ml d'adjuvant incomplet de Freund (Difco Laboratories). Cette suspension a été inoculée par voie intradermique selon la technique de Vaitukaitis *et al.* à raison de 3 injections à 3 semaines d'intervalle (Vaitukaitis *et al*, 1971). Cinq saignées de 5 ml de sang environ ont été réalisées: avant inoculation, à 3 semaines, à 6 semaines, à 9



semaines et à 12 semaines après l'inoculation. A partir de prélèvements de sang du lapin, le sérum a été séparé des hématies par centrifugation (3000g, 10 min, 4°C) et a été utilisé pour réaliser des immunoblots sur les protéines de la membrane externe de *B. wadsworthia*.

### 1.6.2. Immunoblot

Les protéines séparées en PAGE-SDS ont été transférées dans un tampon (Tris 0,3%, glycine 1,3%, méthanol 20%) par électro-transfert sur une membrane de nitrocellulose (Amersham). La membrane a été ensuite saturée une nuit dans un tampon de saturation ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,01M; NaCl 0,15M; lait écrémé 5%; Tween<sup>®</sup>-20 0,3% pH 7,2 ). La membrane a été ensuite mise en contact avec le sérum à tester dans le tampon de saturation pendant 1 heure sous agitation douce. Deux types de sérum différents ont été utilisés dans le travail:

- un sérum polyclonal de lapin anti-*B. wadsworthia* (voir §1.6.1.) dilué au 1/300 ou au 1/500,
- un sérum polyclonal de lapin dirigé contre la protéine Fur d'*E. coli* dilué au 1/500.

Après trois lavages dans le tampon de saturation, un anticorps de chèvre anti-lapin (dilué au 1/5000) (Bio-Rad), marqué à la peroxydase, a été mis en contact avec la membrane pendant 1 heure sous agitation douce. Après trois nouveaux lavages dans le tampon de saturation, les bandes ont été visualisées par action du 3,3'-diaminobenzidine tétrachlorhydrate (Sigma).

### 1.7. Purification de la protéine de *B. wadsworthia*

Une électrophorèse préparative en PAGE-SDS a été réalisée pour séparer la protéine de haut poids moléculaire (190 kDa) des autres protéines de la membrane externe de *B. wadsworthia* exprimées dans des conditions de carence en fer. Après coloration du gel au bleu de Coomassie, la bande colorée correspondant à la protéine étudiée a été découpée au scalpel. La protéine colorée a ensuite été électro-éluée du gel dans un tampon Tris (1,5%)-

glycocolle (7,2%)-SDS (0,5%) à 4°C pendant 2 heures à un courant constant de 20 mA. Afin de vérifier la pureté de la protéine éluée, une nouvelle électrophorèse et un immunoblot ont été réalisés.

La protéine électro-éluée a été ensuite lyophilisée. A ce stade, la protéine est toujours complexée au SDS. Le complexe protéine-SDS lyophilisé a été dissout directement dans un solvant acétone anhydre/triéthylamine/acide acétique/eau (85/5/5/5/5; v/v/v/v). La protéine a été précipitée puis séparée du solvant par centrifugation. A ce stade, la protéine était libérée d'une grande partie du SDS.

### 1.8. Préparation de la protéine de 190 kDa au microséquençage

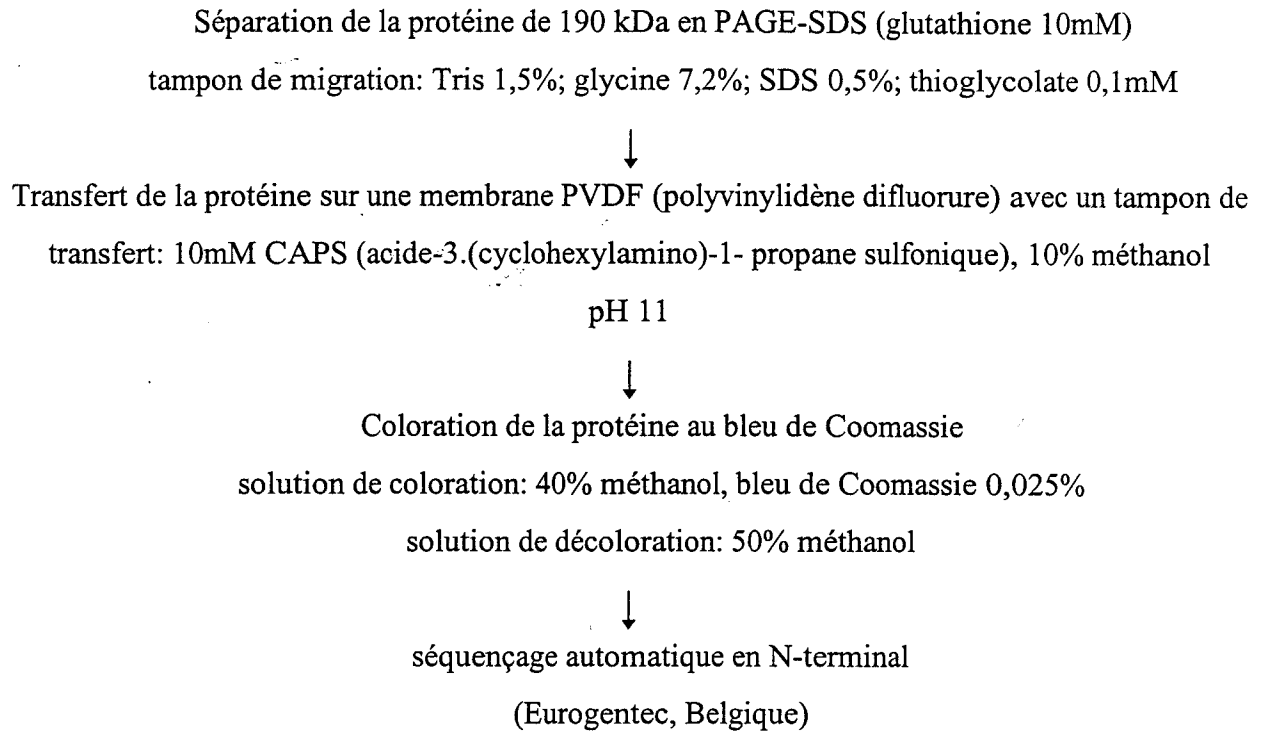
Deux paramètres importants ont été pris en compte avant la réalisation du microséquençage des acides aminés de la protéine de 190 kDa:

- la protection de la protéine contre des modifications chimiques pendant les étapes d'électrophorèse et de visualisation de la protéine (par coloration) qui peuvent induire un blocage de la protéine au niveau N-terminal

- l'efficacité du transfert de la protéine à une matrice (**Simpson *et al.*, 1989**).

Afin d'optimiser ces deux paramètres, nous avons utilisé des produits de qualité ultra-pure. Toutes les solutions utilisées ont été également filtrées sur un filtre de 0,45 micron. En raison de la production d'agents oxydants pendant l'électrophorèse (réaction avec des acides aminés) deux anti-oxydants, le thioglycolate et le glutathion ont été utilisés durant l'électrophorèse. L'immobilisation de la protéine a été réalisée sur membrane hydrophobe (PVDF en présence de tampon CAPS) (**Matsudaira, 1987**). La préparation de la protéine au microséquençage est illustrée sur la figure 2.

Le microséquençage automatique en acides aminés de la protéine de 190 kDa de *B. wadsworthia* a été réalisé chez Eurogentec (Belgique).



**Figure 2: Préparation de la protéine de 190 kDa de *B. wadsworthia* pour le microséquencage**

## **2. CLONAGE**

### **2.1. Purification de l'ADN génomique**

(Wizard™ Genomic DNA Purification-kit; Promega)

#### **2.1.1. Lyse bactérienne**

5 ml de culture ont été centrifugés 5 min à 5000 tours/min. Le surnageant a été éliminé. Les bactéries ont été lysées dans 600µl de solution de «lyse» (NaOH 0,2M; SDS 1%; RNase A 100 µg/ml).

#### **2.1.2. Précipitation des protéines cellulaires**

Les protéines cellulaires ont été précipitées dans le lysat cellulaire par la solution de «précipitation» fournie dans le kit. Le mélange a été centrifugé 3 min à 16000g; le surnageant contenant l'ADN génomique a été récupéré.

#### **2.1.3. Précipitation de l'ADN**

L'ADN génomique a été précipité dans de l'isopropanol (70%). Il a été récupéré après une centrifugation de 2 min à 16000g. Le culot d'ADN génomique a été lavé avec de l'éthanol à 70% puis récupéré par une centrifugation supplémentaire de 2 min à 16000g. L'ADN a été réhydraté avec 100µl de tampon TE à 65°C pendant 1 h.

### **2.1.4. Détermination de la quantité et de la pureté de l'ADN**

Une aliquote a été quantifiée par mesure de l'absorbance à 260 nm. L'absorbance à 260 nm doit être comprise entre 0,1 et 1,0 pour être dans la limite de linéarité sachant qu'une DO de 1,0 à 260 nm équivaut à une concentration de 50 ng/μl d'ADN double brin. La pureté de l'ADN extrait a été déterminée en calculant le rapport de la DO de l'échantillon à 260 nm sur la DO de l'échantillon à 280 nm. L'ADN pur a un rapport compris entre 1,6 à 2,0.

