



HAL
open science

Suivi in vivo et en temps réel du processus infectieux induit par *Yersinia pestis*

Toan Nham

► **To cite this version:**

Toan Nham. Suivi in vivo et en temps réel du processus infectieux induit par *Yersinia pestis*. Bactériologie. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2012. Français. NNT: . tel-00731170

HAL Id: tel-00731170

<https://theses.hal.science/tel-00731170>

Submitted on 12 Sep 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

École Doctorale B3MI
UFR Sciences du Vivant
Université Paris.Diderot (Paris 7)
Bâtiment Lamarck
35 rue Hélène Brion
75013 Paris

Unité de Recherche *Yersinia*
Institut Pasteur
25-28 rue du Docteur Roux
75724 Paris Cedex 15

Université Paris·Diderot (Paris 7)

École Doctorale **Biochimie, Biothérapies, Biologie Moléculaire et
Infectiologie-B3MI**

Spécialité Microbiologies procaryote et eucaryote

Thèse de Doctorat de l'Université

Sciences de la Vie

Présentée par Toan NHAM

Suivi *in vivo* et en temps réel du processus infectieux induit par *Yersinia pestis*

Thèse dirigée par le Dr Élisabeth CARNIEL

Soutenue le mardi 4 septembre 2012, devant le jury composé de

- | | |
|--------------------------------------|---------------------|
| • Mr le Professeur Olivier Dussurget | Président |
| • Mr le Professeur Michel Simonet | Rapporteur |
| • Mr le Docteur Jean Jaubert | Rapporteur |
| • Mme le Docteur Claire Dane | Examinatrice |
| • Mme le Docteur Élisabeth Carniel | Directrice de thèse |

Sommaire

SOMMAIRE	3
TABLE DES ABRÉVIATIONS	4
TABLE DES ILLUSTRATIONS	5
LISTE DES TABLEAUX	5
INTRODUCTION	6
<i>YERSINIA PESTIS</i> ET LA PESTE	6
LA PESTE EN TANT QUE ZOOSE	9
LA PESTE EN TANT QUE MALADIE HUMAINE.....	11
<i>YERSINIA PESTIS</i> , AGENT CAUSAL DE LA PESTE.....	12
LE MODÈLE MURIN UTILISÉ EN PHYSIOPATHOLOGIE DE LA PESTE.....	19
LA BIOLUMINESCENCE	21
MATÉRIEL ET MÉTHODES	33
SOUCHES BACTÉRIENNES ET CONDITIONS DE CULTURE.....	33
CONSTRUCTION DES SOUCHES BIOLUMINESCENTES DE <i>Y. PESTIS</i> CO92 (PLUX) ET DE <i>Y. PSEUDOTUBERCULOSIS</i> IP32953 (PLUX).....	33
PROTOCOLES D'EXPÉRIMENTATION SUR SOURIS.....	34
DÉTECTION, OBSERVATION ET MESURE DE BIOLUMINESCENCE	35
VISUALISATION DU DRAINAGE LYMPHATIQUE.....	36
ANALYSES STATISTIQUES	36
RÉSULTATS	39
OBJECTIF	39
CONSTRUCTION DES SOUCHES CO92 (PLUX) ET IP32953 (PLUX)	39
CARACTÉRISATION <i>IN VITRO</i> DE L'EXPRESSION DE LA BIOLUMINESCENCE.....	40
CARACTÉRISATION DE LA BIOLUMINESCENCE AU COURS D'UNE INFECTION.....	46
SUIVI D'INFECTION AU COURS D'UNE PESTE BUBONIQUE À L'AIDE DE LA BIOLUMINESCENCE	51
CINÉTIQUE DE PROGRESSION DE <i>Y. PESTIS</i> DANS LE MODÈLE DE PESTE BUBONIQUE	55
DISCUSSION	57
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	67
ANNEXES	83
ARTICLE PUBLIÉ DANS LE CADRE DE LA THÈSE	83
ARTICLE PUBLIÉ EN-DEHORS DE LA THÈSE.....	95

Table des abréviations

CCD : *Charge-Coupled Device*, dispositif à transfert de charge, capteur électronique d'intensité lumineuse particulièrement sensible et à lecture rapide

DL₅₀ : dose létale à 50%, inoculum infectieux tuant uniquement la moitié d'une population, défini pour une voie d'infection et une souche données

HPI : *High Pathogenicity Island*, îlot de haute pathogénicité

PCR : *Polymerase Chain Reaction*, réaction en chaîne de polymérase, amplification d'une séquence de nucléotide par une enzyme polymérase à partir d'une matrice et d'amorces délimitant la séquence

p/s.cm².sr ou p/sec/cm²/sr : photon par seconde, par centimètre carré et par stéradian, radiance lumineuse captée par un pixel du capteur CCD et venant du point objet correspondant

p/s.ml : photon par seconde et par millilitre, quantité de photons émise en une seconde par un millilitre de suspension bactérienne dans les conditions de test

p/s.UFC : photon par seconde et par UFC, quantité de photons émise en une seconde par une unité bactérienne formant une colonie

UFC : Unité Formant une Colonie, unité de décompte de la concentration en corps bactériens vivants d'une suspension, à partir du dénombrement de colonies formées sur gélose.

Table des illustrations

Figure 1 : Différentes voies de transmissions décrites de la peste. D'après (Stenseth et al, 2008)	9
Figure 2 : Microphotographie de la puce du rat occidental <i>X. cheopis</i> , douze jours après un repas sanguin à partir d'une souris infectée avec <i>Y. pestis</i> . Source : CDC/Science Photo Library	11
Figure 3 : illustrations de quelques animaux bioluminescents	22
Figure 4. Bioluminescence in vitro de <i>Y. pestis</i> CO92(pLux) et <i>Y. pseudotuberculosis</i> IP32953(pLux)	40
Figure 5. Stabilité du plasmide chez <i>Y. pestis</i> CO92(pLux) in vitro par passage successifs	41
Figure 6. Instabilité de la luminescence chez <i>Y. pseudotuberculosis</i> IP32953(pLux) in vitro après plusieurs passage successifs	42
Figure 7. Suivi de croissance de CO92(pLux) et CO92	43
Figure 8. Corrélation entre le signal de bioluminescence et la concentration bactérienne in vitro	45
Figure 9. Effet de la température sur l'expression de la bioluminescence chez CO92(pLux)	46
Figure 10. Comparaison des courbes de survie de <i>Y. pestis</i> CO92 et CO92(pLux)	47
Figure 11. Association entre signal de bioluminescence et colonisation d'un organe	48
Figure 12. Corrélation entre le signal de bioluminescence émis par un organe et sa charge bactérienne	50
Figure 13. Étapes successives de la dissémination bactérienne au cours de la peste bubonique	52
Figure 14. Circulation du ganglion inguinal au ganglion axillaire	53
Figure 15. Schéma de propagation atypique : absence d'atteinte des ganglions inguinaux	54
Figure 16. Temps d'apparition des signaux bioluminescents dans les organes des souris	55

Liste des tableaux

Tableau 1 : principaux facteurs de virulence de <i>Y. pestis</i> et de <i>Y. pseudotuberculosis</i>	18
Tableau 2 : liste des amorces utilisées pour les contrôles par PCR	33

Introduction

Yersinia pestis et la peste

Histoire de la peste

L'histoire de l'Homme a été façonnée par une multitude d'événements, parmi lesquels les épidémies mortelles tiennent une place particulière. Une mortalité élevée, une menace pesant sur chacun sans rapport avec sa vertu ou sa foi, une origine inconnue ont contribué à forger la terrible réputation de ces épidémies. Les épidémies de peste étaient tout particulièrement redoutées. La « peste » rassemblait sous ce nom plusieurs maladies avant de consacrer une pathologie bien spécifique, mortelle et contagieuse, à la réputation bien établie : le terme anglais « pest » désigne couramment les créatures nuisibles, comparées à ce fléau.

Trois grandes pandémies de peste ont été rapportées et largement renseignées. La première, appelée Peste de Justinien, a commencé en l'an 542 et a duré 50 à 60 ans (Pollitzer, 1954). Le centre et l'est de l'Afrique, d'où elle pourrait être venue, faisaient partie des régions les plus touchées avec le pourtour méditerranéen. La peste sévissait d'abord dans les ports, puis l'infection progressait à l'intérieur des terres (Pollitzer, 1954). Les récits de l'époque ont permis d'estimer que la peste pourrait avoir tué 100 millions de personnes (Pollitzer, 1954).

Une deuxième pandémie de peste a débuté au XIII^{ème} en Asie Centrale à partir d'un foyer local de peste (Pollitzer, 1954). La pandémie a sévi en Inde, en Chine, en Afrique du Nord, au Proche-Orient et dans toute l'Europe où elle a marqué les esprits sous le nom de « Peste Noire » (« *Black Death* » en anglais). Selon les estimations, plus du quart de la population européenne est morte de la peste pendant les quatre siècles de pandémie (Pollitzer, 1954). L'Europe connaissait alors un contexte de guerres et de famines qui a certainement renforcé la mortalité.

La dernière pandémie de peste connue a commencé dans la province du Yunnan en Chine au milieu du XIX^{ème} siècle (Pollitzer, 1954). Le développement des moyens de transports plus rapides (bateau à vapeur, chemin de fer) a permis à la peste de se diffuser très rapidement et d'atteindre des territoires où la maladie n'était pas connue

auparavant, au-delà de l'Extrême-Orient et de l'Inde. La peste est apparue au cours de cette pandémie aux États-Unis, en Afrique du Sud et en Amérique du Sud et à Madagascar en particulier.

En 1894, au cours de cette troisième pandémie, le Français Alexandre Yersin, Pasteurien, a identifié à Hong Kong la bactérie responsable de la maladie et déterminé le rôle des rats dans son maintien (Yersin, 1894). En l'honneur de ses découvertes, le nom de Yersin a été associé au genre *Yersinia* (van Loghem, 1944) auquel appartient l'agent causal de la peste : *Yersinia pestis*. En 1898, le Français Paul-Louis Simond, un Pasteurien également, a démontré le rôle des puces dans la transmission de la bactérie d'un rat malade à un rat ou à un humain sain (Simond, 1898). Grâce à la compréhension de ce cycle infectieux, une nouvelle lutte contre la contagion a été mise en place, en utilisant les rodenticides et les insecticides pour enrayer ce cycle. Alexandre Yersin a élaboré un sérum antipesteux à partir du sang de chevaux (Yersin, 1897) et Waldemar Haffkine a mis au point un vaccin à partir d'une souche atténuée (Haffkine, 1906). Par la suite, l'apparition de l'antibiothérapie a apporté un traitement efficace aux malades.

Les mesures prophylactiques et les mesures thérapeutiques ont permis de réduire la mortalité de la peste et de limiter la contagion. De nombreux pays ont alors constaté la diminution ou la disparition des cas de peste humaine pendant plusieurs décennies, ce qui a pu faire croire que la maladie avait disparu.

Une maladie persistante et réémergente

Si la pandémie a pris fin, la maladie n'a pas disparu pour autant. Entre 2004 et 2009, plus de 12 000 cas de peste humaine, dont 843 mortels, provenant de 16 pays, ont été signalés (World Health Organization, 2010). L'Afrique a représenté plus de 96% des décès et plus de 97% des cas, avec une très large part en République Démocratique du Congo et à Madagascar.

Des foyers de peste persistent actuellement sur trois continents : Amériques du Sud et du Nord (Bolivie, Brésil, Équateur, États-Unis, Pérou), Asie (Birmanie, Chine, Inde, Mongolie, Kazakhstan, Vietnam) et Afrique (Botswana, Kenya, Madagascar, Ouganda, Tanzanie, République Démocratique du Congo) (Guiyoule *et al*, 1994; World Health Organization, 2010). La résistance à huit antibiotiques, dont les quatre recommandés par l'OMS pour le traitement et la prophylaxie, a été rapportée chez une souche isolée en

1995 d'un patient à Madagascar (Galimand *et al*, 2006). Cette résistance, portée par un plasmide fréquemment rencontré dans les entérobactéries des produits alimentaires, pourrait ne pas être un cas unique et annoncer l'émergence de souches multirésistantes de *Y. pestis*.

En outre, des épidémies de peste se sont produites dans des pays et des régions où cette maladie ne semblait plus sévir. En Inde, après 30 années sans cas de peste, une épidémie de peste pulmonaire a provoqué 876 cas en 1994, dont 54 mortels (Ramalingaswami, 1995; World Health Organization, 2010). La Jordanie a aussi connu le réveil de la peste en 1997, après plus de 80 années sans cas signalé (Arbaji *et al*, 2005). Dans la région d'Oran, en Algérie, un épisode de peste est survenu en 2003 après 50 ans de silence (Bertherat *et al*, 2007). Trois épidémies meurtrières de peste pulmonaire se sont produites en 2005 et en 2006 en République Démocratique du Congo (Bertherat *et al*, 2005; Guinet & Carniel, 2008). Les personnes touchées vivaient et travaillaient dans des régions minières distinctes des foyers de peste connus et dans lesquelles aucun cas n'avait jamais été signalé. Cinq cas de peste ont aussi été signalés en Libye après vingt ans de répit (Tarantola *et al*, 2009).

La peste en tant que zoonose

Cycle naturel de la peste

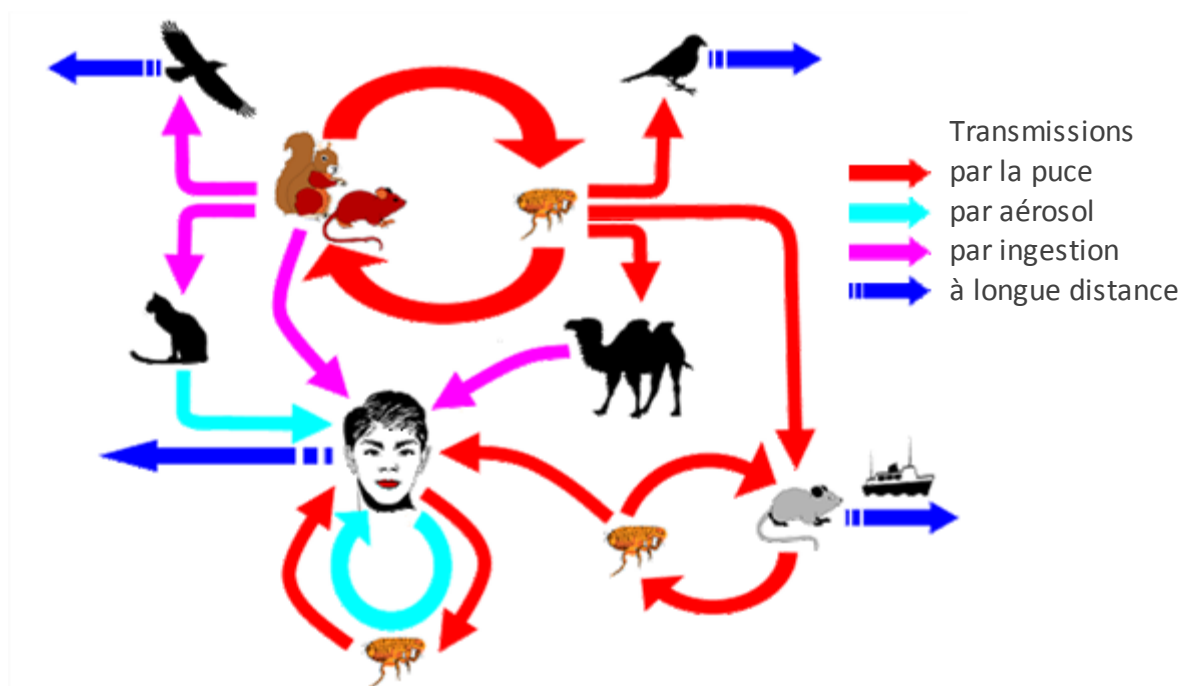


Figure 1 : Différentes voies de transmissions décrites de la peste. D'après (Stenseth *et al*, 2008)

La peste est une maladie qui touche en premier lieu les rongeurs : environ 200 espèces de rongeurs et de lagomorphes peuvent jouer le rôle de réservoir (Gratz, 1999). Les animaux réservoirs de la peste sont présents dans des environnements très variés : les déserts froids en Asie Centrale, les Montagnes Rocheuses des États-Unis, des régions chaudes et sèches d'Afrique continentale et des zones tropicales comme à Madagascar (Duplantier *et al*, 2005).

Au cours du cycle de la peste, un rongeur est piqué par une puce porteuse de la bactérie *Y. pestis*. La maladie se développe chez le rongeur : la bactérie envahit l'organisme de son hôte jusqu'à la septicémie terminale. Une nouvelle puce, en se nourrissant sur l'animal infecté, ingère son sang lourdement chargé en bactéries : cette puce devient le vecteur de la bactérie et peut contaminer un autre individu.

Compte tenu de l'issue fatale de la maladie, l'infection d'une colonie de rongeurs sensibles pourrait éradiquer complètement cette population. Néanmoins, dans certains territoires d'Iran, *Y. pestis* semble être capable de survivre et rester virulente plusieurs années dans les cadavres et le terrier des animaux morts, jusqu'à la colonisation des

terriers par de nouveaux individus (Mollaret *et al*, 1963; Mollaret, 1963). De plus, certaines puces vectrices de la maladie se nourrissent de rongeurs appartenant à des espèces différentes, ce qui diffuse *Y. pestis* dans un nouvel hôte.