## **2.2. Amplification élective**

### **2.2.1. Principe**

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR pour "Polymerase Chain Reaction") a été mise au point au milieu des années 80 par K. Mullis (prix Nobel de chimie en 1993). Elle utilise un couple d'amorces qui encadre la région que l'on veut amplifier sélectivement, des dNTPs, de l'ADN double brin (ADN génomique, un produit d'amplification ou un vecteur et son insert) et une polymérase thermostable de type Taq Polymérase et son tampon.

### **2.2.2. Les réactifs, le matériel utilisé et généralités**

Nous avons utilisé cette méthode pour amplifier de l'ADN génomique et de l'ADN plasmidique (moins d'un microlitre de solution de préparation de plasmide, voir §2.5.). Les oligonucléotides utilisés avaient une taille comprise entre 14 et 29 nucléotides. Ils ont été synthétisés par Oligo-Express (Paris, France) et ont été utilisés en concentration de 5pmol/μl. Les amorces ont été choisies de façon à ce qu'elles ne puissent pas s'hybrider entre elles et ne puissent pas former d'épingles à cheveux, qu'elles ne contiennent pas de séquences répétées, qu'elles ne puissent pas s'hybrider à plusieurs endroits du matériel à

amplifier. Il est préférable que la composition en bases soit équilibrée (éviter les longues répétitions de GC) et que les températures de fusion ( $T_m$ ) des 2 amorces ne soient pas trop différentes l'une de l'autre. Les réactions de PCR ont été faites sur un volume final de 50  $\mu$ l avec une solution de dNTPs (Boehringer-Mannheim) à 2,5mM chacun (5 à 10  $\mu$ l selon les réactions) dans un thermocycleur Perkin-Elmer 480. Un corollaire indésirable et inattendu de la puissance d'amplification de la PCR est qu'une contamination même mineure du matériel de départ peut être amplifiée. Nous avons donc préparé les réactions dans une pièce réservée à la PCR en utilisant des embouts cotonnés pour les pipettes automatiques. Nous avons aussi fait des témoins négatifs en remplaçant le matériel nucléique par de l'eau. L'enzyme thermostable employée pour les PCR "classiques" est la Taq polymérase à 5U/ $\mu$ l (Boehringer).

Pour chaque réaction nous avons effectué un "hot start", c'est à dire que le tube est placé dans l'appareil PCR alors que sa température est supérieure à 80°C.

Les produits de PCR ont été purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose (voir §2.3.1.).

### 2.2.3. Réactions

Dans un microtube (0,5 ml), on mélange 25 ng d'ADN génomique bactérien, 15 pmoles de chaque amorce, 6 à 8  $\mu$ l de dNTPs, 5  $\mu$ l de tampon 10X fourni (Tris-HCl, 20mM; DTT, 1mM; EDTA, 0,1mM; KCl, 0,1M; Nonidet® P40, 0,5% (v/v); Tween® 20, 0,5% (v/v); glycérol, 50% (v/v), pH 8,0) et de l'eau stérile (qsp 49,5  $\mu$ l). On recouvre le mélange avec 50  $\mu$ l d'huile minérale (Sigma) afin d'éviter l'évaporation. Après un "hot start", on injecte sous l'huile 2,5 unités de Taq polymérase (Boehringer). Après une dénaturation de 2 min à 94°C, on effectue 30 cycles :

95°C: 10 s (dénaturation des brins)

$T_m+2^\circ\text{C}$ : 30 s (hybridation)

72°C: 30 s à 2 min (élongation) selon la taille à amplifier.

On termine par une élongation finale plus longue de 20 min à 72°C.

Les amorces dégénérées tiennent compte de l'existence possible de plusieurs triplets codant pour un même acide aminé. Après une dénaturation de 2 min à 94°C, nous avons effectué 35 cycles:

95°C: 10 s

Tm: 57°C, 40 s ; 47°C, 30 s ; 37°C, 20 s

72°C: 2 min.

On termine par une élongation finale de 20 min à 72°C. Une deuxième amplification a été réalisée sur le produit déjà amplifié (dilué au 1/20). Les cycles d'amplification ont été identiques à ceux utilisés lors de la première amplification.

## **2.3. Clonage des fragments amplifiés**

### **2.3.1. Purification des fragments**

Les produits d'amplification ont été séparés en gel d'agarose 0,8% contenant du BEt (0,5µg/ml), et en tampon TBE pour éviter l'action des DNases. Après repérage sous UV grâce aux marqueurs de tailles, les bandes d'agarose d'intérêt ont été découpées au scalpel. L'ADN a été extrait et purifié à l'aide d'un kit (QIAEX II™ gel extraction kit; Qiagen). L'agarose a été solubilisé en ajoutant trois volumes de tampon QX1 fourni dans le kit et en l'incubant 10 min à 50°C. L'ADN a été ensuite adsorbé sur la matrice de silice ("QIAEX II") pendant 10 min: 10 µl de "QIAEX II" ont été ajoutés à 2 µg d'ADN (ou moins) et à 3 µl de "QIAEX II" supplémentaire par µg d'ADN au delà des 5 µg. Après centrifugation, le culot d'ADN/matrice a été récupéré puis lavé deux fois par des solutions de 500µl de tampon QXI et PE (selon les conditions du fournisseur). Après centrifugation, le culot a été resuspendu dans 5 à 10 µl de tampon TE 1X et placé 2 à 3 min à 50°C. Après 30 sec de centrifugation à 10000g, le surnageant contenant l'ADN a été transféré dans un nouveau tube. Une deuxième élution de l'ADN pouvait être effectuée et permettait d'obtenir 20% de matériel élué supplémentaire. Une partie aliquote a été quantifiée après électrophorèse en gel d'agarose en comparaison avec le marqueur de taille moléculaire « Amplisize™DNA size standard » contenant des fragments d'ADN multiples de 100 pb (Bio-Rad) et le

marqueur de taille « Raoul™ » (Appligene) contenant des fragments d'ADN de 234 pb, 375 pb, 554 pb, 686 pb, 754 pb, 903 pb, 1050 pb, 1255 pb, 1416 pb, 1810 pb, 2319 pb, 2938 pb, 3609 pb, 3988 pb, 4360 pb, 5634 pb, 7378 pb, 9007 pb, 10620 pb, 14980 pb, 18520 pb, et 48502 pb.

### 2.3.2. Clonage en vecteur plasmidique T/A

#### 2.3.2.1. Principe

La Taq DNA Polymérase, comme la plupart des polymérases thermostables, ajoute un nucléotide en 3' des fragments amplifiés, le plus souvent un A. Cette activité d'addition d'un nucléotide semble indépendante de l'information contenue dans le brin copié. Une telle activité catalytique de type terminale transférase a été trouvée pour d'autres polymérases (Clark, 1988). Les T-vecteurs sont pourvus d'un dT non apparié, ce qui permet une ligation facile des fragments de PCR et du vecteur. En pratique, ils peuvent être préparés de la façon suivante: le vecteur de clonage est hydrolysé par une enzyme de restriction à coupure franche (on emploie généralement les enzymes *Sma*I ou *Eco*RV) et on l'incube à 72°C avec une Taq polymérase et du dTTP. Nous avons choisi comme vecteur le plasmide *pMOSBlue* (Amersham) qui a une taille de 2887 pb.

#### 2.3.2.2. Ligation

Un mélange contenant 6,8 µl de produit de PCR purifié, 0,5 µl de DTT 100mM, 0,5 µl d'ATP 10mM, 1 µl de tampon de ligation 10X, 0,7 µl (35 ng) de vecteur T/A (*pMOSBlue* T-vector, Amersham) et 0,5 µl de T4 ADN ligase (2-3 U) a été incubé pendant 2 h à 15°C.



### 2.3.2.3. Transformation

1,5  $\mu$ l du produit de ligation ont été transférés dans un tube de 0,5 ml. 18  $\mu$ l de bactéries compétentes ont été ajoutées. Le contact a été de 20 min dans la glace suivi d'un choc thermique pendant 45 sec à 42°C précisément puis addition de 80  $\mu$ l de SOC (milieu de culture riche). Les bactéries ont été placées dans l'incubateur à 37°C et agitées à 200 tours/min. Après une heure d'agitation, les bactéries ont été étalées sur boîte de LB-agar ampicilline (100  $\mu$ g/ml) et incubées à 37°C pendant une nuit. Seules les bactéries possédant le plasmide étaient résistantes à l'antibiotique (ampicilline) et pouvaient pousser sur la boîte.