Animaux sensibles à la peste

Les chameaux et les chèvres sont sensibles à la peste et peuvent devenir la source d'une peste d'origine alimentaire pour les hommes (Christie *et al*, 1980). Les chats présentent également une forte sensibilité à la peste et peuvent transmettre la maladie à l'homme par griffure, morsure ou toux (Doll *et al*, 1994).

Animaux résistants à la peste

Certains carnivores comme les chiens, les furets, les putois, les ours, les blaireaux, les coyotes, les ratons et les mouffettes, présentent une haute résistance naturelle à la peste : lorsque ces carnivores consomment des rongeurs infectés par *Y. pestis*, ils contractent la peste, mais sont capables de guérir spontanément (Perry & Fetherston, 1997). Les chevaux font aussi partie des animaux résistants : cette particularité a permis à Alexandre Yersin de développer son sérum anti-pesteux (Yersin, 1897).

La plupart des lignées de rongeurs de laboratoires sont habituellement sensibles à la peste ; cela ne doit pas occulter le fait que les rongeurs sauvages qui constituent le réservoir naturel de la peste ne meurent pas tous de la maladie (Gage & Kosoy, 2005). Ils sont décrits comme sensibles à l'infection et résistants à la maladie (Gratz, 1999). L'étude de lignées de laboratoire résistantes à la peste est un domaine récent (Blanchet *et al*, 2011) qui sera traité plus en détail dans la présentation du modèle murin.

Rôle des puces

Environ 80 espèces de puces peuvent être vectrices de *Y. pestis*. Le modèle classique dans l'étude de cette transmission est la puce du rat *Xenopsylla cheopis* (Bacot & Martin, 1914). Au cours du repas sanguin sur un rat infecté par *Y. pestis*, *X. cheopis* aspire le sang contenant la bactérie. Entre l'œsophage et l'intestin se trouve le proventricule, une section dont l'intérieur est tapissé de plusieurs épines destinées à casser les globules rouges. À cet endroit, la bactérie est capable de former une matrice extracellulaire particulièrement résistante, un biofilm, qui encombre, voire bloque le tractus digestif de la puce (Darby, 2008; Hinnebusch & Erickson, 2008). Lors des repas sanguins suivants, la puce bloquée n'arrive plus à ingérer efficacement le sang du

mammifère, et elle le recrache après qu'il soit entré en contact avec le biofilm infecté. La bactérie est ainsi injectée dans les couches superficielles de la peau du mammifère. L'obstruction provoquée par le biofilm empêchant l'alimentation de la puce et l'affamant, elle va multiplier ses tentatives de piqûre sur ce mammifère ou sur un autre, augmentant ainsi les chances de transmettre la bactérie (Bacot & Martin, 1914).



Figure 2 : Microphotographie de la puce du rat occidental *X. cheopis*, douze jours après un repas sanguin à partir d'une souris infectée avec *Y. pestis*. Source : CDC/Science Photo Library

Ce modèle de transmission par la puce avec formation d'un biofilm bloquant n'est pas observé chez toutes les espèces de puces. Ainsi la puce *Oropsylla montana* n'est que rarement bloquée par un biofilm bactérien, alors qu'elle est le principal vecteur de la peste en Amérique du Nord (Eisen *et al*, 2006). *O. montana* peut infecter un nouvel hôte avec *Y. pestis* immédiatement après s'être contaminée, alors qu'un délai de 12 à 16 jours d'incubation est requis pour former le biofilm bloquant. De plus, les puces continuent de se nourrir et ne meurent pas de faim, tout en demeurant capables d'assurer la transmission (Eisen *et al*, 2006). Ce deuxième modèle pourrait expliquer la vitesse de propagation de la peste durant les grandes pandémies (Eisen *et al*, 2006).

La peste en tant que maladie humaine

Un hôte occasionnel

Le cycle naturel de la peste ne fait pas intervenir l'homme : c'est un hôte accidentel de la bactérie, une victime secondaire d'une maladie qui affecte en premier lieu les rongeurs (Duplantier *et al*, 2005). La peste humaine résulte le plus souvent de la piqûre de l'homme par la puce d'un rongeur sauvage ou péri-domestique, de la consommation de viande d'animaux infectés ou du contact avec des animaux infectés (Stenseth *et al*, 2008).

Physiopathologie de la peste humaine

Selon la voie d'infection, la peste humaine peut prendre trois formes primitives : septicémique, pulmonaire et bubonique, par ordre croissant de temps d'incubation. Après quelques heures (peste septicémique) à quelques jours (peste bubonique), les

premiers symptômes apparaissent : fièvre, frissons, céphalées, nausées, vomissements, faiblesse généralisée (Stenseth *et al*, 2008; Pollitzer, 1954). Une coagulation intravasculaire disséminée peut survenir. Sans traitement rapide et efficace, les trois formes peuvent conduire à un choc septique, à la défaillance d'un ou plusieurs organes et à la mort.

La peste bubonique est la forme la plus courante de la maladie ; elle survient après la piqûre d'une puce infectée ou la contamination à travers une plaie superficielle (Doll *et al*, 1994; Pollitzer, 1954). Une phlyctène peut se développer au site de piqûre de la puce. Le signe caractéristique de la peste bubonique est une adénopathie : le ganglion drainant le site de l'infection, généralement à l'aîne, à l'aisselle ou dans la nuque, est gonflé et très douloureux. C'est le bubon, symptôme à l'origine du nom de cette forme de maladie. Une septicémie est fréquemment observée par la suite (Perry & Fetherston, 1997). Le taux de survie sans traitement est de l'ordre de 30 à 50% (Perry & Fetherston, 1997).

La peste pulmonaire primitive est causée par l'inhalation d'un aérosol de gouttelettes infectieuses (Stenseth *et al*, 2008), produites lorsqu'un patient ou un animal atteint de peste pulmonaire tousse. Après infection, les symptômes apparaissent dans un délai de quelques heures à trois jours (Prentice & Rahalison, 2007). Outre sa forte contagiosité, la peste pulmonaire est particulièrement mortelle : sans traitement, les chances de survie sont extrêmement faibles et la mort survient en quelques jours (Pollitzer, 1954).

La peste septicémique primitive est la conséquence d'une infection directe par voie sanguine, par exemple au travers d'une plaie ouverte. L'absence d'adénopathie et la présence de la bactérie dans le sang sont caractéristiques (Perry & Fetherston, 1997). Sans traitement, le patient peut succomber quelques heures après les premiers symptômes (Pollitzer, 1954).

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

Le genre *Yersinia*

Le genre *Yersinia* (van Loghem, 1944) compte actuellement dix-sept espèces : outre *Y. pestis*, il comprend les deux entéropathogènes *Yersinia pseudotuberculosis*

(Malassez & Vignal, 1883) et *Yersinia enterocolitica* (Schleifstein *et al*, 1939) et quatorze espèces non-pathogènes pour l'homme : *Yersinia ruckeri* (Ewing *et al*, 1978), *Yersinia intermedia* (Brenner *et al*, 1980), *Yersinia frederiksenii* (Ursing *et al*, 1980), *Yersinia kristensenii* (Bercovier *et al*, 1980b), *Yersinia aldovae* (Bercovier *et al*, 1984), *Yersinia rodhei* (Aleksic *et al*, 1987), *Yersinia mollaretii* (Wauters *et al*, 1988), *Yersinia bercovieri* (Wauters *et al*, 1988), *Yersinia aleksiciae* (Sprague & Neubauer, 2005), *Yersinia similis* (Sprague *et al*, 2008), *Yersinia massiliensis* (Merhej *et al*, 2008), *Yersinia entomophaga* (Hurst *et al*, 2011), *Yersinia nurmii* (Murros-Konttinen *et al*, 2011a) et *Yersinia pekkanenii* (Murros-Konttinen *et al*, 2011b).

Le genre *Yersinia* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*, dont il partage certaines caractéristiques : la forme de bacille droit, le résultat négatif à la coloration de Gram, l'absence de capsule, le caractère aéro-anaérobie facultatif, l'absence de sporulation, la culture non exigeante et l'absence d'une oxydase (Pollitzer, 1954; Perry & Fetherston, 1997).

Le genre *Yersinia* présente des propriétés non spécifiques : le diamètre du bacille varie entre 0,5 et 0,8 μm et sa longueur varie entre 1 et 3 μm ; au cours d'une culture dans un milieu liquide, les cellules peuvent pousser en chaînes de 4 à 5 éléments. Certaines particularités caractérisent aussi le genre *Yersinia* : le pourcentage G+C varie entre 46 et 47%, la croissance est plus lente que pour *Escherichia coli* (certaines espèces nécessitent environ 48 heures pour la croissance de colonies), la température optimale de croissance et d'expression des caractères biochimiques est comprise entre 25 et 30°C, la croissance est maintenue entre 0 et 45°C et la mobilité disparaît quand la température dépasse 30° (à l'exception de *Y. pestis* qui est toujours immobile) (Pollitzer, 1954; Perry & Fetherston, 1997).

Caractères biologiques de *Y. pestis*

Par rapport aux autres espèces du genre *Yersinia*, l'agent de la peste se distingue par quelques particularités. Comme mentionné plus haut, quelle que soit la température, *Y. pestis* est strictement immobile. Son temps de génération est de l'ordre de 2 heures en milieu LB (Pollitzer, 1954), 1,25 heure dans certains milieux définis (Perry & Fetherston, 1997). Le lipopolysaccharide de la paroi bactérienne est dépourvu des chaînes latérales d'antigène O. Contrairement à *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis* ne fermente ni le

rhamnose, ni le mélibiose (Brubaker, 1972) et ne possède pas d'uréase (Sebbane *et al*, 2001; Huang *et al*, 2006).

Y. pestis ne produit pas de capsule polysaccharidique. Toutefois, lorsque la température dépasse 33°C, cette espèce produit une enveloppe protéique appelée pseudocapsule ou fraction F1 (Perry & Fetherston, 1997).

Trois variétés de souches ont été distinguées à partir de critères biochimiques basés sur le métabolisme du glycérol et celui du nitrate : le biovar Antiqua (fermentation du glycérol et réduction des nitrates), le biovar Medievalis (fermentation du glycérol et absence de réduction des nitrates) et le biovar Orientalis (absence de fermentation du glycérol et réduction des nitrates). Le métabolisme de l'arabinose a été décrit pour la définition d'un quatrième biovar, Microtus (Zhou *et al*, 2004). La souche C092 est du biovar Orientalis et la souche KIM du biovar Medievalis.

Parenté avec *Y. pseudotuberculosis*

Y. pestis et *Y. pseudotuberculosis* sont génétiquement très proches : l'hybridation ADN-ADN démontre une homologie de plus de 90%, si bien que ces deux espèces forment, au sens de la taxonomie bactérienne, une même espèce (Bercovier *et al*, 1980a). Compte tenu de l'antériorité de la description de *Y. pseudotuberculosis*, les règles de nomenclature devraient les discriminer en deux sous-espèces de *Y. pseudotuberculosis*, respectivement *Y. pseudotuberculosis subsp. pestis* et *Y. pseudotuberculosis subsp. pseudotuberculosis*. Cette nomenclature a été rejetée en raison du risque de confusion et de ses conséquences en santé publique (Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology, 1985).

La comparaison des séquences de cinq gènes de ménage et d'un gène impliqué dans la synthèse du lipopolysaccharide a permis d'établir que *Y. pestis* est un clone récent de *Y. pseudotuberculosis* ; l'émergence de l'agent de la peste serait survenue il y a 1 500 à 20 000 ans (Achtman *et al*, 1999).

Les séquences des souches pathogènes de *Y. pestis* C092 (Parkhill *et al*, 2001) et *Y. pseudotuberculosis* IP32953 (Chain *et al*, 2004) ont été comparées (Chain *et al*, 2004). Soixante-quinze pourcents des gènes chromosomiques de la souche IP32953 ont présenté une identité nucléotidique supérieure ou égale à 97% avec leurs homologues chez *Y. pestis* C092. Cette étude a montré que 208 gènes de *Y. pseudotuberculosis* (5%

des séquences codantes) sont devenus pseudogènes chez *Y. pestis* et que 317 gènes de *Y. pseudotuberculosis* ont été perdus (Chain *et al*, 2004). Au cours de son évolution, le bacille de la peste a acquis 32 gènes (Chain *et al*, 2004). Vingt séquences d'insertion (IS) ont été recensées chez *Y. pseudotuberculosis* IP32953 et 138 chez *Y. pestis* C092 : ces IS expliquent la plasticité du locus *pgm* de son génome (Buchrieser *et al*, 1998; Fetherston & Perry, 1994).

Les facteurs de virulence de *Y. pestis*

Chez la plupart des souches de *Y. pestis*, trois plasmides de virulence sont présents (Perry & Fetherston, 1997). Le plus petit, d'une taille de 9,5 kilobases, est spécifique de *Y. pestis*. Ce plasmide est appelé pPCP1 –pesticine, coagulase, activateur du plasminogène– chez la souche KIM et pPla chez la souche C092. La dénomination pPst, parfois rencontrée, est liée à la présence du gène *pst* codant la protéine Pst : la pesticine est une bactériocine qui interrompt la synthèse de l'ADN et dégrade l'ARN des bactéries voisines (Elgat & Ben-Gurion, 1969). *Y. pestis* échappe à cette lyse à l'aide de la protéine d'immunité à la pesticine, codée par le gène *pim* (*pesticin immunity*) porté par le même plasmide. Le nom pPla également donné à ce plasmide rend compte de la présence de la protéine Pla, une protéase qui active le plasminogène de l'hôte ; la plasmine produite par cette activation permet à la bactérie de disséminer depuis un site d'infection sous-cutané jusqu'au foie et à la rate (Sodeinde *et al*, 1992). Pla dégrade le précurseur C3 du complément C5, et bloque ainsi le relargage par C5 du peptide C5a qui joue un rôle de chimio-attractant pour les granulocytes (Sodeinde *et al*, 1992). De plus, Pla semblerait également jouer un rôle d'invasine (Cowan *et al*, 2000; Kuttyrev *et al*, 1999).

Le deuxième en taille, d'une taille de 70 à 75 kilobases, est appelé pCD1 –sa présence induit une dépendance au calcium à 37 °C (Portnoy & Falkow, 1981)– ou pYV –il est associé à la virulence du genre *Yersinia*–. Cette deuxième dénomination met en valeur le fait qu'il soit commun aux trois espèces virulentes du genre *Yersinia*. Ce plasmide porte les gènes codant les composants d'un système de sécrétion de type III, ainsi que les effecteurs sécrétés (Perry & Fetherston, 1997). Ces derniers sont appelés Yops pour « *Yersinia* outer proteins » : ils inhibent la phagocytose et la réponse pro-inflammatoire.

Le troisième plasmide est spécifique de *Y. pestis* ; il est appelé plasmide pMT1 –il code la toxine murine– ou pFra –il code aussi la Fraction F1–. Selon les souches

examinées, la taille varie de 60 (Perry *et al*, 1990) à 280 kilobases (Filippov *et al*, 1990) ; dans la souche CO92, sa taille varie entre 100 et 110 kilobases (Parkhill *et al*, 2001). Le plasmide peut être intégré dans le chromosome (Perry & Fetherston, 1997). La toxine murine Ymt est une phospholipase D codée par le gène *ymt* ; elle est indispensable à la survie dans le proventricule de la puce et semble protéger *Y. pestis* de facteurs antibactériens produits lorsque la puce digère le plasma sanguin (Hinnebusch *et al*, 2002b). La fraction F1 est un polypeptide codée par le gène *caf1* et constitue la pseudocapsule : cette enveloppe protège *Y. pestis* de la phagocytose (Du *et al*, 2002). Cependant, les souches de *Y. pestis* mutantes *caf1* conservent leur virulence dans les modèles murins et de primates (Friedlander *et al*, 1995).

Y. pestis possède un îlot de haute pathogénicité (HPI) d'environ 35 kilobases. Cet îlot de haute pathogénicité, commun à *Y. pseudotuberculosis* et aux seules souches pathogènes de *Y. enterocolitica* (Buchrieser *et al*, 1999; Carter, 1975), est lui-même contenu dans un locus instable du chromosome, associé à la pigmentation : le locus *pgm* (pigmentation) (Fetherston *et al*, 1992; Buchrieser *et al*, 1999). Cet îlot contient les gènes responsables de la synthèse, de la régulation et du transport transmembranaire d'un sidérophore, la yersiniabactine Ybt (Bearden *et al*, 1997). Le fer est un élément essentiel à la fois pour la bactérie et pour son hôte. Au moment de l'infection, *Y. pestis* doit s'adapter à un environnement dans lequel le fer est séquestré dans les métalloprotéines et la ferritine des cellules de l'hôte. Ybt permet à la bactérie de capturer le fer lié à certaines protéines eucaryotes.

Un bactériophage de 8,7 kb est inséré dans le chromosome de *Y. pestis* CO92 (Derbise *et al*, 2007). Ce bactériophage, Ypf Φ , fait partie des phages filamenteux, qui peuvent être sécrétés sans provoquer la lyse de la bactérie infectée. Ypf Φ est absent du génome de *Y. pseudotuberculosis* IP32953 et *Y. pestis* KIM10+ (Chain *et al*, 2004). Sa structure présente des similitudes avec le phage filamenteux CTX Φ essentiel à la virulence de son hôte *Vibrio cholerae*. L'absence de Ypf Φ réduit légèrement la virulence de *Y. pestis* (Derbise *et al*, 2007).

D'autres facteurs de virulence, non spécifiques de *Y. pestis*, sont aussi présents sur le chromosome. Le Tableau 1 propose un récapitulatif des différents facteurs de virulence de cette bactérie et de son ancêtre.

Support génétique	Gène	Protéine codée	Fonctions	Situation		Référence
				<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. pestis</i>	
pFra	<i>ymt</i>	phospholipase D Ymt	Survie chez la puce	absent	présent	(Hinnebusch <i>et al</i> , 2002a)
	<i>caf1</i>	Antigène F1	Composant de la pseudocapsule, anti-phagocytose	absent	présent	(Du <i>et al</i> , 2002)
pPla	<i>pla</i>	protéase Pla	Invasine, active le plasminogène, facilite la dissémination	absent	présent	(Cowan <i>et al</i> , 2000; Sodeinde <i>et al</i> , 1992)
pYV	<i>yadA</i>	Adhésine YadA	Adhésion aux cellules de l'hôte et invasion	présent	pseudogène	(Prior <i>et al</i> , 2001)
	<i>yopE</i>	YopE	Effecteur inhibant la polymérisation de l'actine	présent	présent	(Mohammadi & Isberg, 2009; Day <i>et al</i> , 2003)
	<i>yopO</i>	YopO		présent	présent	(Groves <i>et al</i> , 2010)
	<i>yopT</i>	YopT		présent	présent	(Viboud <i>et al</i> , 2006; Mohammadi & Isberg, 2009)
	<i>yopH</i>	YopH	Effecteur inhibant la phagocytose	présent	présent	(Sauvonnet <i>et al</i> , 2002; Bartra <i>et al</i> , 2001)
	<i>yopJ</i>	YopJ	Effecteur inhibant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et induisant l'apoptose des phagocytes	présent	présent	(Zhou <i>et al</i> , 2005)
	<i>ysc</i>	Ysc	Composants du système de sécrétion et translocation des Yops	présent	présent	(Michiels <i>et al</i> , 1990)
	<i>yopB</i>	YopB		présent	présent	(Rosqvist <i>et al</i> , 1995)
	<i>yopD</i>	YopD		présent	présent	
	<i>lcrV</i>	antigène V LcrV		présent	présent	(Mueller <i>et al</i> , 2005; Pouliot <i>et al</i> , 2007)

Support génétique	Gène	Protéine codée	Fonctions	Situation		Référence
				<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. pestis</i>	
Chromosome	<i>hmsHFRST</i>	HmsHFRST	Formation du biofilm chez la puce	présent	présent	(Jarrett <i>et al</i> , 2004)
	<i>ail</i>	Adhésine et invasive Ail	Adhésion aux cellules de l'hôte et invasion, inhibition du complément	présent	présent	(Hinnebusch <i>et al</i> , 2011)
	<i>yadBC</i>	Invasine YadBC	Adhésion aux cellules de l'hôte et invasion	présent	présent	(Forman <i>et al</i> , 2008)
	<i>psaA</i>	Fimbriae PsaA, Antigène pH6	Adhésion aux cellules de l'hôte, protection contre la phagocytose	présent	présent	(Huang & Lindler, 2004)
	<i>inv</i>	Invasine Inv	Invasion des cellules de l'hôte	présent	pseudogène	(Simonet <i>et al</i> , 1996)
	<i>gmd, ddhA, wbyl, fcl, wzy</i>	Antigène O	Activation du récepteur TLR4	présent	absent	(Skurnik <i>et al</i> , 2000)
	<i>yfe</i>	Yfe	Acquisition de fer libre	présent	présent	(Bearden & Perry, 1999)
HPI	<i>ybtETUS, irp1 etirp2</i>	yersiniabactine Ybt	Capture du fer lié aux protéines de l'hôte	présent	présent	(Buchrieser <i>et al</i> , 1999; Bearden <i>et al</i> , 1997)
YpfΦ	YPO2270-2281	protéines phagiques	Non connus	absent	présent	(Chouikha <i>et al</i> , 2010; Derbise <i>et al</i> , 2007)

Tableau 1 : principaux facteurs de virulence de *Y. pestis* et de *Y. pseudotuberculosis*

Le modèle murin utilisé en physiopathologie de la peste

Recours aux modèles animaux

Les connaissances accumulées sur la peste humaine repose sur l'épidémiologie, les observations cliniques, l'analyse des prélèvements (sang, ponction de bubons, expectorations) et les examens *post-mortem*. Plusieurs modèles d'infection expérimentale sur animaux ont été utilisés pour reproduire la peste sur rongeurs et primates non humains (Welkos *et al*, 2002), afin d'évaluer l'efficacité des vaccins (Russel *et al*, 1995) et des traitements antibiotiques (Heine *et al*, 2007) ou la virulence de souches mutantes (Congleton *et al*, 2006), ou pour caractériser la réponse immune de l'hôte (Demeure *et al*, 2011).

L'expérimentation animale trouve sa validité dans la proximité entre certaines espèces jouant le rôle de réservoirs de la peste et certains modèles animaux utilisables en laboratoire, en particulier les rongeurs. Ainsi, le rat est l'un des modèles pour la description de la peste bubonique (Sebbane *et al*, 2005) et de la peste pulmonaire (Agar *et al*, 2009).

Les lignées murines de laboratoire

Une lignée de laboratoire est une population artificielle créée par l'homme dans le but de disposer d'une population homogène au niveau génétique, avec un génotype défini. La plupart des lignées de souris élevées en animalerie depuis plusieurs générations présentent généralement une grande sensibilité à la peste, à l'exemple des lignées consanguines, telles C57BL/6J, BALB/cByJ, et BALB/cAnNHsd (Turner *et al*, 2008), ou non consanguines comme la lignée OF1 (Hurtrel *et al*, 1981) et la lignée CD1 (Bubeck *et al*, 2007).

Dans un modèle d'infection intraveineuse avec une souche KIM5 de virulence atténuée à la suite de la délétion du locus *pgm*, la lignée consanguine BALB/cJ, apparentée aux autres lignées BALB, a présenté une résistance significative : la dose létale à 50% (DL₅₀) est supérieure à 13 000 UFC pour cette lignée murine alors qu'elle est inférieure à 50 UFC chez les autres lignées BALB (Turner *et al*, 2008). La comparaison du génome de ces lignées de souris a montré qu'un locus du chromosome 17 a joué un rôle majeur dans la résistance de la lignée BALB/cJ.

En comparaison de ces lignées de souris « domestiques » *Mus musculus*, la lignée SEG de souris « sauvages » de l'espèce *Mus spretus* présente une bien moindre sensibilité à la peste. Dans un modèle d'injection sous-cutanée de 100 unités formant colonies (UFC) de *Y. pestis*, les femelles et les mâles présentent une résistance de respectivement 90% et 68% (Blanchet *et al*, 2011). En comparaison, la même injection de 100 UFC tue 92% des souris *M. musculus* C57BL/6J. La même étude indique qu'une dose de 10^7 UFC tue moins de la moitié des souris SEG. L'analyse par croisement de lignées a permis d'identifier chez les femelles trois loci de caractères quantitatifs (QTL) significatifs sur les chromosomes 3, 4 et 6, tandis que les mâles présentent uniquement le QTL du chromosome 6. Chacun des QTL augmente le taux de survie d'environ 20% par rapport à la lignée C57BL/6J et leur effet est cumulatif (Blanchet *et al*, 2011).

Physiopathologie de la peste bubonique chez la souris

Dans un modèle murin de peste bubonique, *Y. pestis* dissémine depuis le site d'infection sous-cutané vers le ou les ganglions lymphatiques les plus proches ; cette dissémination est facilitée par l'activité protéolytique de Pla (Sodeinde *et al*, 1992), mais l'absence de Pla n'empêche pas la dissémination (Welkos & Friedlander, 1996; Pouillot *et al*, 2005). Pendant tout le processus infectieux, *Y. pestis* conserve un mode de vie extra-cellulaire (Guinet *et al*, 2008) : la bactérie prolifère massivement dans les ganglions lymphatiques sans induire de réaction immunitaire organisée (Brubaker, 1991; Guinet *et al*, 2008), à l'aide de ses mécanismes anti-phagocytaires. Les ganglions infiltrés par *Y. pestis* ne présentent pas d'abcès et sont nécrosés. *Y. pestis* dissémine vers les organes distants, tels que le foie et la rate (Sodeinde *et al*, 1992; Prentice & Rahalison, 2007). La prolifération des bactéries, faiblement contrôlée par le système immunitaire, conduit à la septicémie et à la mort par choc septique (Ayyadurai *et al*, 2010) ou défaillance des organes (Sha *et al*, 2008).

La dose létale à 50% chez les lignées sensibles à la peste est généralement inférieur à 10 UFC (Brubaker, 1991; Perry & Fetherston, 1997).

Limites de ces modèles

Le modèle murin a permis d'approfondir de façon considérable la connaissance de la physiopathologie de la peste. Néanmoins, ce modèle est sujet à une limitation majeure des modèles animaux : la variabilité inhérente aux phénomènes biologiques.

Une illustration très claire de cette variabilité est le concept de dose létale à 50% qui sert de mesure habituelle de la virulence d'un agent pathogène : la DL_{50} est définie comme l'inoculum mortel pour la moitié d'une population étudiée.

Compte tenu de cette variabilité, chaque individu ne permet de tirer que des observations particulières ; pour obtenir des conclusions générales, il est nécessaire d'étudier des groupes aux effectifs conséquents dans le but de produire des résultats statistiquement significatifs. Le recours à des dizaines ou des centaines d'animaux pour chaque condition testée soulève de nombreuses questions en termes de coûts, de quantité de travail, mais aussi d'impact éthique, dans un contexte où l'accès à l'expérimentation animale est de plus en plus délicat.

La bioluminescence

Un phénomène naturel

La bioluminescence est l'émission de lumière visible par un être vivant au moyen d'une réaction biochimique convertissant de l'énergie chimique en énergie lumineuse. Ce phénomène peut être rencontré chez de nombreuses espèces marines, comme le dymophyte (algue microscopique) *Lingulodinium polyedrum*, le crustacé *Gaussia princeps* ou les poissons-lanternes de la famille des *Myctophidae*. La capacité d'exprimer la bioluminescence peut varier de 1 à 2% des espèces dans les eaux côtières de faible profondeur (Morin, 1983) jusqu'à 90% des animaux dans la zone mésopélagique, située entre 200 et 1000 mètres de profondeur, où la lumière est absente (Vestheim & Kaartvedt, 2006; Herring, 1983). Cette capacité existe aussi chez des champignons (Desjardin *et al*, 2008), des arthropodes terrestres et des vers de terre (Oba *et al*, 2011).

Plusieurs bactéries possèdent la capacité de produire de la bioluminescence. *Vibrio fischeri* est la source de lumière de la pieuvre d'Hawaï *Euprymna scolopes* et aussi l'organisme modèle pour la description du premier système de *quorum-sensing* (Nealson, Platt & Hastings, 1970). Une autre bactérie bioluminescente d'intérêt en microbiologie est *Photobacterium luminescens*, qui colonise le tractus intestinal des nématodes de la famille *Heterorhabditidae* (Bowen & Ensign, 1998).

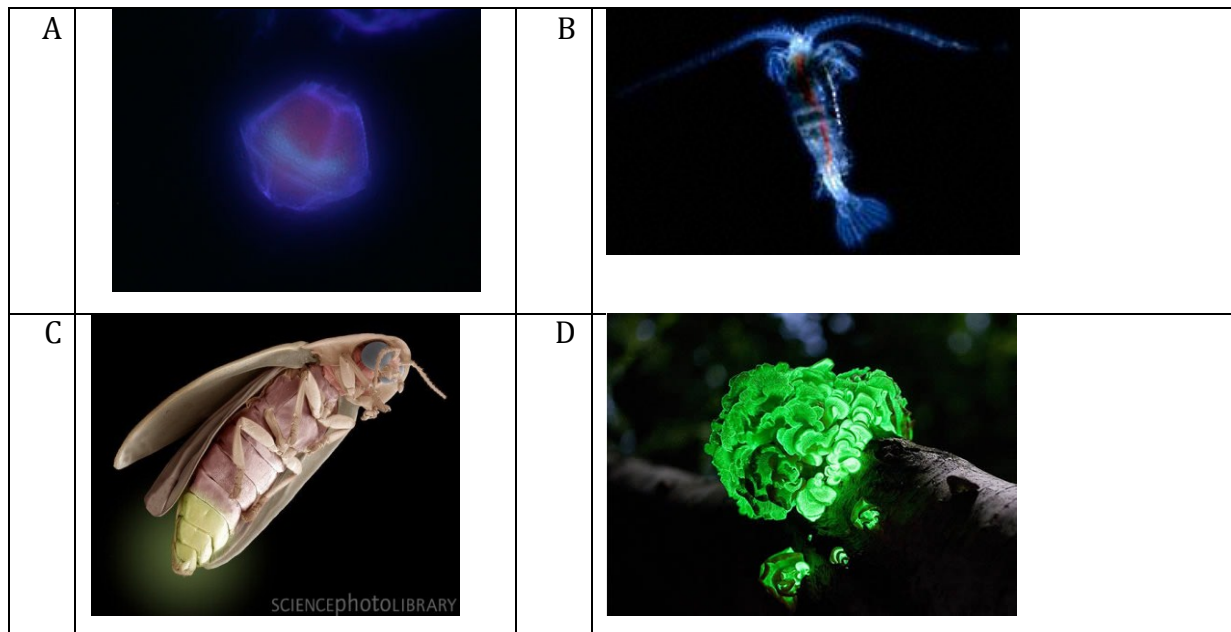


Figure 3 : illustrations de quelques animaux bioluminescents
 A) le dinoflyte *L. polyedrum* (Susan Coale, Center for Integrated Marine Technologies) ; B) le crustacé *G. princeps* (T. Frank, Ocean Research and Conservation Association) ; C) une luciole de la famille des *Lampyridae* (Steve Gschmeissner/Science Photo Library) ;D) le champignon terrestre *Panellus stypticus* (Wikimedia Commons).

Plusieurs fonctions naturelles ont été attribuées à la bioluminescence (Haddock *et al*, 2010) :

Attraction : dans la plupart des cas, les émissions de bioluminescence naturelle permettent d'attirer des individus. La bioluminescence permet la communication entre partenaires reproducteurs, sert d'appât déployé par un prédateur pour capturer sa proie, voire d'appât pour une proie qui peut attirer le prédateur de son prédateur. Pour certains champignons terrestres, la dispersion des spores peut être facilitée en attirant des insectes grâce à la lumière.

Camouflage : en journée dans le milieu marin, un animal au corps opaque peut facilement être détecté par un prédateur situé sous lui, lorsque sa silhouette bloque la faible lumière du soleil et se détache sur le plafond lumineux. En produisant de la lumière sur sa face ventrale, il apparaît comme transparent et échappe à la détection du prédateur.

Répulsion : certaines pieuvres éjectent un mélange de réactifs bioluminescents pour se protéger d'un prédateur. Celui-ci sera effrayé par la source de lumière ou au contraire attiré vers elle en se détournant de la proie.

Communication : la bioluminescence permet à certaines bactéries d'acquérir une information sur le nombre d'individus. C'est le *quorum-sensing* identifié chez *V. fischeri*. Elle pourrait aussi permettre la reconnaissance entre individus d'une même espèce.

Éclairage : la lumière produite par bioluminescence peut servir à éclairer la zone d'atterrissage de certains insectes des genres *Pyrophorus* et *Photuris*, ou l'environnement et les proies des prédateurs de certains poissons.

Protection contre le stress oxydatif : chez tous les organismes aérobies, le métabolisme utilisant l'oxygène requiert une défense contre le stress oxydatif, causé par des formes délétères de l'oxygène, communément appelées « radicaux libres ». La luciférine, réactif consommé lors de chaque réaction de bioluminescence, présente d'excellentes qualités anti-oxydantes. Son apparition peut être liée à une forme de défense, la production de lumière étant alors un produit accidentel du stress oxydatif. Cette thèse demeure très controversée.

Il est important de distinguer la bioluminescence de la fluorescence et de la phosphorescence : ces deux phénomènes correspondent à l'émission de lumière provenant d'une ou plusieurs molécules, à la suite d'une excitation lumineuse, et après modification de la longueur d'onde par une ou plusieurs molécules. L'énergie lumineuse provient de l'excitation initiale. Au contraire, la bioluminescence ne requiert pas d'excitation initiale pour la production de lumière, puisque l'énergie lumineuse provient de la réaction biochimique. L'une des conséquences pratiques de cette distinction est le fait que la bioluminescence requiert une activité métabolique, et donc le maintien en vie du tissu bioluminescent.

Mécanismes chimiques

À l'origine de la production de lumière, se trouve une réaction chimique exergonique, l'oxydation d'un substrat appelé « luciférine », catalysée par une enzyme appelée « luciférase » en présence de dioxygène (Wiles *et al*, 2009). Ces deux appellations désignent moins des molécules bien précises qu'une catégorie de substrats et d'enzymes. De la même façon, le terme générique « oxyluciférine » désigne le produit de l'oxydation de la luciférine.

Les trois systèmes de bioluminescence les plus répandus dans le domaine des biotechnologies utilisent la luciférine bactérienne, la coelentérazine et la luciférine de luciole.