### 2.3.2.4. Détection des clones recombinants

Pour sélectionner les plasmides recombinants, nous avons utilisé la méthode X-Gal / IPTG. 30 min avant d'étaler les bactéries, on imprègne les boîtes avec 20  $\mu$ l d'IPTG 0,1M et 35  $\mu$ l d'une solution de X-Gal à 50 mg/ml. Les souches d'*E. coli* utilisées (JM109 [Promega] ou celles fournies avec le vecteur pMOSBlue) possèdent un gène codant pour une  $\beta$ -galactosidase défective, dépourvue des aa 11 à 41 (gène LacZ $\Delta$ M15), utile pour le test de l' $\alpha$ -complémentation. Les vecteurs plasmidiques utilisés au laboratoire possèdent quant à eux, en plus d'un gène de résistance à l'ampicilline, un site de clonage multiple (encore appelé « polylinker ») introduit au début du gène LacZ. Pour mettre en évidence la présence (vecteur reliqué sans insert) ou non (clonage d'un insert dans le gène LacZ) d'une activité  $\beta$ -galactosidase, 2 réactifs sont indispensables: IPTG et X-Gal. L'IPTG est un inducteur par dérégulation de la synthèse de  $\beta$ -galactosidase et le X-Gal est un  $\beta$ -galactoside qui peut être hydrolysé par la  $\beta$ -galactosidase et libérant ainsi, en plus du galactose, une substance colorée en bleu. Finalement, les colonies blanches sont témoins de la présence de recombinants et les bleues d'absence de recombinants.

## 2.4. Sous clonage en vecteur plasmidique pKS

Le vecteur utilisé pour le sous-clonage des fragments d'ADN bactérien a été le phagémide *pBlueScript II KS* (Stratagene) qui a une taille de 2961 pb.

### 2.4.1. Hydrolyse du vecteur

Le vecteur a été tout d'abord clivé par une ou deux enzymes de restriction appartenant au site de clonage multiple. Le vecteur a été ensuite purifié comme un produit de PCR (voir §2.3.1.). Il a été ensuite précipité, repris par du tampon TE 1X et dosé en gel d'agarose par comparaison au témoin.

### 2.4.2. Déphosphorylation

Lorsque le vecteur est hydrolysé par une enzyme unique, on le déphosphoryle afin d'éviter qu'il ne se religue sur lui même. On utilise pour cela une phosphatase (Boehringer). Le vecteur ouvert a été incubé au moins 1 h à 37°C avec un tampon 10X (Tris-HCl 0,5M; EDTA 1mM pH 8,5) et 1 unité de phosphatase alcaline (Boehringer). Le vecteur déphosphorylé a été ensuite purifié et repris en tampon TE 1X. Il a été dosé après électrophorèse en gel d'agarose.

### 2.4.3. Ligation

Un mélange contenant 8 µl d'ADN purifié, 1 µl de tampon de ligation (Tris-HCl 66mM; MgCl<sub>2</sub> 6,6mM; DTT 100mM; ATP 66mM), 35 ng de vecteur et 1 µl de T4 ADN ligase (1U/µl; United States Biochemical) a été incubé pendant 1 nuit à 16°C.

#### 2.4.4. Transformation

La transformation s'effectue selon la même méthode que celle décrite ci-dessus pour les produits de PCR en utilisant des bactéries lac<sup>-</sup> JM109 (Promega) vendues compétentes. Les bactéries ont été ensuite étalées sur boîtes comme précédemment sur un milieu LB-agar ampicilline. Les boîtes ont été placées à 37°C pendant une nuit.

#### 2.4.5. Recherche des clones d'intérêt

Avec les bactéries JM109, il a été possible d'utiliser la méthode de détection X-Gal/IPTG. Cependant, si on possède la sonde correspondant à un fragment de l'insert à sous-cloner, on procède comme suit.

##### 2.4.5.1. Empreintes plasmidiques

Une rondelle de membrane de Nylon Hybond™-N+ (Amersham) a été appliquée sur chaque boîte de Pétri pendant une minute. L'ADN a été dénaturé dans un tampon de dénaturation (NaCl 1,5M; NaOH 0,5M). La rondelle de nylon a été ensuite neutralisée pendant 5 min dans une solution de neutralisation (Tris-HCl 0,5 M pH 7,5; NaCl 1,5) puis séchée sur papier. Le matériel a été fixé 5 min sous UV.

##### 2.4.5.2. Hybridation à une sonde nucléique

La méthode est identique à celle décrite ultérieurement pour les Southern (Fig. 3). Les rondelles ont été préhybridées et hybridées à 42°C dans le tampon d'hybridation DIG Easy Hyb (Boehringer) pendant au moins 1 h. L'hybridation a été effectuée avec la sonde (5 ng de sonde par ml de tampon DIG Easy Hyb). Les rondelles de nylon ont été ensuite lavées par 2 bains de 10 min à 50°C dans un tampon de SSC 2X-SDS 0,1%, suivis de 2 bains de 15 min à 50°C dans un tampon de SSC 0,1X-SDS 0,1%.

La membrane a été ensuite équilibrée 5 min dans un tampon de lavage (acide maléique, 100mM; NaCl, 150mM; 0,3% Tween-<sup>®</sup>20; pH 7,5), puis saturée 1 h dans une solution de saturation (1% d'agent bloquant (Boehringer) dissout dans un tampon d'acide maléique [acide maléique, 100mM; NaCl, 150mM; pH 7,5]). La membrane a été mise en contact avec l'anticorps anti-digoxigénine conjugué à la phosphatase alcaline sous agitation constante pendant 1 h. Après 2 nouveaux lavages, la membrane a été équilibrée 5 min dans le tampon de détection (Tris-HCl, 100mM; NaCl, 100mM; pH 9,5) puis mise en contact 5 min avec un substrat de la phosphatase alcaline: le CSPD<sup>®</sup> (Disodium 3-(-4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3-2'-(5'-chloro) tricyclo{3.3.1.1} decan]-4-yl) phényl phosphate 25mM; Boehringer) qui émet de la lumière lorsqu'il est métabolisé. La lumière émise impressionne l'émulsion d'un film radiographique (Hyperfilm ECL, Amersham).

## **2.5. Préparation de l'ADN plasmidique recombinant**

(kit QIAprep<sup>™</sup> Spin Minipreps DNA Purification-Qiagen)

### **2.5.1. Lyse bactérienne par un détergent**

3 ml de culture ont été centrifugés pendant 5 min à 5000 tours/min. Le surnageant a été éliminé. Les bactéries ont été resuspendues dans 200 µl de solution (Tris-HCl pH 8; 50mM; EDTA 10mM; RNase A 100 µg/ml) puis lysées (200 µl de NaOH 0,2M, SDS 1%). Après 5 min d'incubation, le mélange a été neutralisé (350 µl d'acétate de potassium 3M, pH 5,5) puis centrifugé 10 min à 12000g; le surnageant contenant les plasmides a été récupéré.

### **2.5.2. Purification de l'ADN plasmidique**

Le surnageant a été purifié sur une microcolonne contenant un gel de silice sur lequel il va s'adsorber. Après un lavage par 0,5 ml d'une solution de «PB» (NaCl, 1M; MOPS

50mM, pH 7; EDTA 5mM; EtOH (95%) 15%), la colonne a été essorée par centrifugation pendant 1 min.

### **2.5.3. Elution de l'ADN de la matrice**

50 µl de TE chaud (65°C) sont appliqués sur la colonne pendant quelques minutes. L'ADN plasmidique a été élué de la colonne par 30 sec de centrifugation.

### **2.5.4. Détermination de la taille des inserts**

3 µl de chaque solution de plasmides ont été hydrolysés pendant 1 h à 37°C dans un tube contenant 5 µl de TE 1X, 1µl de tampon 10X adapté à l'enzyme (Boehringer) et 0,5 µl de chaque enzyme qui coupe de part et d'autre du site de clonage (*HindIII* et *BamHI* pour le vecteur *pMOSBlue* en tampon B). L'insert et le vecteur ont ensuite été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose.

Une hydrolyse sur une plus grande quantité (35 µl) a permis, après purification comme précédemment (§2.3.1.), d'avoir assez de matériel pour utiliser ces inserts comme sonde sur des Southern blots.

## **2.6. Sonde nucléique**

### **2.6.1. Sonde d'ADN : technique du multi-amorçage**

L'ADN à marquer (300 ng dans 15 µl) a été tout d'abord dénaturé pendant 10 min dans l'eau bouillante puis maintenu dans la glace. La réaction d'élongation, amorcée par un cocktail d'hexanucléotides, a été réalisée pendant 1 nuit à 37°C par le fragment Klenow de

l'ADN polymérase (kit Random Primed DNA Labeling, Boehringer) en présence de dNTPs dont du dUTP marqué à la digoxigénine (Fig. 3).

### **2.6.2. Marquage en 3'OH d'un oligonucléotide**

L'oligonucléotide (100pmoles dans un volume maximal de 10  $\mu$ l) a été dénaturé 5 min à 95°C, maintenu 5 min dans la glace puis mélangé à 4  $\mu$ l de tampon de réaction 5X (potassium cacodylate 1M; Tris-HCl 125mM; SAB 1,25mg/ml; pH 6,6), 4  $\mu$ l de solution de CoCl<sub>2</sub> (25mM), 1  $\mu$ l de DIG-ddUTP 1mM (2'-3'-dideoxyuridine-5' triphosphate, couplé à la digoxigénine), et 1  $\mu$ l de terminale transférase (3' end labelling kit, Boehringer). Le mélange a été incubé 15 min à 37°C. La réaction a été stoppée par un passage de 5 min dans la glace et par addition de 1  $\mu$ l d'EDTA (Fig. 3).

## **2.7. Southern Blots**

Après hydrolyse par des enzymes de restriction, les fragments d'ADN ont été séparés en gel d'agarose (0,8 à 2%) en tampon borate-EDTA puis transférés sur membrane et fixés pour repérer le matériel génétique par des sondes froides marquées à la digoxigénine.

### **2.7.1. Transfert**

L'ADN a été tout d'abord dénaturé par 2 bains de 15 min dans un tampon de dénaturation (NaCl 1,5M; NaOH 0,5M). Le gel a été ensuite neutralisé par 2 bains dans un tampon de neutralisation (Tris-HCl 0,5M pH 7,5; NaCl 1,5M). L'ADN a été ensuite transféré sur membrane de Nylon Hybond™-N+ (Amersham) par capillarité en tampon SSC 20X pendant une nuit. L'ADN a été ensuite fixé sur la membrane par une exposition de 3 min aux UV.

## 2.7.2. Hybridation



### 2.7.2.1. Sonde double brin

La méthode est identique à celle décrite précédemment pour les rondelles de Nylon. La membrane a été tout d'abord préhybridée au moins 1 h à 42°C dans un tampon de préhybridation DIG Easy Hyb (Boehringer) afin de saturer les sites libres de la membrane. Elle a été ensuite hybridée dans le même tampon d'hybridation DIG Easy Hyb (Boehringer) pendant une nuit à même température avec la sonde (25 ng/ml de tampon).

### 2.7.2.2. Sonde oligonucléotidique

Ces étapes sont identiques à celles utilisées pour une sonde double brin mais la température de préhybridation et d'hybridation est de 37°C.

## 2.7.3. Lavages et détection par chimioluminescence

L'excès de sonde a été éliminé de la membrane par rinçage en tampon SSC2X pour une sonde d'ADN double brin, SSPE6X pour une sonde oligonucléotidique; la membrane a été ensuite lavée deux fois 15 min à 55°C en tampon SSC 0,1X-SDS 0,1% pour une sonde d'ADN double brin, à 40°C en tampon SSPE 4X-SDS 0,1% pour une sonde oligonucléotidique. La membrane a été ensuite révélée par chimioluminescence comme décrit précédemment (voir §2.4.5.2.; Fig. 3). La membrane peut ensuite être déshybridée par des bains bouillants de SDS (0,1 à 0,5%), SSC 2X. Les solutions d'hybridation contenant les sondes peuvent être réutilisées après une étape de dénaturation de 10 min à 95°C.

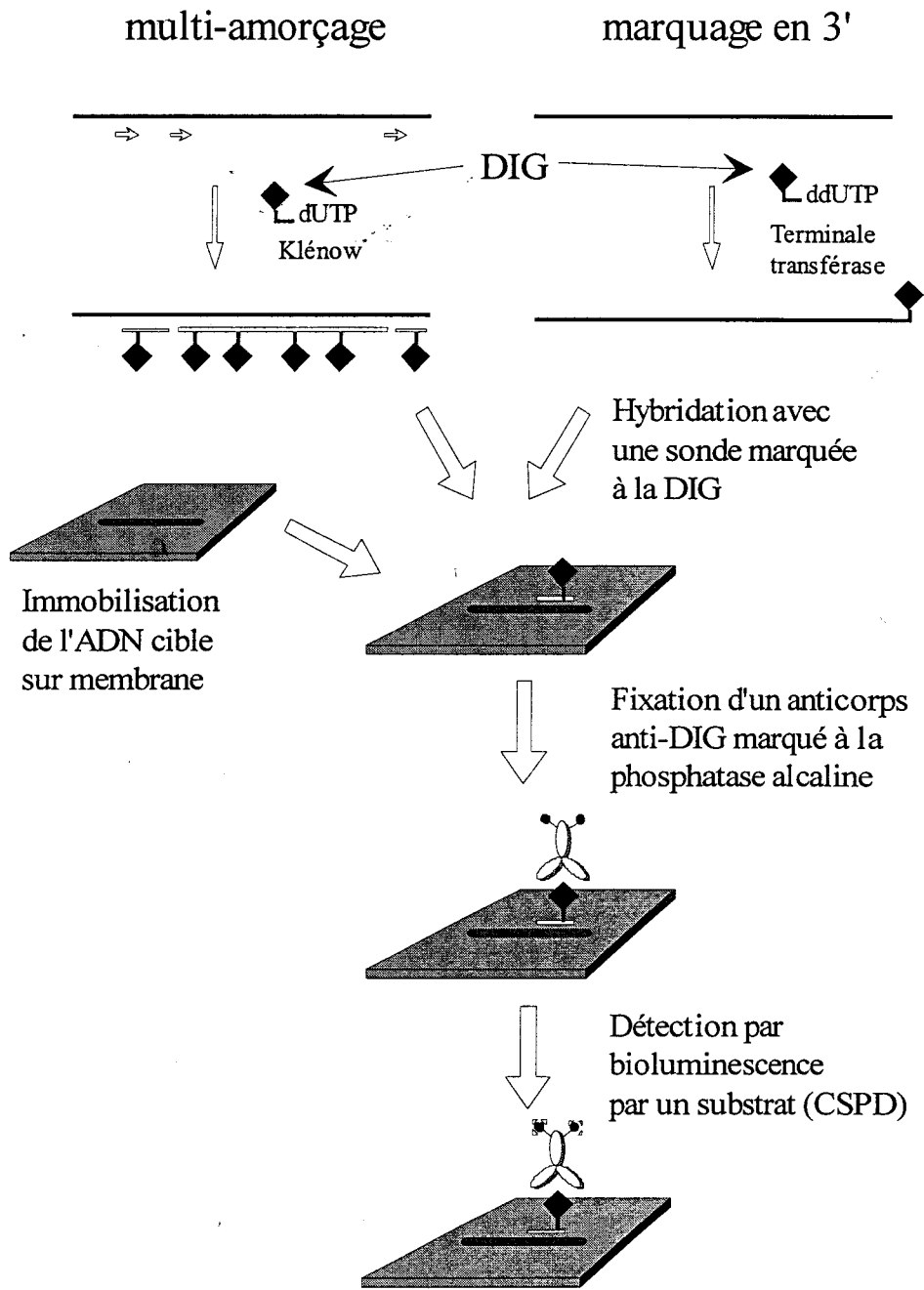


Figure 3: Techniques de marquage et de détection du système DIG (Boehringer).



## **2.8. Dots blots**

### **2.8.1. Dénaturation, neutralisation et fixation du matériel génétique**

L'ADN à déposer sur membrane a été tout d'abord dénaturé 10 min dans l'eau bouillante puis maintenu dans la glace. L'échantillon d'ADN dénaturé a été déposé sur membrane de Nylon Hybond™-N+ (Amersham) et fixé pour repérer le matériel génétique par des sondes froides marquées à la digoxigénine.

La membrane sur laquelle l'échantillon d'ADN a été déposé a été placée 5 min sur un papier filtre imbibé d'un tampon de dénaturation (NaCl 1,5M; NaOH 0,5M). La membrane a été ensuite neutralisée sur un papier filtre imbibé d'un tampon de neutralisation (Tris-Hcl 0,5M pH 7,5; NaCl 1,5M). L'ADN a été fixé sur la membrane par une exposition de 3 min aux UV.

### **2.8.2. Hybridation**

La méthode est identique à celle décrite précédemment pour les Southern blots (voir §2.7.2.). La membrane a été tout d'abord préhybridée au moins 1 h à 42°C dans le tampon DIG Easy Hyb (Boehringer) puis hybridée dans le même tampon pendant au moins 1 h à même température avec la sonde double brin (25 ng/ml de tampon).

### **2.8.3. Lavages et détection par chimioluminescence**

Les méthodes de lavage et de détection par chimioluminescence sont identiques à celles décrites précédemment pour les Southern blots (voir §2.7.3.)

## 2.9. Séquençage nucléotidique

La technique utilisée est celle de Sanger (**Sanger *et al.*, 1977**). L'ADN plasmidique a été tout d'abord dénaturé par chauffage. Le vecteur monobrin a été ensuite hybridé à une amorce oligonucléotidique (T3, T7, U-19) ou à un oligonucléotide spécifique de l'insert. Puis, une seule réaction de polymérisation a été réalisée par une polymérase thermostable: l'AmpliTaq<sup>®</sup>DNA Polymerase (ABI Prism<sup>™</sup>Ready Reaction AmpliTaq<sup>®</sup>FS, DyeDeoxy<sup>™</sup>Terminator Cycle Sequencing kit, Perkin-Elmer Applied Biosystems). La synthèse du second brin a été effectuée en présence des 4 désoxyribonucléotides. La réaction de polymérisation a été ensuite poursuivie en présence des 4 bases sous forme de di-désoxyribonucléoside triphosphate marqués spécifiquement par un fluorophore de couleur différente à très faible concentration qui arrête, au hasard, la polymérisation. La thermostabilité de l'AmpliTaq<sup>®</sup>DNA Polymerase est utilisée avantageusement lors de la réaction de séquençage par thermocyclage: les étapes successives de dénaturation de l'ADN plasmidique, d'hybridation de l'amorce et d'élongation sont répétées plusieurs fois dans un thermocycleur Perkin-Elmer 480.