Luciférine et luciférase bactériennes

Présente avec peu de variations chez *P. luminescens* et *V. fischeri*, la luciférine bactérienne est constituée d'une flavine mononucléotide réduite (riboflavine-5'-phosphate, FMNH₂) et d'un aldéhyde à chaîne aliphatique de 8 à 14 atomes de carbone qui sert de cofacteur (Dunlap & Kita-Tsukamoto, 2006). La flavine mononucléotide est synthétisée par la riboflavine kinase, enzyme non spécifique des espèces bioluminescentes, et l'aldéhyde est synthétisé par un complexe enzymatique composé des protéines codées par les gènes *luxC*, *D* et *E*.

La luciférase bactérienne est un hétérodimère composé des sous-unités α (masse : 40 kDa) et β (masse : 37 kDa). Ces deux sous-unités sont respectivement codées par les gènes *luxA* et *luxB*. Les gènes codant la luciférase bactérienne et le complexe enzymatique sont organisés dans l'opéron *luxCDABE*.

Au cours d'une réaction catalysée par la luciférase LuxAB, le dioxygène moléculaire O₂ oxyde FMNH₂ en flavine mononucléotide (FMN) et l'aldéhyde en acide gras. La réduction simultanée produit une molécule d'eau. La réaction complète libère de l'énergie sous forme lumineuse :



Coelentérazine et luciférase marine

Produite chez de nombreuses espèces marines (Shimomura, 2006; Haddock *et al*, 2010), la coelentérazine est utilisée comme substrat unique pour des luciférases différentes : Rluc de la pensée de mer *Renilla reniformis*, Gluc de *G. princeps*. Chez la méduse *Aequorea victoria*, la coelentérazine est intégrée dans une photoprotéine qui réagit à la présence d'ions calcium Ca²⁺ en déclenchant la réaction bioluminescente (Shimomura & Johnson, 1976).

Réactions de bioluminescence chez la luciole

La luciférine de la luciole (*Luciola spp.*) et du ver luisant (*Lampyridae spp.*) est l'acide 2-(4-hydroxybenzothiazol-2-yl)-2-thiazoline (Fraga, 2008). La réaction requiert un apport d'énergie *via* l'ATP et la présence de magnésium et d'oxygène.

Suivi d'infection grâce à la bioluminescence

Avantages du suivi d'infection par la bioluminescence

Le phénomène de bioluminescence est mis à profit dans plusieurs types d'expérimentation : dosage d'ATP, profil d'expression par gène rapporteur, étude de la viabilité bactérienne en réponse à un traitement et suivi d'infection. Le suivi d'infection par bioluminescence présente des avantages nets, en comparaison d'un suivi d'infection classique qui nécessite l'euthanasie de l'animal et les prélèvements d'échantillons : les données sont obtenues *in vivo* en temps réel ; elles présentent un caractère qualitatif et quantitatif ; l'expérimentation est rapide, non-invasive et facilement répétable. L'acquisition peut être réalisée sur l'animal entier, plutôt que sur une sélection d'organes prélevés ; de plus, chaque animal maintenu en vie devient son propre témoin au cours du suivi, si bien que l'observation ne nécessite plus un groupe témoin pour chaque point. Le suivi par bioluminescence répond à deux objectifs de la Règle des 3R (Russell & Burch, 1959), à savoir la réduction et le raffinement des mesures.

En tant que méthode de suivi d'infection, la bioluminescence se démarque des autres méthodes comme le marquage par les radioéléments et les sondes immunologiques : elle est moins délétère pour les organismes que les radioéléments et moins altérée par le bruit de fond que la fluorescence. Du fait de l'absorption de lumière par les tissus, elle ne permet pas une détection à des profondeurs de plus de quelques centimètres, mais demeure tout indiquée pour le petit animal.

Mode opératoire

Plusieurs appareils sont disponibles pour l'imagerie du petit animal en bioluminescence. Ils possèdent plusieurs caractéristiques communes : une chambre noire, parfaitement hermétique pour réduire les sources de lumières externes, maintenue en conditions de température physiologique et une caméra de type CCD (*Charge-Coupled Device*) avec une résolution adaptée à la taille de l'animal et une sensibilité améliorée grâce au dispositif de refroidissement. Une prise de vue typique en

bioluminescence consiste dans un premier temps à prendre une photographie conventionnelle en éclairant l'animal, puis à réaliser une acquisition sans éclairage pour détecter la bioluminescence. Cette acquisition peut durer de quelques secondes à quelques minutes, en fonction de l'intensité du signal. Les deux images sont ensuite combinées, et l'intensité de la bioluminescence est restituée grâce à de fausses couleurs.

Compte tenu de la succession de ces étapes et de leur durée, il est important que l'animal observé reste relativement immobile pendant la prise de vue. Sur une image globale de l'animal, le mouvement lié à la respiration peut-être négligeable mais le mouvement d'une patte empêchera l'association entre source lumineuse et position anatomique. La contention par l'expérimentateur est insuffisante et une contention fixe risque de blesser l'animal. La solution de choix est donc l'anesthésie générale de l'animal.

La lumière émise par des sources situées à l'intérieur de l'animal est partiellement absorbée par les tissus et le sang, ainsi que le pelage de l'animal. Cette absorption dépend de la longueur d'onde de la lumière, de l'épaisseur du tissu traversé et, dans le cas du pelage, de la couleur de celui-ci : un pelage blanc contient moins de mélanine qu'un pelage noir et absorbe moins de lumière. En conséquence, un signal déjà réduit en sortant de la peau de l'animal peut devenir indétectable sous un pelage sombre. À moins de raser ce pelage, il est donc préférable de recourir à des animaux au pelage clair.

Avant de pouvoir quantifier par bioluminescence la présence de bactéries dans un organe, il est nécessaire d'établir une régression linéaire entre la lumière émise par des zones délimitées et identifiées comme les organes et le nombre de bactéries se trouvant effectivement dans ces organes, qui aura été déterminé par un autre moyen.

Exemples de suivis d'infection par bioluminescence

Plusieurs organismes pathogènes ont été suivis en conditions d'infection grâce à la bioluminescence. Depuis le travail réalisé avec la bactérie *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Contag *et al*, 1995), plusieurs infections ont pu être suivies par cette méthode : les bactéries *Streptococcus pneumoniae* (Francis *et al*, 2001) et *Escherichia coli* (Lane *et al*, 2007), le champignon *Aspergillus fumigatus* (Brock *et al*, 2008) et le virus responsable de la Fièvre du Nil Occidental (Gommet *et al*, 2011) en font partie. Parmi les

agents pathogènes de classe A définis par les Centers for Disease Control and Prevention d'Atlanta, les bactéries *Bacillus anthracis* et *Francisella tularensis*, respectivement responsables de la maladie du charbon et de la tularémie ont aussi été suivies en temps réel chez l'animal grâce à la bioluminescence (Glomski *et al*, 2007; Bina *et al*, 2010).

Suivis d'infection par bioluminescence chez les Yersinia

Les deux entéropathogènes du genre *Yersinia* ont également été suivis *in vivo* au cours de l'infection à l'aide d'un opéron de bioluminescence exprimé de façon constitutive ou placé sous contrôle d'un promoteur d'intérêt.

Utilisation chez *Y. enterocolitica*

Chez *Y. enterocolitica*, l'opéron *luxCDABE* a été cloné dans le chromosome en aval du gène *glmS* afin de suivre une infection par voie orale ou intraveineuse et l'observation des organes après dissection d'un animal (Trcek *et al*, 2010a). L'opéron *luxCDABE* a été placé sous contrôle du promoteur P_{BAD} inductible en présence de L-arabinose. L'injection de L-arabinose a donc été nécessaire à chaque observation : elle a été réalisée 2 à 5 heures avant l'observation. Un jour après l'infection par voie orale, des signaux sont apparus dans la cavité nasale et les ganglions cervicaux. L'observation par bioluminescence a permis de révéler la colonisation des ganglions cervicaux après une infection orale par *Y. enterocolitica*. Trois jours après l'infection, la colonisation de l'intestin a été détectée sous la forme de plusieurs signaux lumineux ponctuels que les auteurs ont associés à la colonisation des plaques de Peyer. Après l'infection par voie intraveineuse, aucun signal n'a été détecté dans les ganglions cervicaux, mais l'invasion des poumons a été observée. Les observations *ex vivo* d'organes prélevés sur des souris infectées par voie orale et euthanasiées à différents temps après infection ont révélé des abcès chargés de bactéries dans les plaques de Peyer, le cæcum, les ganglions lymphatiques cervicaux, la rate et le foie. Pour vérifier l'effet du gène *inv* (codant l'invasine) dans la colonisation des plaques de Peyer, l'opéron *luxCDABE* sous contrôle du promoteur P_{BAD} a été cloné de façon similaire dans le chromosome d'une souche chez laquelle le gène *inv* avait été inactivé. Les souris ont été infectées par voie orale avec l'une ou l'autre des souches bioluminescentes, euthanasiées 5, 6 ou 7 jours après infection et les intestins ont été observés afin de compter le nombre de plaques de Peyer présentant des signaux de bioluminescence. Quel que soit le jour d'observation, le mutant Δinv a colonisé significativement moins de plaques de Peyer que la souche

possédant le gène *inv*, ce qui indique que la mutation Δinv a provoqué une réduction de la capacité à coloniser les plaques de Peyer plutôt qu'un retard dans le processus. Dans cette étude, les plaques de Peyer dans lesquels *Y. enterocolitica* a exprimé le gène *inv* ont été identifiées grâce à l'imagerie de bioluminescence de façon particulièrement rapide, en comparaison des techniques nécessitant d'extraire les bactéries et de les préparer pour mesurer la quantité de protéines Inv produites (Western blot) ou la quantité d'ARN messager (qRT-PCR).

Une fusion transcriptionnelle chromosomique de l'opéron *luxCDABE* avec le promoteur du gène *inv* codant l'invasine a été construite chez *Y. enterocolitica* (Trcek *et al*, 2010b). L'expression *in vitro* de ce gène a été comparée dans deux conditions de température et trois phases de croissance chez une souche hautement pathogène du sérotype O:8 et une souche peu virulente du sérotype O:9. Chez les deux souches, l'expression a été plus importante à 27°C qu'à 37°C et plus importante en phase stationnaire qu'en phase de croissance exponentielle. L'activité du promoteur $P_{inv(O:9)}$ a été quatre fois plus importante que celle $P_{inv(O:8)}$; cette différence a aussi été vérifiée lorsque la fusion $P_{inv(O:8)}::luxCDABE$ est placée dans le contexte génétique de la souche de sérotype O:9. La différence d'activité entre les promoteurs $P_{inv(O:8)}$ et $P_{inv(O:9)}$ a donc bien été une conséquence de la régulation spécifique du promoteur et non une conséquence du contexte génétique. La souche du sérotype O:8 dotée de la fusion $P_{inv(O:8)}::luxCDABE$ a aussi été utilisée dans un suivi d'infection par voie orale ou par voie intraveineuse. Dans le modèle d'infection par voie orale, des signaux luminescents provenant des plaques de Peyer ont été détectés dès le premier jour et leur intensité a augmenté pendant les trois premiers jours après l'infection. Aucune expression du gène *inv* n'a été détectée chez les bactéries récupérées par lavage de la lumière intestinale ; l'expression de *inv* par *Y. enterocolitica* a donc été spécifique de la colonisation des plaques de Peyer. Trois jours après l'infection, les souris ont été euthanasiées et plusieurs organes ont été prélevés pour détecter l'activité de $P_{inv(O:8)}$: la bioluminescence a été détectée dans plusieurs plaques de Peyer, le follicule lymphatique caecal et les ganglions lymphatiques cervicaux, tandis que l'intestin (hors plaques de Peyer), le foie et la rate n'ont pas émis de lumière. Pour obtenir une colonisation systémique, une infection par voie intraveineuse a ensuite été réalisée et les souris ont été suivies quotidiennement. Plusieurs signaux sont apparus dans le corps des souris de J2 à J4 et n'ont pas été associés à des organes. À J4, les souris ont été euthanasiées, et les organes suivants ont

été observés : la rate, le foie, les poumons et le tractus gastro-intestinal. Tous ont émis de la lumière –au niveau du tractus gastro-intestinal, cette lumière a été émise par les tissus lymphoïdes–. Ces résultats ont montré que le gène *inv* a été exprimé non seulement dans les tissus lymphoïdes du tractus gastro-intestinal mais aussi dans le foie, la rate et les poumons.

Utilisation chez *Y. pseudotuberculosis*

Une souche virulente et bioluminescente de *Y. pseudotuberculosis* a été récemment commercialisée par la société Caliper Life Sciences. Cette souche, notée YPIII/pIB1-XEN4, a été obtenue en clonant l'opéron *luxCDABE* sous expression constitutive –le promoteur n'a pas été précisé– dans le plasmide pYV chez la souche virulente YPIII. La comparaison des suivis d'infection par voie intragastrique par cette souche sauvage et par trois mutants pour le gène *yopE* a été réalisée (Isaksson *et al*, 2009). Le gène *yopE* code la protéine activatrice de GTPase (GAP) YopE qui transite par le système de sécrétion de type III et cible des petites Rho GTPases de la cellule hôte, en particulier Rac1 et RhoA. Une partie de la séquence de la protéine, le *Membrane Localization Domain* (MLD), est essentielle pour que la protéine se concentre dans la région périnucléaire de la cellule hôte. Trois mutants *yopE* isogéniques de la souche YPIII/pIB1-XEN4 ont été construits : YPIII/pIB1-XEN4 $\Delta yopE$ chez lequel le gène *yopE* a été délété en totalité, YPIII/pIB1-XEN4 *yopE* Δ 50-74 chez lequel le domaine MLD a été délété, et un mutant de substitution YPIII/pIB1-XEN4 *yopE*(R144A) chez lequel le site associé à la fonction GAP de YopE est affecté. Chaque souche a été utilisée pour infecter par voie orale un groupe de souris qui ont ensuite été suivies en bioluminescence quotidiennement : la quantité totale de lumière émise par le corps de l'animal a été mesurée. À J1, l'intensité totale d'émission par animal a été similaire. À J3, les souris infectées par les trois mutants *yopE* ont émis au total 10 fois moins de lumière par animal que celles infectées par la souche sauvage. À J6, deux souris infectées par la souche YPIII/pIB1-XEN4, mourantes, ont été euthanasiées. Les signaux de bioluminescence du corps entier ont été très faibles, ce que les auteurs ont attribué à l'atteinte d'organes plus profonds et au pelage ébouriffé des animaux qui aurait dispersé la lumière. L'état des autres souris infectées par YPIII/pIB1-XEN4 et de celles infectées par les souches mutantes n'a pas été décrit. À J9, les souris infectées par la souche YPIII/pIB1-XEN4 $\Delta yopE$ n'ont plus présenté aucun signal ; les signaux de bioluminescence émis par les souris infectées par YPIII/pIB1-XEN4 *yopE* Δ 50-74 et

YPIII/pIB1-XEN4 *yopE*(R144A) ont été très faibles, alors que les souris infectées par YPIII/pIB1-XEN4 ont encore émis un signal élevé. À J13, une seule souris infectée avec la souche YPIII/pIB1-XEN4 avait survécu et a présenté une intensité de signal élevé dans le corps ; aucune souris infectée par un des mutants *yopE* n'a présenté de signal lumineux. La différence de mortalité et d'intensité de bioluminescence a montré que la virulence complète de *Y. pseudotuberculosis* a nécessité à la fois le domaine MLD et le domaine GAP fonctionnels. Dans cette étude, les auteurs n'ont pas cherché à identifier les organes sources des signaux lumineux et ont utilisé le signal entier du corps comme élément de comparaison entre les groupes infectés.

Une autre souche constitutivement bioluminescente de Caliper Life Sciences, YPIII(pCD1, Xen4), a été utilisée dans une étude comparée de virulence (Thorslund *et al*, 2011) entre cette souche et deux souches isogéniques : chez l'une, le gène *yopK* a été inactivé par délétion ; chez l'autre, le gène *yopK* a été muté (*yopK^{AA}*) de façon à réaliser les substitutions (T45A, D46A) dans la protéine YopK. La protéine YopK fait partie des effecteurs Yop sécrétés par l'injectisome dans la cellule eucaryote ; elle aurait un rôle de régulation dans la translocation des effecteurs Yop. Après infection par voie orale avec la souche de référence ou l'un des mutants, des souris ont été observées à J3, J8, J10 et J13. Bien que les signaux de bioluminescence n'aient été émis qu'au niveau de l'abdomen des animaux, les intensités totales de signal lumineux ont été mesurées dans le corps entier de l'animal pour permettre des comparaisons entre les groupes infectés avec les différentes souches. L'intensité totale de signal lumineux n'a pas été significativement différente entre les groupes infectés par les trois souches bactériennes à J3, puis à J8. À J10 et J13, ces intensités ont été significativement moindres chez les souris infectées par les souches mutantes que chez les souris infectées par YPIII(pCD1, Xen4). Les deux mutants $\Delta yopK$ et *yopK^{AA}* ont présenté une virulence atténuée au cours de l'infection et cette atténuation a été similaire entre les deux mutants. Comme dans l'étude précédente, la bioluminescence a servi à réaliser des mesures de signal émis par l'animal entier et les organes bioluminescents n'ont pas été identifiés. Les intensités de signal lumineux de l'animal ont été implicitement utilisées pour décrire la charge bactérienne dans le corps de l'animal, bien qu'aucun résultat n'ait prouvé la corrélation entre ces deux quantités.

Une famille de plasmides portant différents gènes ou opéron rapporteurs – *gfp_{mut3.1}*, *amCyan*, *dsRed2*, *luxCDABE*, *phoA* ou *lacZ*– , en amont du promoteur de gènes

d'intérêt *-yadA, rovA, yopE, gapA-* a été construite chez la souche YPIII de *Y. pseudotuberculosis* (Uliczka *et al*, 2011). L'opéron *luxCDABE* a été placé sous contrôle du promoteur constitutif du gène *gapA* (codant l'enzyme glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase) de *E. coli* ou du promoteur du gène *yadA* (codant une adhésine) dans trois plasmides différant par le nombre de copies. *In vitro*, l'expression lumineuse a été corrélée au nombre de copies du plasmide. La souche YPIII pTS31 hébergeant un vecteur à faible nombre de copies (3 à 4) dans lequel l'opéron *luxCDABE* avait été placé sous contrôle du promoteur du gène *yadA* a été utilisée dans une infection de souris par voie orale : à J3 après l'infection, l'observation par bioluminescence *in vivo* a montré l'expression de *yadA* dans le tractus gastro-intestinal, la rate, la cavité nasale et les ganglions lymphatiques cervicaux. Les souris ont été immédiatement disséquées et observées une seconde fois : les signaux attribués au tractus gastro-intestinal ont été plus précisément attribués aux plaques de Peyer et aux ganglions lymphatiques mésentériques. L'expression de la luminescence dans la rate n'a pas été confirmée *ex vivo*. Un suivi d'infection par voie intragastrique a ensuite été réalisé en utilisant la souche YPIII pFU166 (*gapA-luxCDABE*) hébergeant le vecteur pFU166 à nombre moyen de copies (12 à 14) portant l'opéron *luxCDABE* sous contrôle du promoteur du gène *gapA*. À J1 après l'infection, un signal intense a été observé au niveau du tractus intestinal des souris. Ce signal a crû à J2 et a atteint un plateau à J3 et J4, avant de décroître à J5. L'observation d'une souris disséquée à J3 a révélé la présence des bactéries dans les plaques de Peyer, le caecum et les ganglions lymphatiques mésentériques. Les souches construites dans cette étude ont donc permis de suivre l'expression de *yadA*. *In vitro*, les bactéries ont perdu les plasmides hébergés de façon croissante au cours du temps, si bien que ces vecteurs ont été jugés inadaptés pour des suivis d'infection de plus d'une semaine.

Utilisation chez *Y. pestis*

Chez *Y. pestis*, les fusions des gènes *luxAB* avec les gènes *ymt*, *caf1* ou *caf1R* (régulateur de *caf1*) ont été construites chez la souche EV76 (Du *et al*, 1995). Ces fusions transcriptionnelles ont permis de comparer *in vitro* l'expression des gènes correspondants en fonction de la température et de la présence de calcium. L'effet de la température dans la régulation de *caf1* était particulièrement remarquable : son expression était 20 fois (présence de calcium) à 40 fois (absence de calcium) plus élevée à 37°C qu'à 26°C. Au contraire, le gène codant la toxine murine était plus exprimé à 26°C

qu'à 37°C. La comparaison a aussi montré que *caf1R* est peu transcrit par rapport à *caf1*, dans toutes les conditions d'expérimentation.

Aucune étude n'a encore utilisé la bioluminescence chez *Y. pestis* pour un suivi d'infection.

Matériel et Méthodes

Souches bactériennes et conditions de culture

La souche virulente C092 de *Y. pestis* (Parkhill *et al*, 2001), la souche virulente IP32953 de *Y. pseudotuberculosis* (Achtman *et al*, 1999) et leurs souches isogéniques ont été cultivées en bouillon LB (Luria Bertani) pendant 24 heures ou sur gélose LB avec 0,2% d'hémine (LBH) pendant 48 heures à 28°C ou 37°C. Les clones hébergeant le plasmide p_{Em7-luxCDABE} ont été cultivés en présence de 100 µg/ml de carbénicilline (LBH-Carbénicilline). Toutes les manipulations *in vitro* de *Y. pestis* ont été réalisées dans le laboratoire de niveau 3. La souche CFT073(p_{Em7-luxCDABE}) de la bactérie *E. coli* (Lane *et al*, 2007) a été cultivée en bouillon LB-Carbénicilline pendant 24 heures à 37°C.

Construction des souches bioluminescentes de *Y. pestis* C092(pLux) et de *Y. pseudotuberculosis* IP32953(pLux)

Le plasmide p_{Em7-luxCDABE} a été isolé et purifié à partir d'une culture de la souche CFT073(p_{Em7-luxCDABE}) (Lane *et al*, 2007) à l'aide du kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Le plasmide a ensuite été introduit par électroporation (Conchas & Carniel, 1990) dans les souches C092 de *Y. pestis* et IP2953 de *Y. pseudotuberculosis*. Les bactéries résultant de la transformation ont été sélectionnées. La présence du plasmide p_{Em7-luxCDABE} et le maintien des principaux facteurs de virulence (HPI, plasmides pYV, pFra et pPla) dans C092(pLux) et du plasmide pYV dans IP32953(pLux) ont été vérifiés par PCR (*Polymerase Chain Reaction*), à l'aide des amorces décrites dans le Tableau 2.

Séquence 5'-3'	Amplicon cible	Taille amplicon
ATCTTACTTTCCGTGAGAAG CTTGGATGTTGAGCTTCCTA CAGGAACCACTAGCACATC CCCCACAAGTTCTCAC	<i>pla</i> sur pPla	480 pb
CTGCTCATTTACTGAGAACG CTATAAGTAGAGAGTTTTTCGG	<i>caf1</i> sur pFra	171 pb
ATGCTGCATATCGCCTTTCGCCCCGAC GGACGTCGTGAATTCGCAGGCGTTAGA	<i>yopK</i> sur pYV	303 pb
CCAGGTTGAAATCTTTCCCG CTTTTTGAACTAAAGAATAGGC	<i>irp2</i> dans le HPI	2116 pb
	<i>luxC</i> dans p _{Em7-luxCDABE}	1000 pb

Tableau 2 : liste des amorces utilisées pour les contrôles par PCR

L'ADN servant de matrice à la PCR a été obtenu par thermolyse : une colonie bactérienne a été remise en suspension dans 10 µL d'une solution à 50 mM d'hydroxyde

de sodium et 0,25% de sodium-dodecyl-sulfate, l'ensemble a été porté à 95°C pendant 5 minutes puis dilué dix fois en eau (Aqua B. Braun, Melsungen). Chaque réaction PCR a été réalisée dans un volume de 50 µl contenant 2 µl de solution d'ADN matrice, 0,3 µM de chaque amorce, 200 µM de dNTP, 2 mM d'ions magnésium, 1,25 U de polymérase Taq (Applied Biosystems) et 5 µl de tampon 10X.

Chaque amplification par PCR dans un thermocycleur PTC-100 (Peltier Thermal Cycler) a été composée des étapes suivantes : une initialisation de 5 minutes à 94°C, 35 cycles d'amplification (30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 90 secondes à 72°C) et une étape de terminaison de 10 minutes à 72°C. Une fois l'amplification terminée, la préparation a été déposée dans un gel d'agarose à 1% (m/v) pour être soumis à une électrophorèse en gel. L'ADN présent a été révélé à l'aide de bromure d'éthidium (EUROBIO) et comparé à un marqueur de taille Smart Ladder 1 kb (Eurogentec) ainsi qu'à l'amplicon réalisé sur un thermolysat de référence : celui de la souche CO92 sauvage pour les facteurs de virulence, et celui de la souche CFT073(p_{Em7-luxCDABE}) pour *luxC*.

Pour chaque souche, une bactérie recombinante a été sélectionnée et appelée CO92(pLux) et IP32953(pLux).

Protocoles d'expérimentation sur souris

Les souris femelles des lignées BALB/cByJ fournies par Charles River Laboratories ont été hébergées dans une animalerie de niveau 3 de l'Institut Pasteur à accès contrôlé et dotée du statut sanitaire EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques). Toutes les expérimentations ont été exécutées sous la direction d'un titulaire de l'autorisation d'expérimenter sur animaux, selon un protocole validé par le Comité d'Hygiène et de Sécurité et la Direction de l'Animalerie Centrale de l'Institut Pasteur.

Les souris ont été reçues à l'âge de six à sept semaines et infectées environ une semaine après leur arrivée. Les infections sous-cutanées ont été réalisées par injection de 100 µl d'une suspension bactérienne en eau physiologique au niveau de la *linea alba*. La quantité de bactéries injectées a été estimée à partir de la mesure de la densité optique à 600 nm d'une suspension bactérienne, puis confirmée par numération après

dilution et étalement sur gélose LBH (C092) ou LBH-Carbénicilline C092(pLux) de la suspension bactérienne.

Les doses létales à 50% (DL₅₀) des souches virulentes ont été déterminées à partir de groupes de 5 souris infectées avec des dilutions en série des suspensions bactériennes. Le calcul des DL₅₀ a été réalisé à partir du décompte des animaux morts après trois semaines (Reed et Muench 1938). Pour la comparaison des courbes de survie de C092 et C092(pLux), les deux lots de cinq animaux ont été infectés avec des doses similaires de bactéries et suivis une à deux fois par jour. Le test utilisé a été décrit ci-après dans la section des analyses statistiques.

Pour déterminer la charge bactérienne d'un organe chez un animal infecté, l'animal a été euthanasié, l'organe a été prélevé de façon stérile et broyé (30 oscillations par seconde pendant 1 minute) par des billes de verre dans un broyeur Mixer Mill MM301 (Retsch). Le broyat a été dilué et étalé sur gélose LBH-Carbénicilline.

Pour vérifier la conservation du plasmide et de la fonction de bioluminescence, la rate et le foie de deux souris ont été prélevés et broyés de la même façon, puis le broyat a été dilué et étalé sur gélose LBH. L'émission de bioluminescence a été contrôlée dans ces colonies, et elles ont été repiquées sur gélose LBH-Carbénicilline pour vérifier la présence du plasmide.

Détection, observation et mesure de bioluminescence

Toutes les mesures de bioluminescence *in vitro* en milieu liquide ont été exécutées à l'aide du lecteur de plaques Xenius (SAFAS Monaco). Les observations de bioluminescence dans les boîtes de Petri ont été réalisées à l'aide de l'imageur IVIS 100 (Caliper Life Sciences) et du logiciel de pilotage et d'analyse Living Image 3.2.

Dans le cadre du suivi de *Y. pestis in vivo* ou dans les organes de souris euthanasiées, les animaux ont été infectés par voie sous-cutanée avec 100 UFC de la souche C092(pLux). Les souris ont été anesthésiées quotidiennement par injection intrapéritonéale de 200 µl d'une solution saline contenant 1/10^{ème} de volume de kétamine (Imalgène 1000) et 1/20^{ème} de volume de xylazine (Rompun 2%). Les souris ont été installées dans une boîte de confinement aux parois transparentes, en polyméthacrylate de méthyle (TEM SEGA). La boîte de confinement a été placée dans

l'imageur IVIS 100. Le pilotage de l'appareil et l'analyse des acquisitions ont été réalisés par le logiciel Living Image 3.2. L'appariement de pixel a été réglé sur « *small* », ce qui correspond à la valeur 4. Le temps d'acquisition a été choisi entre 1 seconde et 4 minutes, de façon à détecter les signaux les plus faibles, tout en évitant la saturation du signal.

Pour quantifier la radiance lumineuse émanant d'un organe, la région correspondant à cet organe (*Region Of Interest*, ROI) a été reproduite dans le logiciel Living Image qui réalise le calcul. La comparaison des images pour établir un diagnostic de colonisation utilise un réglage standard d'observation, de 7×10^5 à 5×10^8 photon par seconde, par centimètre carré et par stéradian (p/s.cm².sr).

Visualisation du drainage lymphatique

Le Bleu d'Evans (RAL Diagnostics) à 5% (m/v), a été utilisé pour visualiser le circuit lymphatique du ganglion lymphatique inguinal au ganglion axillaire. Quatre souris ont reçu une injection de 100 µl de colorant et ont été euthanasiées au bout de 1, 10, 20 ou 30 minutes. L'exposition de la face interne de la peau, au niveau du flanc, a permis de visualiser le trajet du colorant.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques et la mise en forme des graphiques ont été faites à l'aide du logiciel Prism, version 5.0d (GraphPad).

La corrélation entre signal de bioluminescence et quantité de bactéries a été évaluée comme suit : les deux grandeurs ont été transformées avec le logarithme décimal, puis un test omnibus de normalité de d'Agostino et Pearson a été réalisé. À condition de valider ce test, l'ensemble des données a ensuite été soumis à un test bilatéral de corrélation de Pearson. Ce test a été considéré comme validé lorsque la valeur P a été inférieure à 0,05 ; la valeur P a alors été indiquée ou minorée par 0,0001 lorsqu'elle a été trop basse pour être calculée. À condition de valider ce test de corrélation, l'ensemble de données a ensuite été soumis à une régression linéaire par la méthode des moindres carrés. Le coefficient de détermination R^2 a été calculé.

La différence entre les médianes de certaines valeurs (concentration bactérienne, intensité de bioluminescence par nombre de bactéries) a été évaluée à l'aide du test non-paramétrique de Mann-Whitney.

Les différences entre cinétiques de mortalité ont été évaluées à l'aide du test « logrank » ou test de Mantel-Cox.

Résultats

Objectif

Le modèle murin de peste bubonique est étudié depuis plusieurs années au sein de l'Unité de Recherche *Yersinia* afin de caractériser le processus infectieux de *Y. pestis* et de déterminer les mécanismes mis en œuvre par la bactérie pour survivre dans son hôte et l'envahir.

Pour suivre la progression de la bactérie dans son hôte, la méthodologie habituelle consiste à euthanasier l'animal et à réaliser les numérations bactériennes des organes prélevés ; cette démarche expérimentale est limitée par la variabilité et l'impossibilité de suivre un même animal.

Le suivi d'infection par bioluminescence permet de détecter la présence de bactéries dans les tissus et organes de façon non-invasive. Il est donc possible de suivre l'infection dans un même animal à différents temps d'infection. L'objectif du travail présenté ci-après est de réaliser ce suivi d'infection sur chaque individu, depuis son infection jusqu'à sa mort, afin de caractériser la dissémination de *Y. pestis*.

Une partie des résultats présentés ci-après a fait l'objet d'un article (Annexe 1).

Construction des souches C092(pLux) et IP32953(pLux)

Le plasmide $p_{Em7-luxCDABE}$ portant l'opéron complet de bioluminescence bactérienne *luxCDABE* sous contrôle du promoteur synthétique Em7 (Lane et al 2007) a été introduit dans les souches virulente *Y. pestis* C092 et *Y. pseudotuberculosis* IP32953. Le plasmide confère la résistance à la carbénicilline grâce au gène *bla* et possède les modules *hok/sok* et le système *par* qui assurent son maintien dans les générations successives de bactéries. Les souches produites ont été respectivement appelées C092(pLux) et IP32953(pLux).

L'expression de la bioluminescence par C092(pLux) et par IP32953 a été contrôlée *in vitro* en comparant une culture de cette souche sur gélose LBH-Carbénicilline et une culture des souches sauvages C092 et IP32953 sur gélose LBH à l'aide de l'imageur IVIS 100 (Figure 1). Toutes les colonies des souches recombinantes

ont émis un signal lumineux détectable alors que les souches sauvages n'ont émis aucune lumière détectable. Cette émission spécifique de lumière a aussi été observée pour des cultures bactériennes en bouillon. Les souches CO92(pLux) et IP32953(pLux) ont donc bien acquis la capacité de produire de la lumière par bioluminescence. De plus, cette émission a été suffisante pour être détectée.