Il a été nécessaire d'éliminer les di-désoxyribonucléoside triphosphate marqués qui n'ont pas été incorporés grâce à une simple précipitation par du chlorure de magnésium et de l'éthanol (70%).

Les fragments d'extension de tailles différentes ont été ensuite séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 6% en tampon urée 6M (Bio-Rad). L'électrophorèse a été effectuée en continu dans un séquenceur automatique d'ADN Perkin-Elmer Applied Biosystems (modèle 373). Pendant la séparation des fragments par migration en gel de polyacrylamide, un rayon laser excite la molécule de fluorophore. L'émission de fluorescence est collectée par un détecteur (photomultiplicateur). Les signaux de fluorescence sont ensuite digitalisés puis transmis à une unité informatique où ils sont analysés et visualisés sous forme d'électrophérogramme. La lecture directe de la séquence a été réalisée avec le programme Sequence Navigator (Perkin Elmer-Applied Biosystems). Cette méthode permet de lire des séquences de 100 à 600 pb.

## **2.10. Analyse des séquences**

Les données ont été traitées par informatique à l'aide des programmes disponibles sur le serveur NCBI (Internet: [http ://www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)).

# Composition des tampons

---

---

**COMPOSITION DES TAMPONS****TE 10X**

Tris-HCl 1M pH 8,0	10ml
EDTA 0,5M	2ml
H <sub>2</sub> O	qsp 100ml
pH 7,0	

**SSC 20X**

NaCl	175,3 g
Citrate trisodique	88,2 g
H <sub>2</sub> O	qsp 1l
pH 7,0	

**SSPE 20X**

NaCl	174 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	27,6 g
EDTA	7,4 g
H <sub>2</sub> O	qsp 1l
pH 7,4	

**Solution d'IPTG**

IPTG	0,12 g
Eau stérile	qsp 5ml

**Solution de X-Gal**

X-Gal	50 mg
N,N' diméthylformamide	qsp 1ml

**LB**

Bactotryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O	qsp 1l
pH 7,2	

**LB-Agar**

LB contenant 15 g d'agar pour 1l	qsp 1l
pH 8,3	

**SOC**

Bactotryptone (w/v)	2%
Yeast extract (w/v)	0,5%
NaCl	10mM
KCl	25mM
MgCl <sub>2</sub>	10mM
MgSO <sub>4</sub>	10mM
Glucose	20mM

**Tampon Borate EDTA (TBE) 10 X**

Acide borique	55 g
Tris	108 g
EDTA	5,84 g
H <sub>2</sub> O	qsp 1l
pH 8,3	

**MOPS 10 X**

acide-3--(N-morpholino)-propane-	200mM
sulfonique	50mM
acétate de sodium	10mM
EDTA	
pH 7	

**Composition de la gélose Columbia**

caséine pancréatique	12g
extrait de levure	3g
extrait de bœuf	3g
amidon de maïs	5g
chlorure de sodium	5g
agar	13,5g
H <sub>2</sub> O	qsp 1l
pH 7,1	

## Bibliographie

---

---

**BIBLIOGRAPHIE**

- Achenbach, L.A., Yang, W.** (1997) The *fur* gene from *Klebsiella pneumoniae*: characterization, genomic organization and phylogenetic analysis.  
*Gene* 185: 201-207.
- Actis, L.A., Tomalsky, M.E., Crosa, L.M., Crosa, J.H.** (1993) Effect of iron-limiting conditions on growth of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*.  
*J Clin Microbiol* 25: 488-490.
- Alm, R.A., Mattick, J.S.** (1997) Genes involved in the biogenesis and function of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*.  
*Gene* 192: 89-98.
- Arnou, L.E.** (1937) Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenyl-alanine-tyrosine mixtures.  
*J Biol Chem* 118: 531-537.
- Arseze, A., Mercuri, F., Trevisan, R., Grazia, M., Botta, G.A.** (1997) Recovery of *Bilophila wadsworthia* from clinical specimens in Italy.  
*Anaerobe* 3: 219-224.
- Avril, J.L., Mesnard, R.** (1991) Factors influencing the virulence of *Acinetobacter*, pp 77-82. In K.J. Towner, E. Bergogne-Bérézin, and C.A. Fewson (Eds.), *The biology of Acinetobacter*. Plenum Publishing Corp., New York.
- Baron, E.J., Summanen, P., Downes, J., Roberts, M.C., Wexler, H., Finegold, S.M.** (1989) *Bilophila wadsworthia*, gen. nov. and sp. nov., a unique gram-negative anaerobic rod recovered from appendicitis specimens and human faeces.  
*J Gen Microbiol* 135: 3405-3411.



**Baron, E.J., Curren, M., Henderson, G.** (1992) *Bilophila wadsworthia* isolates from clinical specimens.

*J Clin Microbiol* 30: 1882-1884.

**Baron, E.J.** (1997) *Bilophila wadsworthia*: a unique gram-negative anaerobic rod.

*Anaerobe* 3: 83-86.

**Bé langer, M., Bégin, C., Mario, J.** (1995) Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin.

*Infect Immun* 63: 656-662.

**Bergogne-Bérezin, E., Towner K.J.** (1996) *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features.

*Clin Microbiol Rev* 9: 148-165.

**Berish, S.A., Subbarao, S., Chen, C.Y., Trees, D.L., Morse, S.A.** (1993) Identification and cloning of a *fur* homolog from *Neisseria gonorrhoeae*.

*Infect Immun* 61: 4599-4606.

**Bick, J.A., Semel, J.D.** (1993) Fulminant community-acquired *Acinetobacter* pneumonia in a healthy woman.

*Clin Infect Dis* 17: 820-821.

**Black, J.R., Dyer, D.W., Thompson, M.K., Sparling, P.F.** (1986) Human immune response to iron-repressible outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis*.

*Infect Immun* 54: 710-713.

**Botta, G.A., Arzese, A., Minisini, R., Trani, G.** (1994) Role of structural and extracellular virulence factors in gram-negative anaerobic bacteria.

*Clin Infect Dis* 18 Suppl 4: S260-S264.

- Bramanti, T.E., Holt, S.C.** (1990) Iron-regulated outer membrane proteins in the periodontopathic bacterium, *Bacteroides gingivalis*.  
*Biochem Biophys Res Commun* 166: 1146-1154.
- Bramanti, T.E., Holt, S.C.** (1993) Hemin uptake in *Porphyromonas gingivalis*: Omp26 is a hemin-binding surface protein.  
*J Bacteriol* 175: 7413-7420.
- Braun, V.** (1997) Avoidance of iron toxicity through regulation of bacterial iron transport.  
*Biol Chem* 378: 779-786.
- Brickman, T.J., Armstrong, S.K.** (1995) *Bordetella pertussis fur* gene restores iron repressibility of siderophore and protein expression to deregulated *Bordetella bronchiseptica* mutants.  
*J Bacteriol* 177: 268-270.
- Brown, M.R.W., Anwar, H., Lambert, P.A.** (1984) Evidence that mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung grows under iron-restricted conditions.  
*FEMS Microbiol Lett* 21: 113-117.
- Bullen, J.J.** (1981) The significance of iron in infection.  
*Rev Infect Dis* 3: 1127-1138.
- Calderwood, S.B., Mekalanos, J.J.** (1987) Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus.  
*J Bacteriol* 169: 4759-4764.
- Chart, H., Stevenson, P., Griffiths, E.** (1988) Iron-regulated outer membrane proteins of *Escherichia coli* strains associated with enteric or extraintestinal diseases of man and animals.  
*J Gen Microbiol* 134: 1549-1559.

**Chen, Q., Wertheimer, A.M., Tolmasky, M.E., Crosa, J.H.** (1996a) The AngR protein and the siderophore anguibactin positively regulate the expression of iron-transport genes in *Vibrio anguillarum*.

*Mol Microbiol* 22: 127-134.

**Chen, Q., Crosa, J.H.** (1996b) Antisense RNA, Fur, iron and the regulation of iron transport genes in *Vibrio anguillarum*.

*J Biol Chem* 271: 18885-18891.

**Clark, J.M.** (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases.

*Nucl Acids Res* 16: 9677-9686.

**Cochrane, D.M.G., Brown, M.R.W., Anwar, H., Weller, P.H., Lam, K., Costerton, J.W.** (1988) Antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* surface protein antigens in a rat model of chronic lung infection.

*J Med Microbiol* 27: 255-261.

**Cornelissen, C.N., Sparling, P.F.** (1994) Iron piracy: acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens.

*Mol Microbiol* 14: 843-850.

**Cowart, R.E., Foster, B.G.** (1985) Differential effects of iron on the growth of *Listeria monocytogenes*: minimum requirements and mechanism of acquisition.