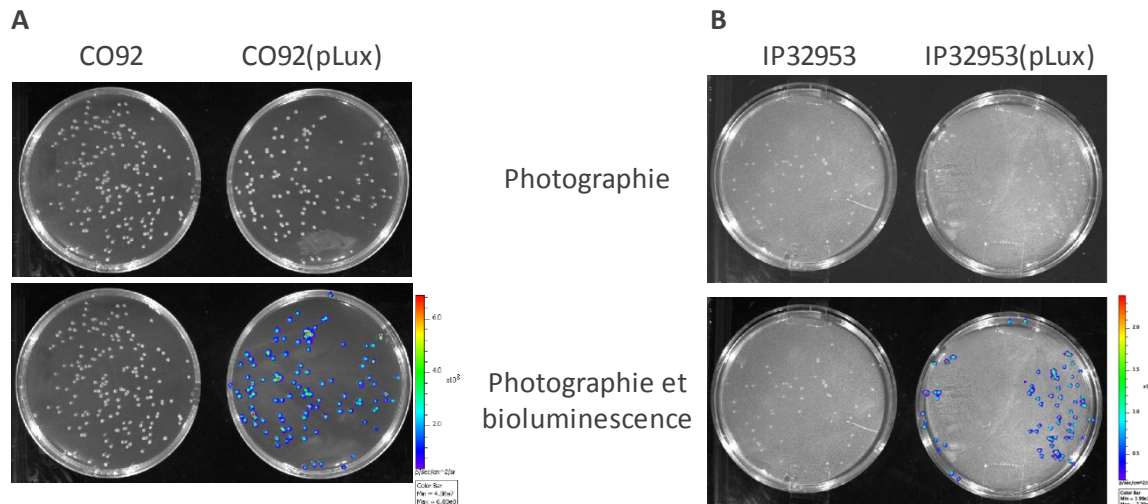


Figure 4. Bioluminescence *in vitro* de *Y. pestis* CO92(pLux) et *Y. pseudotuberculosis* IP32953(pLux)

Les souches *Y. pestis* CO92 et CO92(pLux) (A) et les souches *Y. pseudotuberculosis* IP32953 et IP32953(pLux) (B) ont été cultivées pendant 48 heures à 28°C sur gélose (LBH pour les souches sauvages, LBH-Carbénicilline pour les souches recombinantes). Les boîtes de Petri ont été observées à l'aide d'un imageur IVIS 100 : placées dans la chambre noire de l'imageur, les boîtes ont d'abord été photographiées en lumière blanche puis une acquisition de 7 secondes sans éclairage a permis de détecter la bioluminescence. L'appariement des pixels (*binning*) a été réglé à 4. La superposition de l'acquisition en bioluminescence et de la photographie a été réalisée par le logiciel Living Image 3.2 qui pilote l'imageur IVIS 100. Les points colorés indiquent la bioluminescence des colonies. La barre de légende sur la droite de l'image indique le codage en couleur de l'intensité de bioluminescence provenant d'un pixel, depuis l'indigo (A : $4,1 \cdot 10^7$ p/s.cm².sr ; B : $2,1 \cdot 10^7$ p/s.cm².sr) jusqu'au rouge (A : $6,9 \cdot 10^8$ p/s.cm².sr ; B : $2,4 \cdot 10^8$ p/s.cm².sr). Ce réglage a été défini automatiquement par le logiciel.

NB : en B, de la buée s'est formée sur le couvercle des boîtes de géloses.

Caractérisation *in vitro* de l'expression de la bioluminescence

Stabilité du plasmide p_{Em7}-luxCDABE et de la bioluminescence chez CO92(pLux) et IP32953(pLux)

Le maintien du plasmide p_{Em7}-luxCDABE et de la bioluminescence est impératif pour localiser la bactérie pendant le suivi d'infection. La capacité des souches CO92(pLux) et IP32953(pLux) à réaliser ce maintien a été évaluée en réalisant pour

chacune une culture sans pression de sélection en bouillon LB avec 13 passages répartis sur 19 jours pour CO92(pLux), 6 passages répartis sur 8 jours pour IP32953(pLux). Des prélèvements ont été réalisés aux jours 0, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 17 et 19 pour CO92(pLux), aux jours 0, 1, 3, 6 et 8 pour IP32953(pLux) ; ces prélèvements ont été dilués et cultivés sur gélose LBH. Pour chaque prélèvement, des échantillons distincts de colonies ont été utilisés pour évaluer, d'une part, la résistance à la carbénicilline, par repiquage sur gélose LBH-Carbénicilline et, d'autre part, la production de bioluminescence, par remise en suspension en bouillon LB et mesure de lumière au lecteur de plaques.

Toutes les colonies de CO92(pLux) remises en suspension ont émis de la lumière. Au cours du repiquage, certaines colonies n'ont repoussé ni sur la gélose LBH-Carbénicilline, ni sur une gélose LBH témoin. Elles ont été incluses dans l'étude et considérées comme sensibles à la carbénicilline. Sur une période de 19 jours, la proportion de bactéries résistantes est restée supérieure à 97% (Figure 2). En culture *in vitro*, CO92(pLux) a donc en grande proportion maintenu le plasmide p_{Em7-luxCDABE} et totalement conservé la capacité de produire la bioluminescence.

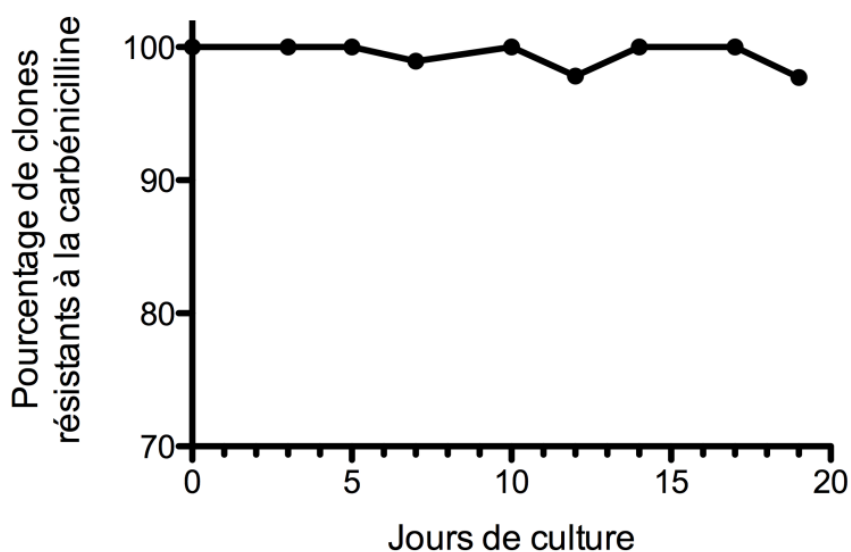


Figure 5. Stabilité du plasmide chez *Y. pestis* CO92(pLux) *in vitro* par passage successifs
 Une culture sans sélection de la souche CO92(pLux) a subi plusieurs passages successifs pendant 19 jours. Neuf prélèvements ont été réalisés, dilués et étalés, les colonies obtenues ont été repiquées sur gélose LBH-Carbénicilline. Chaque point représente le pourcentage de clones résistants à la carbénicilline dans un prélèvement fait au jour de culture indiqué. Ce pourcentage tient compte des colonies qui n'ont pas repoussé sur une gélose témoin LBH.

Toutes les colonies de IP32953(pLux) repiquées sur LBH-Carbénicilline ont donné de nouvelles colonies. Cependant, la proportion de colonies bioluminescentes de

IP32953(pLux) a été inférieure à 50% dès le premier prélèvement, et a continué de décroître dans les prélèvements suivants (Figure 3). IP32953(pLux) semblerait donc avoir bien maintenu le plasmide, sans avoir conservé la capacité de produire la bioluminescence. La souche IP32953 n'a donc pas été utilisée dans la suite de ce travail.

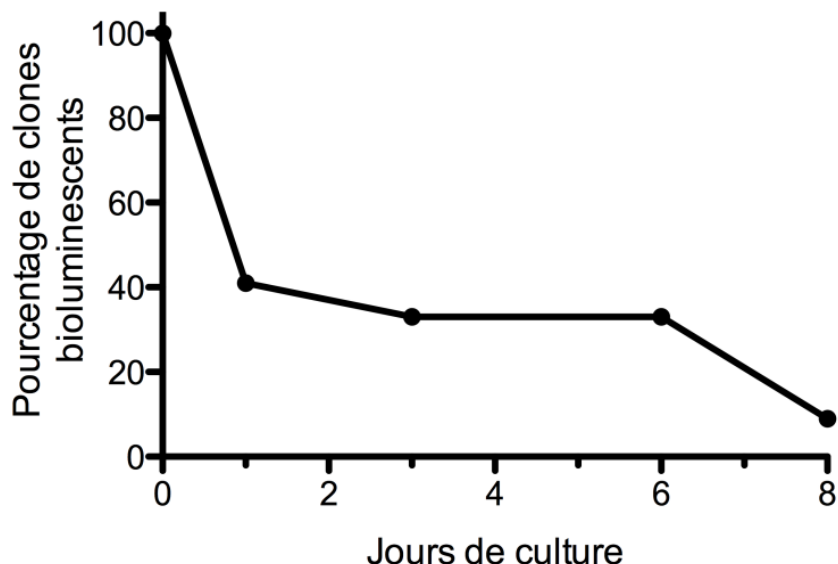


Figure 6. Instabilité de la luminescence chez *Y. pseudotuberculosis* IP32953(pLux) *in vitro* après plusieurs passages successifs

Une culture sans sélection de la souche IP32953(pLux) a été maintenue pendant 8 jours avec dilution. Tous les clones obtenus à chacun des cinq prélèvements étaient résistants à la carbénicilline. Les points représentent le pourcentage de clones luminescents.

Impact éventuel du plasmide sur la croissance

Le maintien d'un plasmide exogène dans le génome de C092(pLux) pourrait avoir un impact sur la vitesse de croissance *in vitro*. Pour évaluer cette possibilité, la croissance de la souche C092(pLux) a été comparée à celle de la souche C092 sur une période de deux jours. Trois cultures indépendantes ont été suivies pour chacune des deux souches C092(pLux) et C092. En journée, toutes les deux heures, des prélèvements de ces cultures ont été étalés sur gélose pour numération. Pour des raisons de sécurité, aucune mesure n'a été réalisée la nuit. Pour chaque point de suivi, la moyenne et l'erreur standard à la moyenne ont été calculées (Figure 4).

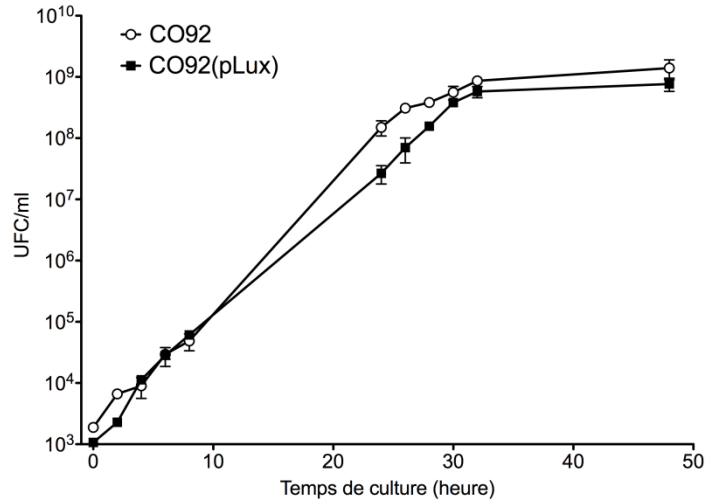


Figure 7. Suivi de croissance de CO92(pLux) et CO92

Les croissances de la souche bioluminescente (carrés pleins) et la souche sauvage (cercles vides) ont été comparées pendant 48 heures à 28°C en milieu LB. Chaque souche a été cultivée en triplicats. Aux temps indiqués, les échantillons ont été prélevés pour numération bactérienne. Les symboles correspondent aux valeurs moyennes, la barre verticale à l'erreur standard à la moyenne.

Les deux souches ont présenté des cinétiques voisines. À partir de 24 heures de croissance, la concentration de la souche CO92(pLux) a été inférieure en moyenne à celle de la souche sauvage. Un test de comparaison de Mann-Whitney a montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les médianes des concentrations bactériennes de la souche sauvage et de la souche CO92(pLux). L'impact éventuel du plasmide *pEm7-luxCDABE* sur la croissance de CO92(pLux) n'était donc pas statistiquement significatif.

Relation quantitative entre bioluminescence et nombre de bactéries

La relation entre le nombre de bactéries CO92(pLux) d'un échantillon et l'intensité du signal lumineux émis par l'échantillon a été évaluée. La souche CO92(pLux) a été cultivée à 28°C sur une gélose LBH-Carbénicilline, remise en suspension en bouillon LB et immédiatement diluée en série. Les concentrations des suspensions résultantes se sont étendues de $7,5 \times 10^1$ à $7,5 \times 10^8$ UFC/ml et ont émis un signal de bioluminescence qui a été quantifié par le lecteur de plaques (Figure 5A). Le bruit de fond a été estimé à environ 175 p/s.ml, à partir de la mesure d'un puits contenant du bouillon LB sans bactérie. Les concentrations bactériennes supérieures ou égales à $7,5 \times 10^4$ UFC/ml ont émis un signal lumineux supérieur au bruit de fond.

La valeur P a été inférieure à 0,0001 et le coefficient R^2 a été de 0,99. Concentration bactérienne et signal lumineux ont donc bien été reliés par une relation linéaire. La concentration d'une suspension de bactéries cultivées sur gélose a donc pu être calculée à partir de l'intensité du signal lumineux émis par cette suspension.

Une relation similaire a été évaluée pour des cultures en milieu liquide. L'intensité du signal lumineux émis et la concentration bactérienne ont été mesurées à partir des prélèvements effectués au cours d'une croissance en bouillon à 28°C (Figure 5B). Les concentrations se sont étendues de $7,4 \times 10^5$ UFC/ml à $2,1 \times 10^9$ UFC/ml et toutes les mesures de signal ont dépassé le bruit de fond de 175 p/s.ml. La corrélation a été confirmée ($P < 0,0001$) et le coefficient R^2 a été de 0,97. La relation quantitative entre signal lumineux et concentration en UFC a donc été confirmée. La concentration d'une culture en milieu liquide de bactéries a donc pu être calculée à partir de l'intensité du signal lumineux émis par cette culture.

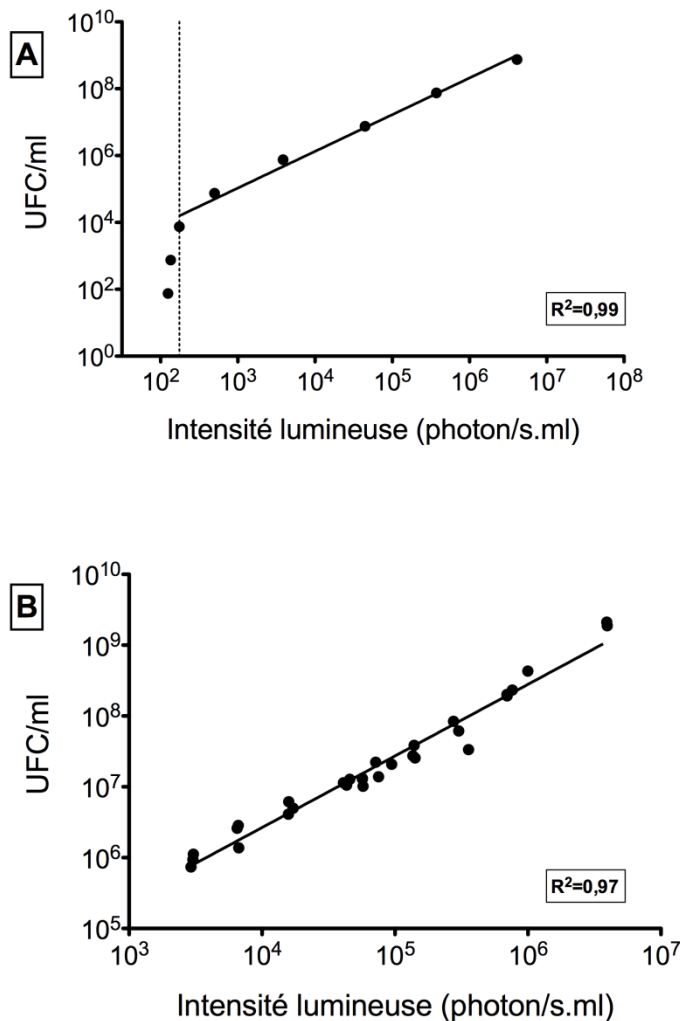


Figure 8. Corrélation entre le signal de bioluminescence et la concentration bactérienne *in vitro*. La souche CO92(pLux) a été cultivée pendant 48 heures à 28°C (A) sur gélose LBH-Carbénicilline puis remise en suspension et diluée en série ou (B) en bouillon avec des prélèvements réalisés à différents temps de culture. Le signal de bioluminescence émis par les échantillons a été mesuré par le lecteur de plaque Xenius, et la numération bactérienne de l'échantillon a été réalisée. Chaque point représente une suspension diluée de la culture solide (A) ou un échantillon de la culture en bouillon (B). La ligne continue représente la régression linéaire selon la méthode des moindres carrés ; le coefficient de détermination R^2 est indiqué sur chaque graphe.

Effet de la température sur la production de bioluminescence

Le plasmide *pEm7-luxCDABE* permet l'expression constitutive de la bioluminescence sous contrôle du promoteur Em7 (Invitrogen) chez *E. coli* (Lane *et al*, 2007). Cette bactérie croît de façon optimale à 37°C, température physiologique des souris, alors que *Y. pestis* croît de façon optimale à 28°C. L'effet de la température sur l'expression de la bioluminescence chez *Y. pestis* a été évalué. La souche CO92(pLux) a été cultivée à 28°C et à 37°C, sur gélose et en bouillon. Les mesures de signal lumineux rapportées à la concentration bactérienne ont été comparées entre les deux conditions de température (Figure 6). Un test de Mann-Whitney a montré que les médianes de ces mesures étaient significativement plus élevées à 37°C qu'à 28°C, aussi bien en bouillon ($P=0,009$) qu'en gélose ($P=0,035$). La production de lumière par chaque corps bactérien a donc été significativement plus importante à 37°C qu'à 28°C. Cette augmentation de la

production de bioluminescence pourrait être favorable à la détection des bactéries au cours d'un suivi d'infection.

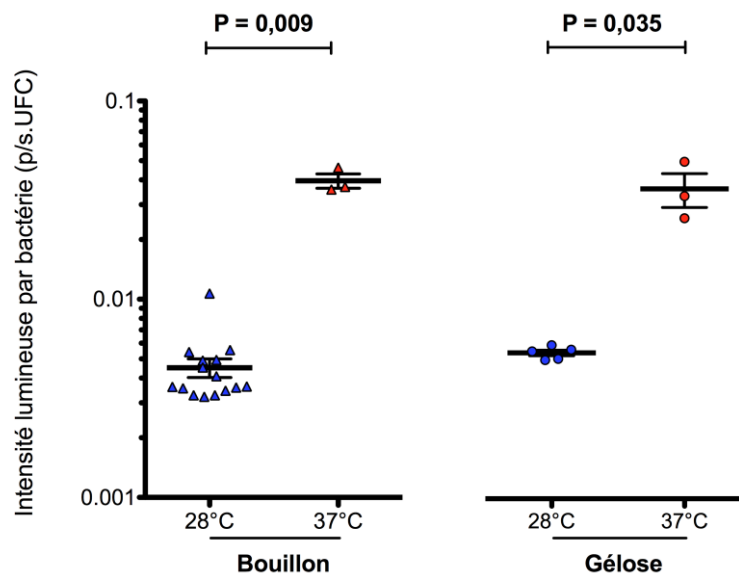


Figure 9. Effet de la température sur l'expression de la bioluminescence chez CO92(pLux) La souche CO92(pLux) a été cultivée en bouillon pendant 24 heures (triangle) ou sur gélose pendant 48 heures (cercle), à 28°C (bleu) ou à 37°C (rouge). Les cultures sur gélose ont été remises en suspension et diluées ; des prélèvements ont été faits dans les cultures en bouillon. Le signal de bioluminescence émis par les échantillons a été mesuré par le lecteur de plaque Xenius, et la numération bactérienne de l'échantillon a été réalisée. Chaque point représente l'intensité de lumière produite par l'échantillon, rapportée au nombre de bactéries contenues dans celui-ci (p/s.UFC). La moyenne et l'erreur standard à la moyenne sont figurées par la barre pleine et les barres d'erreur. La valeur P déterminée par le test Mann-Whitney de comparaison des médianes est indiquée.

Caractérisation de la bioluminescence au cours d'une infection

Stabilité du plasmide et la bioluminescence

Le maintien du plasmide $p_{Em7-luxCDABE}$ et de la capacité à émettre de la lumière chez CO92(pLux) lors de l'infection d'un hôte murin a été contrôlé. Cinq jours après infection, la rate et le foie de deux souris moribondes ont été prélevés et les bactéries présentes dans ces organes ont été récupérées. Dans un échantillon de 300 colonies, composé de 200 bactéries présentes dans la rate et 100 issues du foie, toutes les colonies ont conservé la capacité de résister à la carbénicilline et d'émettre de la lumière. Au cours de la multiplication de CO92(pLux) pendant l'infection d'un hôte murin, le plasmide $p_{Em7-luxCDABE}$ a donc été maintenu et la capacité d'émission de bioluminescence a été conservée.

Impact sur la virulence

La charge d'un plasmide exogène comme $p_{Em7-luxCDABE}$ pourrait avoir un impact sur la virulence de CO92(pLux). Cet impact éventuel a été évalué en comparant la virulence des souches CO92(pLux) et CO92 dans le modèle murin de peste bubonique. La présence des facteurs de virulence de *Y. pestis*, c'est-à-dire les plasmides pFra, pPla et pYV ainsi que l'ilot de haute pathogénicité, a été contrôlée par PCR préalablement à l'infection. La DL_{50} des deux souches était inférieure à 10 UFC. Les cinétiques de mortalité pour une dose de 10 UFC ($P=0,63$) (Figure 7) et pour une dose de 100 UFC ($P=0,19$) n'ont pas présenté de différence entre les deux souches, selon un test de Mantel-Cox. La présence du plasmide $p_{Em7-luxCDABE}$ n'a donc pas eu d'impact significatif sur la virulence de CO92(pLux).

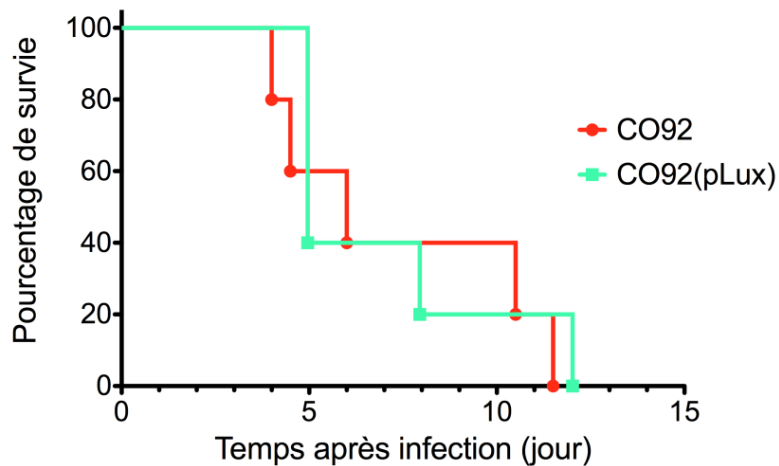


Figure 10. Comparaison des courbes de survie de *Y. pestis* CO92 et CO92(pLux)
Des lots de cinq souris femelles de la lignée BALB/cByJ âgées de sept semaines ont reçu une dose d'environ 10 UFC de *Y. pestis* CO92 (ligne rouge) ou CO92(pLux) (ligne verte) par voie sous-cutanée dans la *linea alba*.

Déteçtabilité du signal bioluminescent au cours d'une infection

La lumière émise par une source lumineuse depuis l'intérieur d'un organisme peut être absorbée ou dispersée par les différentes couches de tissus, au point de devenir indéteçtable de l'extérieur (Contag & Bachmann, 2002).

La déteçtabilité du signal de bioluminescence émis par CO92(pLux) en conditions d'infection a été évaluée. L'observation de souris infectées par voie sous-cutanée par 100 UFC de cette souche a montré la présence de plusieurs signaux lumineux au site d'injection et dans d'autres sites anatomiques (Figure 8A). Il était donc possible

d'utiliser le signal bioluminescent émis par CO92(pLux) afin de localiser des foyers bactériens au cours d'une infection.

Association entre signal de bioluminescence et colonisation d'un organe

L'observation en bioluminescence d'un animal a montré plusieurs sites anatomiques d'où la lumière était émise par les bactéries. Pour associer les signaux lumineux à la colonisation d'organes, plusieurs souris ont été infectées, puis observées avec l'imageur IVIS 100 (Figure 8A). Elles ont ensuite été euthanasiées et disséquées de façon à exposer plusieurs organes, puis observées une seconde fois avec l'imageur (Figure 8B). La comparaison des acquisitions en bioluminescence a permis d'associer les signaux lumineux détectés dans l'animal vivant aux organes colonisés par les bactéries bioluminescentes : site d'injection, foie, ganglions lymphatiques axillaires et inguinaux, rate (qui était souvent le seul organe détectable en vue dorsale).

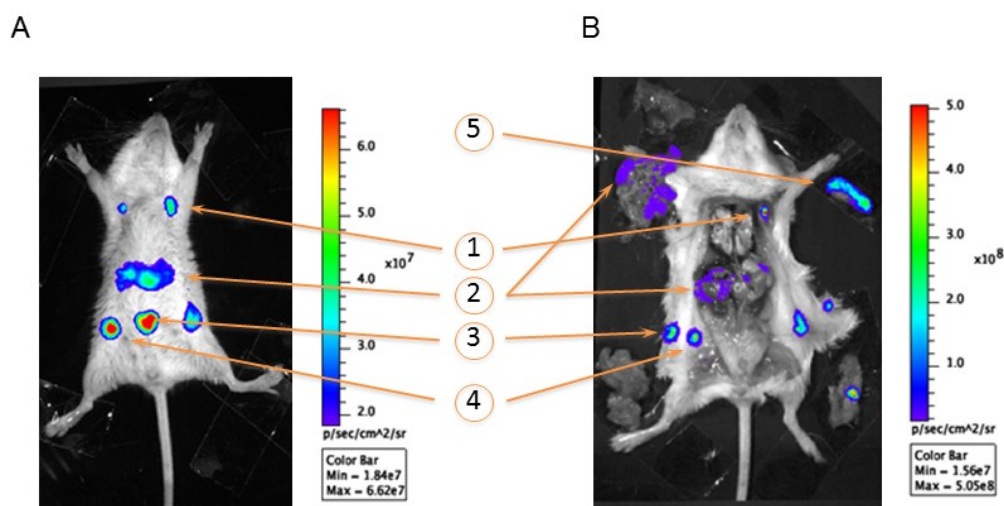


Figure 11. Association entre signal de bioluminescence et colonisation d'un organe (A) Exemple des signaux détectés depuis l'extérieur d'un animal vivant ; (B) Signaux détectés au niveau des organes du même animal, repérés après dissection. Les flèches indiquent : 1- les ganglions axillaires ; 2- le foie (un lobe à sa place, le reste ayant été retiré) ; 3- le site d'injection découpé en deux au cours de la dissection ; 4- les ganglions lymphatiques inguinaux ; 5- la rate, retirée de son site anatomique. Dans la partie B, les intestins ont été déplacés vers la patte postérieure droite, le péritoine (contenant une partie du foyer bactérien du site d'injection) a été déplacé près de la patte postérieure gauche. La barre de légende sur la droite de l'image indique le codage en couleur de l'intensité de bioluminescence, de l'indigo au rouge.

Relation quantitative entre bioluminescence et nombre de bactéries

À l'instar de l'étude réalisée *in vitro*, la relation quantitative entre le nombre de bactéries colonisant les organes et l'intensité du signal de bioluminescence émis par ces

organes a été évaluée. La charge bactérienne du site d'injection a été difficile à mesurer en raison de la taille du tissu à prélever (comprenant parfois des couches de peau et de péritoine) et de sa résistance au broyage. En conséquence, le site d'injection n'a pas été inclus dans cette partie de l'étude.

Quatorze souris ont été infectées par voie sous-cutanée avec 100 UFC de la souche C092(pLux), observées en positions dorsale et ventrale avec l'imageur entre J3 et J7 après l'infection, et immédiatement euthanasiées afin de prélever les organes dont les bactéries ont été collectées et décomptées sur gélose. L'intensité du signal émis par un organe a été définie comme étant la radiance lumineuse moyenne provenant d'une aire qui recouvrait l'organe ; cette intensité du signal est exprimée en p/s.cm².sr.

Dans trois organes, la corrélation entre charge bactérienne et intensité du signal a été montrée : pour la rate, $P < 0,0001$; pour le foie, $P = 0,0017$, pour les ganglions inguinaux $P = 0,0392$. Le coefficient R^2 de régression linéaire a été calculé : 0,77 pour la rate (Figure 9A), 0,52 pour le foie (Figure 9B), 0,15 pour les ganglions inguinaux (Figure 9C). Il a donc été possible d'estimer la charge bactérienne à partir de l'intensité du signal lumineux dans la rate, le foie et les ganglions inguinaux (avec une précision moindre pour ces derniers que pour la rate et le foie).

Dans plusieurs échantillons de ganglions inguinaux, aucune UFC n'a été collectée (triangles situés en-dessous de la limite de détection sur la Figure 9C) en dépit d'une intensité de signal supérieure à la plus basse valeur mesurée. Chez certaines souris, le ganglion inguinal a été difficile à distinguer du tissu adipeux environnant. Un prélèvement incorrect pourrait être à l'origine de ces numérations bactériennes nulles.

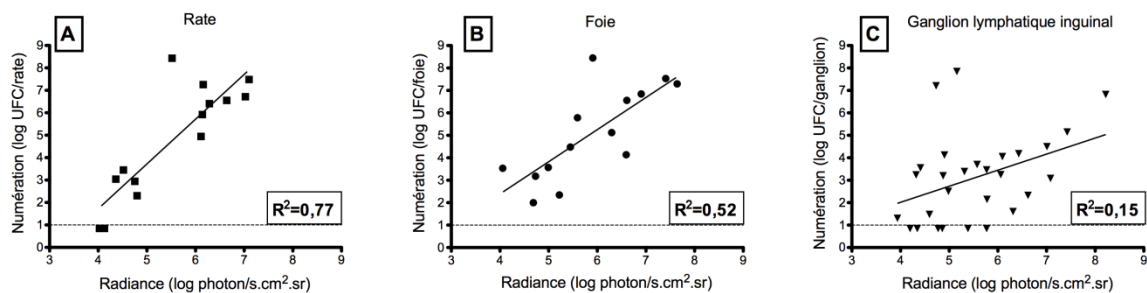


Figure 12. Corrélation entre le signal de bioluminescence émis par un organe et sa charge bactérienne

À différents temps après l'infection, les animaux ont été observés vivants avec l'imageur IVIS 100 puis euthanasiés. La rate (A), le foie (B) et les ganglions inguinaux (C) ont été prélevés et la charge bactérienne a été mesurée. Chaque point représente un organe prélevé. La ligne continue représente la régression linéaire selon la méthode des moindres carrés ; le coefficient de détermination R^2 est indiqué sur chaque graphe. La limite de détection de la charge bactérienne (10 UFC) est représentée par des tirets horizontaux.

Dans les ganglions axillaires, le signal émis et la charge bactérienne n'ont pas été significativement corrélés ($P>0,05$). La difficulté à distinguer le ganglion du tissu adipeux, comme pour les ganglions inguinaux, et un moindre nombre d'échantillons (huit ganglions axillaires pour vingt-sept ganglions inguinaux) pourraient expliquer l'absence de corrélation significative.

Adoption d'un réglage standard pour la comparaison des images

Le suivi d'infection a été réalisé en comparant les acquisitions réalisées jour après jour par l'imageur IVIS 100. Afin que les images acquises à des jours différents et avec des lots de souris différents soient comparables, un réglage commun a été défini pour les observations de bioluminescence : avec ce réglage standard, les signaux de radiance inférieure à 7×10^5 p/s.cm².sr n'ont pas été visualisés et les signaux de radiance supérieure ont été représentés avec un codage en couleur du violet (7×10^5 p/s.cm².sr) jusqu'au rouge (5×10^8 p/s.cm².sr et plus).

Charge bactérienne minimale détectées dans un organe

En tenant compte du réglage standard, la charge bactérienne minimale détectable a été de $8,3 \times 10^5$ UFC dans la rate, $1,3 \times 10^5$ UFC dans le foie et $1,5 \times 10^4$ UFC dans les ganglions inguinaux.

Suivi d'infection au cours d'une peste bubonique à l'aide de la bioluminescence

Schéma général de progression de *Y. pestis* dans la peste bubonique

La bioluminescence de C092(pLux) a été appliquée au suivi d'infection de la peste bubonique. Quarante-six souris femelles de la lignée BALB/cByJ âgées de 7 à 8 semaines ont été infectées par voie sous-cutanée au niveau de la *linea alba*, structure fibreuse longiligne s'étendant au milieu de l'abdomen. La dose d'infection, 100 UFC, a permis d'observer une infection mortelle chez toutes les souris.

Après infection au jour 0 (J0), les souris ont été anesthésiées et observées quotidiennement avec le réglage standard jusqu'à leur mort. Afin d'obtenir des observations cohérentes et de limiter l'impact de la variation entre deux individus, un total de 46 animaux a été observé au cours de six expériences indépendantes. Les résultats de ces expériences ont été rassemblés pour analyse.

Chez 74% des 46 souris, le signal lumineux a progressé de la même façon et cette progression a permis la définition d'étapes successives dans un schéma général de progression (Figure 10). Le premier signal visible a été détecté chez tous les individus au premier jour (J1) au site d'injection (Figure 10A). Le second signal détecté est apparu dans le ganglion lymphatique inguinal situé du côté gauche ou droit de l'animal (Figure 10B). Chez certaines souris, les ganglions des deux côtés ont présenté simultanément un signal bioluminescent (Figure 8A).

Le signal suivant est apparu dans le ganglion axillaire du même côté que le ganglion inguinal lumineux (Figure 10C). Cette apparition de signal dans le ganglion axillaire a toujours eu lieu après ou en même temps que l'apparition de signal du ganglion inguinal et le signal qui est apparu dans le ganglion axillaire a été de moindre intensité et de moindre étendue que celui du ganglion inguinal ipsilatéral au même moment. La colonisation du ganglion inguinal pourrait donc avoir été la cause de la colonisation du ganglion axillaire ipsilatéral.