*J Infect Dis* 151: 721-730.

**Cox, C.D.** (1986) Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin.

*Infect Immun* 52: 263-270.

**Coy, M., Neilands, J.B.** (1991) Structural dynamics and functional domains of the Fur protein.

*Biochemistry* 30: 8201-8210.

- Coy, M.** (1995) The interaction of the ferric uptake regulation protein with DNA.  
*Biochem Biophys Res Commun* 212: 784-792.
- Crosa, J.H.** (1989) Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria.  
*Microbiol Rev* 53: 517-530.
- Crosa, J.H.** (1997) Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria.  
*Microbiol Mol Biol Rev* 61: 319-336.
- Cutler, C.W., Eke, P.I., Genco, C.A., Van Dyke, T.E., Arnold, R.R.** (1996) Hemin-induced modifications of the antigenicity and hemin-binding capacity of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide.  
*Infect Immun* 64: 2282-2287.
- Czaky, T.Z.** (1948) On the estimation of bound hydroxylamine in biological materials.  
*Act Chem Scand* 2: 450-454.
- De Lorenzo, V., Herrero, M., Giovannini, F., Neilands, J.B.** (1988) Fur (ferric uptake regulation) protein and CAP (catabolite-activator protein) modulate transcription of *fur* gene in *Escherichia coli*.  
*Eur J Biochem* 173: 537-546.
- Duerden, B.I.** (1994) Virulence factors in anaerobes.  
*Clin Infect Dis* 18 Suppl 4: S253-S259.
- Dyer, D.W., West, E.P., Sparling, P.F.** (1987) Effects of serum carrier proteins on the growth of pathogenic *Neisseriae* with heme-bound iron.  
*Infect Immun* 55: 2171-2175.

**Echenique, J.R., Arienti, H., Tolmasy, M. E., Read, R. R., Staneloni, R.J., Crosa, J.H., Actis, L.A.** (1992) Characterization of a high-affinity iron transport system in *Acinetobacter baumannii*.

*J Bacteriol* 145: 7670-7679.

**Ernst, J.F., Bennet, R.L., Rothfield, L.R.** (1987) Constitutive expression of the iron-enterochelin and ferrichrome uptake systems in a mutant strain of *Salmonella typhimurium*.

*J Bacteriol* 135: 928-934.

**Finegold, S., Summanen, P., Gerardo, S.H., Baron, E.J.** (1992) Clinical importance of *Bilophila wadsworthia*.

*Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11: 1058-1063.

**Fohn, M.J., Mietzner, T.A., Hubbard, T.W., Morse, S.A., Hook III, E.W.** (1987) Human immunoglobulin G antibody response to the major gonococcal iron-regulated protein.

*Infect Immun* 55: 3065-3069.

**Foster, J.W., Hall, H.K.** (1992) Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator (*fur*) mutations on iron- and pH-regulated protein synthesis.

*J Bacteriol* 174: 4317-4323.

**Fujimara, S., Shibata, Y., Hirai, K., Nakamura, T.** (1996) Binding of hemoglobin to the envelope of *Porphyromonas gingivalis* and isolation of the hemoglobin-binding protein.

*Infect Immun* 64: 2339-2342.

**Genco, C.A., Odusanya, B.M., Brown, G.** (1994) Binding and accumulation of hemin in *Porphyromonas gingivalis* are induced by hemin.

*Infect Immun* 62: 2885-2892.

- Genco, C.A.** (1995) Regulation of hemin and iron transport in *Porphyromonas gingivalis*. *Adv Dent Res* 9: 41-47.
- Ghigo, J.M., Létoffé, S., Wandersman, C.** (1997) A new type of hemophore-dependent heme acquisition system of *Serratia marcescens* reconstituted in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179: 3572-3579.
- Goldberg, M.B., DiRita, V.J., Calderwood, S.B.** (1990a) Identification of iron-regulated virulence determinant in *Vibrio cholerae*, using *TnphoA* mutagenesis. *Infect Immun* 58: 55-60.
- Goldberg, M.B., Boyko, S.A., Calderwood, S.B.** (1990b) Transcriptional regulation by iron of a *Vibrio cholerae* virulence gene and homology of the gene to the *Escherichia coli* Fur system. *J Bacteriol* 172: 6863-6870.
- Gonzalez, G.C., Caamano, D.L., Schryvers, A.B.** (1990) Identification and characterisation of a porcine-specific transferrin receptor in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Mol Microbiol* 4: 1173-1179.
- Gonzalez, G.C., Yu, R.H., Rosteck P.R. Jr, Schryvers, A.B.** (1995) Sequence, genetic analysis, and expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* 141: 2405-2416.
- Gray-Owen, S.D., Loosmore, S., Schryvers, A.B.** (1995) Identification and characterization of genes encoding the human transferrin-binding proteins from *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 63: 1201-1210.
- Gray-Owen, S.D., Schryvers, A.B.** (1996) Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol* 4: 185-191.

**Griffiths, E., Humphreys, J.** (1980) Isolation of enterochelin from the peritoneal washings of guinea pigs lethally infected with *Escherichia coli*.  
*Infect Immun* 28: 286-289.

**Griffiths, E.** (1985) Naturally occurring antibodies in human sera that react with iron-regulated outer membrane proteins of *Escherichia coli*.  
*Infect Immun* 47: 808-813.

**Griffiths, E., Chart, H., Stevenson, P.** High affinity iron uptake systems and bacterial virulence. (1988) Virulence mechanisms of bacterial pathogens; (Roth J.A., Ed.); pp121-137. American Society for Microbiology, Washington D.C.

**Guerinot, M.L.** (1994) Microbial iron transport.  
*Annu Rev Microbiol* 48: 743-772.

**Hahn, H.P.** (1997) The type-4 pilus is the major virulence associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*-a review.  
*Gene* 192: 99-108.

**Hancock, R.E.** (1991) Bacterial outer membranes: evolving concepts.  
*ASM News* 57: 175-182.

**Hantke, K.** (1990) Dihydroxybenzoylserine-a siderophore of *E. coli*.  
*FEMS Microbiol Lett* 67: 5-8.

**Henderson, D.P., Payne, S.M.** (1993) Cloning and characterization of the *Vibrio cholerae* genes encoding the utilization of iron from haemin and haemoglobin.  
*Mol Microbiol* 7: 461-469.

**Hennecke, H.** (1990) Regulation of bacterial genes expression by metal-protein complexes.  
*Mol Microbiol* 4: 1621-1628.

- Henrichsen, J.** (1984) Not gliding but twitching motility of *Acinetobacter calcoaceticus*.  
*J Clin Pathol* 37: 102-103.
- Hickey, E.K., Cianciotto, N.P.** (1994) Cloning and sequencing of the *Legionella pneumophila fur* gene.  
*Gene* 143: 117-121.
- Huebers, H.A., Finch, C.A.** (1987) The physiology of transferrin and transferrin receptors.  
*Physiol Rev* 67: 520-582.
- Husson, M.O., Legrand, D., Spik, G., Leclerc, H.** (1993) Iron acquisition by *Helicobacter pylori*: importance of human lactoferrin.  
*Infect Immun* 61: 2694-2697.
- Jiménez-Mejías, M.E., Pachon, J., Becerril, B., Palomino-Nicas, J., Rodríguez-Cobacho, A., Revuelta, M.** (1997) Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitidis with ampicillin/sulbactam.  
*Clin Infect Dis* 24: 932-935.
- Kaca, W., Roth, R.I., Levin J.** (1994) Hemoglobin, a newly recognized lipopolysaccharide (LPS)-binding protein that enhances LPS biological activity.  
*J Biol Chem* 269: 25078-25084.
- Kammler, M., Schon, C., Hantke, K.** (1993) Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*.  
*J Bacteriol* 175: 6212-6219.
- Kaplan, N., Rosenberg, E., Jann, B., Jann, K.** (1985) Structural studies of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4.  
*Eur J Biochem* 152: 453-458.



**Karkhoff-Schweizer, R.R., Schryvers, A.B., Schweizer, H.P.** (1994) Cloning and sequence analysis of the *fur* gene encoding an iron-regulatory protein of *Neisseria meningitidis*.

*Gene* 141: 139-140.

**Karunakaran, T., Madden, T., Kuramitsu, H.** (1997) Isolation and characterization of a hemin-regulated gene, *hemR*, from *Porphyromonas gingivalis*.

*J Bacteriol* 179: 1898-1908.

**Kasten, M.J., Rosenblatt, J.E., Gustafson, D.R.** (1992) *Bilophila wadsworthia* bacteremia in two patients with hepatic abscesses.

*J Clin Microbiol* 30: 2502-2503.

**Konijn, A.M., Hershko, C.** (1989) The anaemia of inflammation and chronic disease. In: Iron and Immunity, Cancer and Inflammation (De Sousa, M. and Brock, J.H., Eds), pp 111-143. Academic Press, Chichester.

**Kwaik, Y.A., Pederson, L.L.** (1997) The use of differential display-PCR to isolate and characterize a *Legionella pneumophila* locus induced during the intracellular infection of macrophages.

*Mol Microbiol* 21: 543-556.

**Lambert, T., Gerbaud, G., Courvalin, P.** (1988) Transferable amikacin resistance in *Acinetobacter* spp. due to a new type of 3'-aminoglycoside phosphotransferase.

*Antimicrob Agents Chemother* 32: 15-19.

**Lambert, T., Gerbaud, G., Courvalin, P.** (1994) Characterization of the chromosomal *aac* (6')-Ij gene of *Acinetobacter* sp.13 and the *aac* (6')-Ih plasmid gene of *Acinetobacter baumannii*.

*Antimicrob Agents Chemother* 38: 1883-1889.

**Lauer, P., Albertson, N.H., Koomey, M.** (1993) Conservation of genes encoding components of a type IV pilus assembly/two step protein export pathway in *Neisseria gonorrhoeae*.

*Mol Microbiol* 8: 357-368.

**Le Cam, E., Frechton, D., Barray, M., Fourcade, A., Delain, E.** (1994) Observation of binding and polymerization of Fur repressor onto operator-containing DNA with electron and atomic force microscopes.

*Proc Natl Acad Sci USA* 91:11816-11820.

**Lee, B.C.** (1995) Quelling the red menace: haem capture by bacteria.

*Mol Microbiol* 18: 383-390.

**Letain, T.E., Postle, K.** (1997) TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli*.

*Mol Microbiol* 24: 271-283.

**Létoffé, S., Ghigo, J.M., Wandersman, C.** (1994) Secretion of the *Serratia marcescens* Has A protein by an ABC transporter.

*J Bacteriol* 176: 5372-5377.

**Lewis, L.A., Gray, E., Wang, Y.P., Roe, B.A., Dyer, D.** (1997) Molecular characterisation of *hpuAB*, the haemoglobin-haptoglobin- utilization operon of *Neisseria meningitidis*.

*Mol Microbiol* 23: 737-749.

**Litwin, C.M., Boyko, S.A., Calderwood, S.B.** (1992) Cloning, sequencing, and transcriptional regulation of the *Vibrio cholerae fur* gene.

*J Bacteriol* 174: 1897-1903.

**Litwin, C.M., Calderwood, S.B.** (1993a) Role of iron in regulation of virulence genes.

*Clin Microbiol Rev* 6: 137-149.

**Litwin, C.M., Calderwood, S.B.** (1993b) Cloning and genetic analysis of the *Vibrio vulnificus fur* gene and construction of a *fur* mutant by in vivo marker exchange.

*J Bacteriol* 175: 706-715.

**Lodge, J.F., Emery, T.** (1984) Anaerobic iron uptake by *Escherichia coli*.

*J Bacteriol* 160: 801-804.

**Lonnerdal, B., Iyer, S.** (1995) Lactoferrin: molecular structure and biological function.

*Annu Rev Nutr* 15: 93-110.

**Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Forr, A.L., Randall, R.J.** (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent.

*J Biol Chem* 193: 265-275.

**Mario, J.** (1996) Comment on the MicroReview by B. Craig Lee (Quelling the red menace: haem capture by bacteria).

*Mol Microbiol* 20: 238.

**Matsudaira, P.** (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes.

*J Biol Chem* 262: 10035-10038.

**Michel, K.P., Thole, H.H., Pistorius, E.K.** (1996) IdiA, a 34 kDa protein in the cyanobacteria *Synechococcus sp.* strains PCC 6301 and PCC 7942, is required for growth under iron and manganese limitations.

*Microbiology* 142: 2635-2645.

**Miles, N.A., Khimji, P.L.** (1975) Enterobacterial chelators of iron: their occurrence, detection and relation to pathogenicity.

*J Med Microbiol* 8: 477-490.

**Mills, M., Payne, S.** (1997) Identification of *shuA*, the gene encoding the heme receptor of *Shigella dysenteriae*, and analysis of invasion and intracellular multiplication of a *shuA* mutant.

*Infect Immun* 65:5358-5363.

**Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Schaechter, M.** (1994) Structures et fonctions des parties de la cellule bactérienne. Dans: Physiologie de la cellule bactérienne, une approche moléculaire (Edition Masson), pp 30. Enseignement des Sciences de la Vie, Paris.

**Neilands, J.B.** (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds.

*J Biol Chem* 270: 26723-26726.

**Niederhoffer, E.C., Naranjo, C.M., Bradley, K.L., Fee, J.A.** (1990) Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus.

*J Bacteriol* 172: 1930-1938.

**Nikaido, H.** (1993) Uptake of iron-siderophore complexes across the bacterial outer membrane.

*Trends Microbiol* 1: 5-7.

**Nikaido, H.** (1994) Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes.

*J Biol Chem* 269: 3905-3908.

**Obana, Y.** (1986) Pathogenic significance of *Acinetobacter calcoaceticus*: analysis of experimental infection in mice.

*Microbiol Immunol* 30: 645-657.

**Otto, B.R., Verweij-van Vught, A.M., van Doorn, J., Maclaren, D.M.** (1988) Outer membrane proteins of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides vulgatus* in relation to iron uptake and virulence.

*Microb Pathog* 4: 279-287.

**Otto, B.R., Sparrius, M., Verweij-van Vught, A.M., MacLaren, D.M.** (1990) Iron-regulated outer membrane protein of *Bacteroides fragilis* involved in heme uptake.

*Infect Immun* 58: 3954-3958.

**Otto, B.R., Verweij W.R., Sparrius, M., Verweij-van Vught, A.M.J.J, Nord, C.E., MacLaren, D.M.** (1991) Human immune response to an iron-repressible outer membrane protein of *Bacteroides fragilis*.

*Infect Immun* 59: 2999-3003.

**Otto, B.R., Verweij-van Vught, A.M., MacLaren, D.M.** (1992) Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria.

*Crit Rev Microbiol* 18: 217-233.

**Otto, B.R., Sparrius, M., Wors, D.J., de Graaf, F.K., MacLaren, D.M.** (1994) Utilization of haem from the haptoglobin-haemoglobin complex by *Bacteroides fragilis*.

*Microb Pathog* 17: 137-147.

**Otto, B.R., Kusters, J.G., Luirink, J., de Graaf, F.K.** (1996) Molecular characterization of a heme-binding protein of *Bacteroides fragilis* BE1.

*Infect Immun* 64: 4345-4350.

**Page, W.J., Huyer, M.** (1984) Derepression of the *Azotobacter vinelandii* siderophore systems using iron-containing minerals to limit iron repletion.

*J Bacteriol* 158: 496-502.

**Palmen, R., Hellingwerf, K.J.** (1997) Uptake and processing of DNA by *Acinetobacter calcoaceticus*-a review.

*Gene* 192: 179-190.

**Payne, S.M.** (1993) Iron acquisition in microbial pathogenesis.

*Trends Microbiol* 1: 66-69.

**Pickett, C.L., Auffenberg, T., Pesci, E.C., Sheen, V.L., Jusuf, S.S.** (1992) Iron acquisition and hemolysin production by *Campylobacter jejuni*.

*Infect Immun* 60: 3872-3877.

**Poh, C.L., Loh, G.K.** (1985) Enzymatic profile of clinical isolates of *Acinetobacter calcoaceticus*.

*Med Microbiol Immunol* 174: 29-33.

**Ponka, P.** (1997) Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells.

*Blood* 89: 1-25.

**Prince, R.W., Cox, D.C., Vasil, M.L.** (1993) Coordinate regulation of siderophore and endotoxin A production: molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa fur* gene.

*J Bacteriol* 175: 2589-2598.

**Privalle, C.T., Fridovich, I.** (1993) Iron specificity of the Fur-dependent regulation of the biosynthesis of manganese-containing superoxide dismutase in *Escherichia coli*.

*J Biol Chem* 268: 5178-5181.

**Quinn, F.D., Newman, G.W., King C.H.** (1997) In search of virulence factors of human bacterial disease.

*Trends in Microbiol* 5: 20-26.

- Reichard, P., Ehrenberg, A.** (1983) Ribonucleotide reductase--a radical enzyme.  
*Science* 221: 514-519.
- Rosenberg, M.E., Bayer, E.A., Delarea, Rosenberg, E.** (1982) Role of thin fimbriae in adherence and growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane.  
*Appl Environ Microbiol* 44: 929-937.
- Rosenberg, E., Kaplan, N., Pines, O., Rosenberg, M., Gutnick, D.** (1983) Capsular polysaccharide interfere with adherence of *Acinetobacter calcoaceticus* to hydrocarbon.  
*FEMS Microbiol Lett* 17: 157-160.
- Sagerstrom, C.G., Sun, B.I., Sive, H.L.** (1997) Subtractive cloning: past, present and future.  
*Annu Rev Biochem* 66: 751-783.
- Salinas, P.C., Tomalsky, M.E., Crosa, J.H.** (1989) Regulation of the iron uptake system in *Vibrio anguillarum*: evidence for a cooperative effect between two transcriptional activators.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3529-3533.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.** (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467.
- Sapico, F.L., Reeves, D., Wexler, H.M., Duncan, J., Wilson, K.H., Finegold, S.M.** (1994) Preliminary study using species-specific oligonucleotide probe for rRNA of *Bilophila wadsworthia*.  
*J Clin Microbiol* 32: 2510-2513.
- Schaffer, S., Hantke, K., Braun, V.** (1985) Nucleotide sequence of the iron regulatory gene *fur*.  
*Mol Gen Genet* 200: 110-113.

- Schryvers, A.B., Morris, L.J.** (1988) Identification and characterisation of the transferrin-receptor from *Neisseria meningitidis*.  
*Mol Microbiol* 2: 281-288.
- Schryvers, A.B., Lee, B.C.** (1989) Comparative analysis of the transferrin and lactoferrin binding proteins in the family *Neisseriaceae*.  
*Can J Microbiol* 35: 409-415.
- Schryvers, A.B., Gray-Owen, S.** (1992) Iron acquisition in *Haemophilus influenzae*: receptors for human transferrin.  
*J Infect Dis* 165: S103-S104.
- Schumacher, U.K., Bucheler, M.** (1997) First isolation of *Bilophila wadsworthia* in otitis externa.  
*HNO* 45: 567-569.
- Schwyn, B., Neilands, J.B.** (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores.  
*Anal Biochem* 160: 47-56.
- Shand, G.H., Anwar, H., Kadurugamuwa, J., Brown, M.R.W., Silverman, S.H., Melling, J.** (1985) In vivo evidence that bacteria in urinary tract infection grow under iron-restricted conditions.  
*Infect Immun* 48: 35-39.
- Shurin, S.B., Anderson, P., Zollinger, J., Rathburn, R.K.** (1986) Pathophysiology of hemolysis in infections with *Haemophilus influenzae* type B.  
*J Clin Invest* 77: 1340-1348.



- Simpson, R.J., Moritz, R.L., Begg, G.S., Rubira, M.R., Nice, E.C.** (1989) Micropreparative procedures for high sensitivity sequencing of peptides and proteins. *Anal Biochem* 177: 221-236.
- Smith, A.W., Freeman, S., Minett, W.G., Lambert, P.A.** (1990) Characterization of a siderophore from *Acinetobacter calcoaceticus*. *FEMS Microbiol Lett* 70: 29-32.
- Sprott, G.D., Koval, S.F., Schnaitman, C.A.** (1994) Cell fractionation. In: Methods for general and molecular bacteriology (Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A. and Krieg, N.R., Eds.), pp 72-103. American Society of Microbiology, Washington D.C.
- Staggs, T.M., Perry, R.D.** (1991) Identification and cloning of a *fur* regulatory gene in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* 173: 417-425.
- Stojiljkovic, I., Hantke, K.** (1992) Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in gram-negative bacteria. *EMBO J* 11: 4359-4367.
- Stojiljkovic, I., Hwa, V., de Saint Martin, L., O'Gaora, P., Nassif, X., Heffron, F., So, M.** (1995) The *Neisseria meningitidis* haemoglobin receptor: its role in iron utilization and virulence. *Mol Microbiol* 15: 531-541.
- Stull, T.L.** (1987) Protein sources of heme for *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 55: 148-153.
- Summanen, P, Baron, E.J., Citron, D.M., Strong, C.A., Wexler, H.M., Finegold, S.M.** (1993) In: Introduction to anaerobic bacteriology, Wadsworth anaerobic bacteriology manual; pp 1-20 (Star Publishing Company).

**Summanen, P.H., Jousimies-Somer, H., Manley, S., Bruckner, Marina, M., Goldstein, E.J.C, Finegold, M.** (1995) *Bilophila wadsworthia* isolates from clinical specimens.

*Clin Infect Dis* 20: S210-S211.

**Tardat, B., Touati, D.** (1993) Iron and oxygen regulation of *Escherichia coli* MnSOD expression: competition between the global regulators Fur and ArcA for binding to DNA.

*Mol Microbiol* 9: 53-56.

**Tomalsky, M.E., Wertheimer, A.M., Actis, L.A., Crosa, J.H.** (1994) Characterization of the *Vibrio anguillarum fur* gene: role in regulation of expression of the FatA outer membrane protein and catechols.

*J Bacteriol* 176: 213-220.

**Tompkins, G.R., Wood, D.P., Birchmeier, K.R.** (1997) Detection and comparison of specific hemin binding by *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*.

*J Bacteriol* 179: 620-626.

**Tonjum, T., Freitag, N.E., Namork, E., Koomey, M.** (1995) Identification and characterisation of pilG, a highly conserved pilus-assembled gene in pathogenic *Neisseria*.

*Mol Microbiol* 16: 451-464.

**Towner, K.J.** (1997) Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp.

*J Med Microbiol* 46: 721-746.

**Vaitukaitis, J., Robbins, J.B., Niesdag, E., Ross, T.G.** (1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen.

*J Clin Endocr Metabol* 33: 988-991.

**Venturi, V., Ottevanger, C., Bracke, M., Weisbeek, P.** (1995) Iron regulation of siderophore biosynthesis and transport in *Pseudomonas putida* WCS358: involvement of a transcriptional activator and of the Fur protein.

*Mol Microbiol* 15: 1081-1093.

**Ward, K.H., Anwar, H., Brown, M.R.W., Wale, J., Gowar, J.** (1988) Antibody response to outer-membrane antigens of *Pseudomonas aeruginosa* in human burn wound infection.

*J Med Microbiol* 27: 179-190.

**Ward, C.G., Bullen, J.J., Rogers, H.J.** (1996) Iron and infection: new developments and their implications.

*Trauma* 41: 356-364.

**Weiss, G., Wachter, H., Fuchs D.** (1995) Linkage of cell-mediated immunity to iron metabolism.

*Immunol Today* 16: 495-500.

**Wendt, C., Dietze, B., Dietz, E., Rudden H.** (1997) Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces.

*J Clin Microbiol* 35: 1394-1397.

**Whitchurch, C.B., Mattick, J.S.** (1994) Characterization of a gene, *pilU*, required for twitching motility but not phage sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa*.

*Mol Microbiol* 13: 1079-1091.

**Williams, P., Morton, D.J., Towner, K.J., Stevenson, P., Griffiths, E.** (1990) Utilization of enterobactin and other exogenous iron sources by *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*, and *H. paraphrophilus*.

*J Gen Microbiol* 136: 2343-2350.

**Williams, P., Griffiths, E.** (1992) Bacterial transferrin receptors--structure, function and contribution to virulence.

*Med Microbiol Immunol (Berl)* 181: 301-322.

**Wooldridge K.G., Williams, P.H.** (1993) Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria.

*FEMS Microbiol Rev* 12: 325-348.

**Wooldridge, K.G., Williams, P.H., Ketley, J.M.** (1994) Iron-responsive genetic regulation in *Campylobacter jejuni*: cloning and characterization of *fur* homologue.

*J Bacteriol* 176: 5852-5856.

**Worwood, M.** (1997) The laboratory assessment of iron status--an update.

*Clin Chim Acta* 259: 3-23.

**Yamamoto, S., Okujo, N., Sakakibara, Y.** (1994) Isolation and structure elucidation of acinetobactin, a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii*.

*Arch Microbiol* 162: 249-254.

# Iron metabolism of *Bilophila wadsworthia* and *Acinetobacter baumannii*

Study of the iron-uptake mechanisms

Cloning and sequencing of the *fur*-like gene of *A. baumannii*



## Summary

Pathogenicity of microorganisms is a multifactorial phenomenon. Host environment plays a role in the development of the infectious process. Iron is an essential component of a wide variety of biochemical processes in microorganisms, and its availability is of major importance in bacterial pathogenesis.

The purpose of our work was to study the properties of *Bilophila wadsworthia* and *Acinetobacter baumannii* in relation to iron metabolism under iron-restricted conditions.

*B. wadsworthia* developed different iron-uptake mechanisms under iron-restricted conditions. Iron was an essential nutrient for the growth of *B. wadsworthia*. This bacteria produced iron-regulated outer membrane proteins of 16 kDa, 88 kDa, and 190 kDa. *B. wadsworthia* was able to use lactoferrin, transferrin, hemin or hemoglobin as a sole iron source. *B. wadsworthia* produced the iron-regulated proteins of 88 kDa and 190 kDa in the presence of lactoferrin, transferrin, hemin, or hemoglobin in the iron-restricted medium. The 190 kDa iron-regulated outer membrane protein was surface-exposed and was detected by anti-*Bilophila* hyperimmune rabbit serum.

Under iron-restricted conditions, *A. baumannii* synthesized siderophores and produced simultaneously two iron-regulated outer membrane proteins of 75 kDa and 80 kDa.

The Fur protein acts as a negative regulator of transcription *in vivo* by complexing with ferrous iron to repress expression of iron-regulated operons. Another goal of our work was to identify a *fur*-like gene of *B. wadsworthia* and *A. baumannii*.

Cloning and sequencing of the complete *fur*-like gene from *A. baumannii* was reported for the first time. The *fur* gene of *A. baumannii* was followed by a divergent open-reading frame coding for the C-terminus of a putative PilU protein responsible of the synthesis of type IV pili.