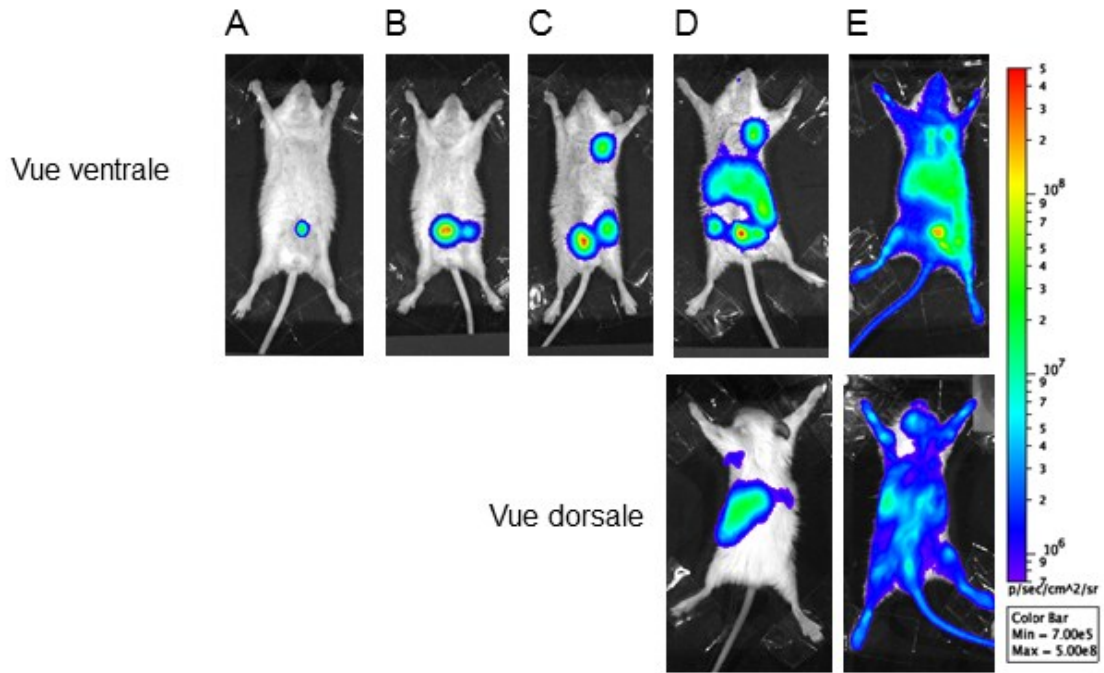


Figure 13. Étapes successives de la dissémination bactérienne au cours de la peste bubonique. Le premier signal a été observé au niveau du site d'injection (A). Le signal suivant est apparu dans le ganglion lymphatique inguinal (B), suivi par le ganglion axillaire (C), le foie (D, vue ventrale) et la rate (D, vue dorsale). La dernière étape a été la septicémie pendant laquelle le corps entier a émis de la lumière (E). Chaque photo montre un animal représentatif du schéma général de progression à l'une des différentes étapes. La barre de légende du réglage en couleur indique les réglages utilisés pour comparer l'ensemble des souris suivies par bioluminescence.

Le signal apparu dans le ganglion axillaire a parfois été accompagné d'une ligne luminescente allant du ganglion inguinal au ganglion axillaire (Figure 11A). Cette ligne a aussi été observée chez des animaux disséqués (Figure 11B). Cette observation a suggéré une connexion directe entre les deux ganglions, permettant le transit CO92(pLux) du ganglion inguinal au ganglion axillaire.

L'existence d'un drainage lymphatique passant par le ganglion inguinal puis par le ganglion axillaire a été mise en évidence après injection de colorant dans la patte postérieure et dans la queue (Harrell *et al*, 2008). Cependant, l'injection sous-cutanée dans la *linea alba* n'a pas été explorée dans cette étude.

La possibilité d'un drainage lymphatique depuis le site d'injection dans la *linea alba* jusqu'au ganglion inguinal, puis jusqu'au ganglion axillaire a été évaluée. La route de drainage a été visualisée à l'aide d'une solution de Bleu d'Evans à 5%. Ce colorant présente une forte affinité pour l'albumine ; en raison de sa taille, il ne peut pénétrer

dans les capillaires sanguins, mais il peut être drainé par les vaisseaux lymphatiques (Swartz, 2001; Harrell *et al*, 2008). Le Bleu d'Evans a été injecté dans la *linea alba* de quatre souris saines vivantes. Les animaux ont été euthanasiés après 1, 10, 20 ou 30 minutes pour laisser le colorant suivre son parcours de drainage. La dissection a révélé que les ganglions inguinal et axillaire du même côté étaient colorés en bleu, et qu'un vaisseau reliant les deux ganglions et distinct du vaisseau sanguin a pris une légère teinte bleue (Figure 11C). Cette observation a donc confirmé l'existence d'une circulation lymphatique depuis le site de la *linea alba* utilisé jusqu'au ganglion axillaire en passant par le ganglion inguinal du même côté.

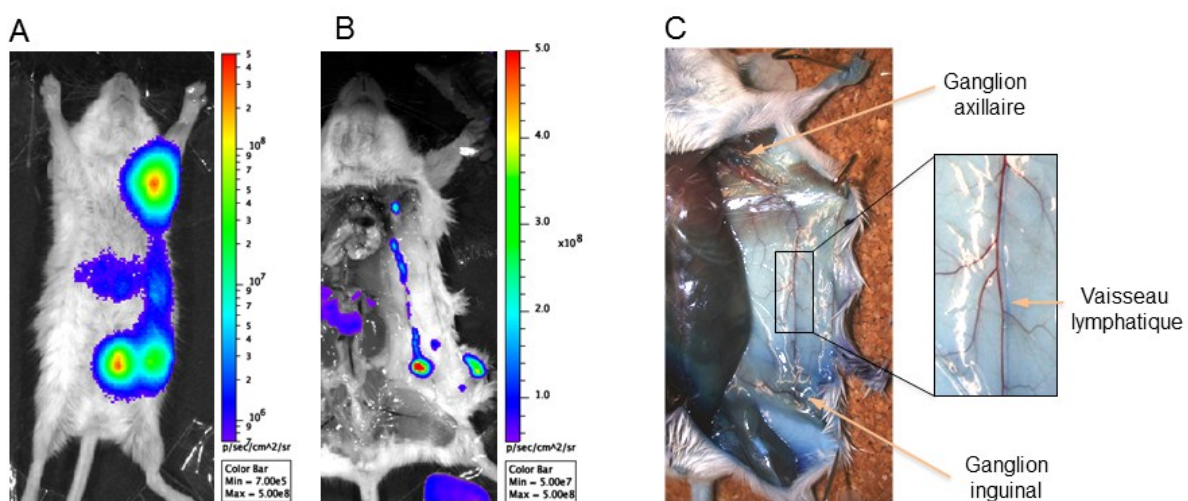


Figure 14. Circulation du ganglion inguinal au ganglion axillaire
 Une ligne de signal bioluminescent est apparue entre le ganglion inguinal et le ganglion axillaire ipsilatéral. Elle a été visible sur l'animal vivant (A) et après autopsie (B). Le vaisseau lymphatique qui joint ces ganglions a été coloré après injection dans la *linea alba* de Bleu d'Evans, sous la forme d'une ligne bleutée (C).

Les signaux suivants sont apparus dans les régions abdominales associées à la colonisation du foie et de la rate (Figure 10D).

La dernière étape a été l'émission de signal par l'ensemble du corps de l'animal, y compris des sites anatomiques périphériques comme la queue ou les oreilles (Figure 10E). La large diffusion de ce signal a suggéré une septicémie, confirmée par la présence de bactéries C092(pLux) dans le sang des animaux. Cette étape a été systématiquement suivie de la mort de l'animal.

De façon remarquable, aucun signal détectable n'a été produit par les sites anatomiques correspondant aux intestins, aux poumons et aux reins jusqu'à la phase septicémique finale. Cette observation a été confirmée par l'absence de signal en provenance de ces mêmes organes chez les souris autopsiées (Figure 8B).

Les autres schémas de progression de *Y. pestis* dans la peste bubonique

Chez 26% des 46 souris, la progression des signaux bioluminescents a été différente de celle qui a été décrite dans le schéma général de progression. Parmi ces 26%, 11% des souris ont présenté un schéma dans lequel le seul signal visible était celui du point d'injection, jusqu'à la mort de l'animal. Ce schéma sans propagation observée pourrait être expliqué par une progression très rapide (en moins d'un jour) de la bactérie après qu'elle a quitté le site d'injection.

Les 15% restants ont présenté des signaux dans la rate et/ou le foie sans qu'un ganglion inguinal ou axillaire n'ait émis de lumière (Figure 12). Ce schéma a suggéré un passage direct dans le sang depuis le site d'infection. Le drainage lymphatique ne se serait pas produit ou n'aurait pas abouti à la colonisation observable d'un ganglion, contrairement à la rate ou au foie.

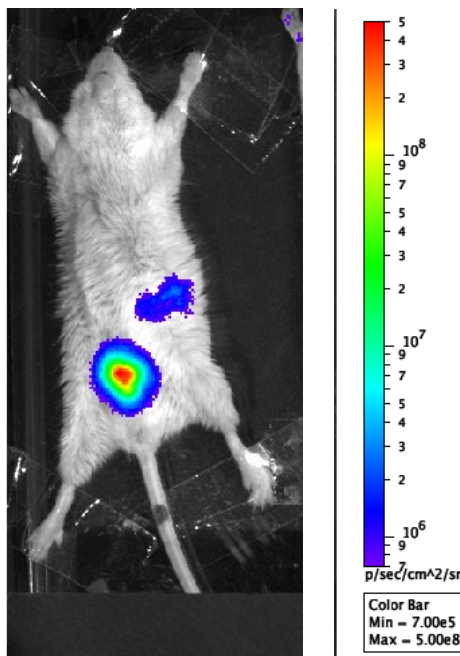


Figure 15. Schéma de propagation atypique : absence d'atteinte des ganglions inguinaux
Cet animal a été infecté par voie sous-cutanée dans la ligne blanche mais ne présente pas d'atteinte des ganglions drainants jusqu'à sa mort. Cette image a été prise la veille de la mort de l'animal. Un seul signal de bioluminescence, émis par le foie est visible sur l'image.

Cinétique de progression de *Y. pestis* dans le modèle de peste bubonique

Temps avant émission de lumière par un organe

La cinétique de dissémination de CO₉₂(pLux) dans le modèle murin de peste bubonique a été déterminée par calcul du temps moyen à partir duquel chacun des sites anatomiques a commencé à émettre un signal de bioluminescence (Figure 16). Vingt-quatre souris ont été infectées et observées de J1 jusqu'à leur mort. La bioluminescence du corps entier a été associée à la septicémie.

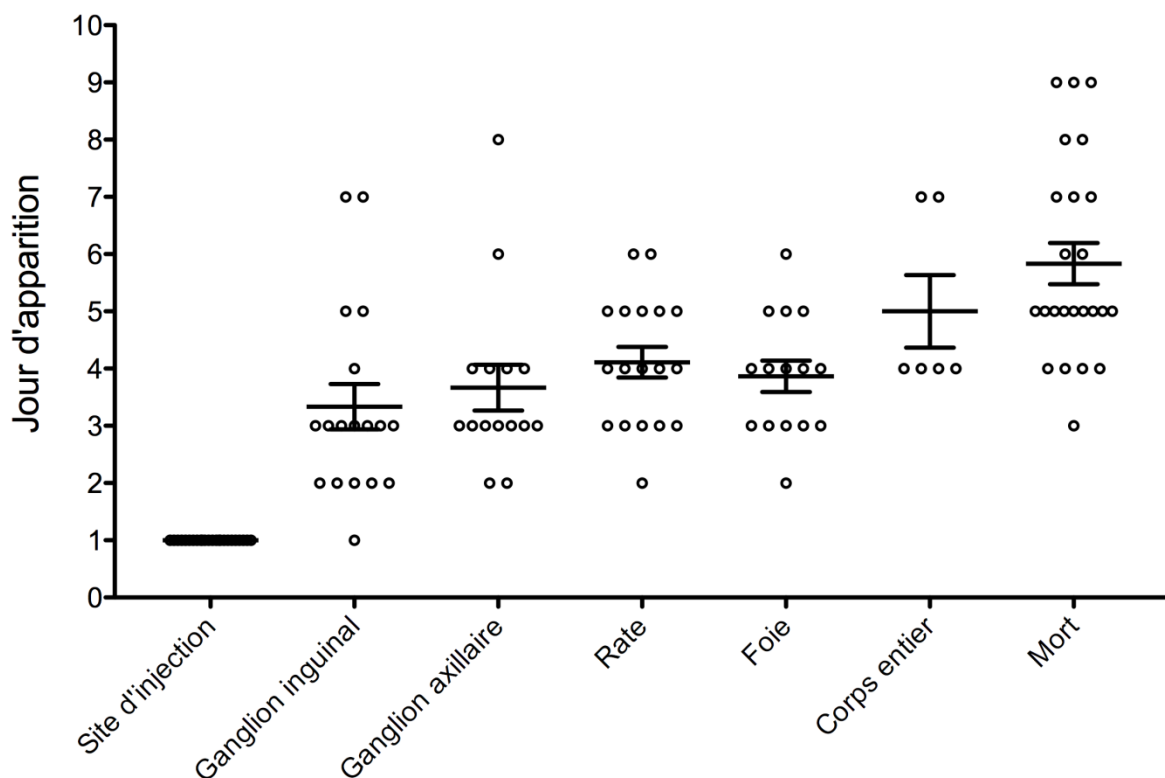


Figure 16. Temps d'apparition des signaux bioluminescents dans les organes des souris. Chaque cercle représente un des 24 animaux suivis. La barre horizontale représente la moyenne des valeurs et les barres verticales l'erreur standard à la moyenne.

Le signal au point d'injection est apparu à J1 chez tous les individus. Dans les autres organes, le temps d'apparition du signal a varié entre les individus. Dans le ganglion inguinal, l'apparition de signal a été observée entre J1 et J7 ; dans le ganglion

axillaire, entre J2 et J8 ; la rate et le foie entre J2 et J6 ; dans le corps entier, entre J4 et J7. La mort est survenue selon les individus entre J3 et J9. À partir de J2 après l'infection, la progression de la bactérie a donc été très différente d'un animal à l'autre.

Le temps moyen avant apparition du signal a été calculé pour les étapes postérieures à la colonisation du site d'injection. Le signal est ensuite apparu dans le ganglion inguinal à $J3,3(\pm 0,4)$ (moyenne \pm erreur standard à la moyenne) et dans le ganglion axillaire à $J3,6(\pm 0,4)$. Les signaux suivants sont apparus dans le foie à $J3,9(\pm 0,3)$ et dans la rate à $J4,1(\pm 0,3)$. Leur colonisation a été suivie de la phase septicémique à $J5,0(\pm 0,6)$. La mort de l'animal est survenue à $J5,8(\pm 0,4)$.

Comparaison du temps d'apparition entre un organe et le ganglion lymphatique

Pour chaque animal, les délais entre l'apparition du signal dans le premier ganglion lymphatique et l'apparition du signal dans les autres organes ont été calculés. Le premier ganglion inguinal a commencé à émettre de la lumière entre J1 et J7, puis le déroulement des étapes a été très régulier : le signal du foie et celui de la rate est apparu $1,0(\pm 0,2)$ jour après l'apparition de signal dans le ganglion, et dans le corps entier (indication de septicémie) $2,0(\pm 0,5)$ jours après le ganglion inguinal. La mort s'est produite $2,2(\pm 0,3)$ jours après l'apparition du signal dans le ganglion inguinal.

Deux conclusions principales ont été tirées de la cinétique de progression de C092(pLux) observée par bioluminescence : 1) cette cinétique a varié d'un individu à l'autre essentiellement en fonction du temps pendant lequel le signal est resté confiné au niveau du site d'injection ; 2) cette cinétique a été régulière et rapide à partir du moment où le signal est apparu dans les ganglions lymphatiques.

Discussion

Les études réalisées à partir d'autopsies de victimes humaines de la peste ont permis d'identifier les organes cibles de la bactérie et de déterminer les lésions causées dans ces organes. Cependant, ces études se référaient à un état *post-mortem* : le corps du malade avait donc été entièrement envahi par le pathogène. Ces études n'ont donc pas pu déterminer les voies empruntées par *Y. pestis* au cours de sa dissémination dans le corps.

Les modèles animaux ont permis d'étudier les processus pathologiques qui se déroulent pendant une atteinte de peste. Après prélèvement de tissus et d'organes, il est possible de mesurer la charge bactérienne, d'observer les lésions histologiques et de caractériser la réponse immune. Cependant, ces prélèvements nécessitent l'euthanasie de l'animal. De plus, la variabilité des phénomènes biologiques a pour conséquence l'absence de synchronisation du processus infectieux entre les individus. Le suivi de la dissémination bactérienne nécessite donc un grand nombre d'animaux afin de tirer des conclusions statistiquement significatives ; cette méthode ne peut pas rendre compte de la succession des étapes dans un même animal.

Le suivi d'infection par bioluminescence permet de repérer en temps réel les foyers bactériens dans l'animal entier sans l'euthanasier. Cette technique apparue récemment a été appliquée à l'étude des processus infectieux de plusieurs pathogènes et a démontré ses avantages par rapport aux méthodes conventionnelles. L'efficacité d'un traitement antibiotique a été évaluée (Heuts *et al*, 2009), comparée en fonction des doses (Francis *et al*, 2001) et des molécules (Xiong *et al*, 2005) ; des traitements à base d'ARN interférents ont aussi été évalués (Du *et al*, 2010) ; la localisation du pathogène dans l'animal entier a été réalisée (Lane *et al*, 2007; Gommet *et al*, 2011) ; l'imagerie de bioluminescence a également permis de montrer qu'une technique d'infection par voie orale avait provoqué une abrasion des tissus des voies respiratoires, créant ainsi un artefact technique dans le suivi d'infection habituel (Glomski *et al*, 2007).

L'imagerie par bioluminescence est plus simple d'emploi et moins coûteuse en temps d'expérimentation qu'un protocole basé sur l'euthanasie d'animaux infectés à des temps d'infection précis et la numération des charges bactériennes dans les organes

sélectionnés et prélevés. Le corps entier de l'animal peut être observé, ce qui évite d'éliminer un organe cible potentiel. En permettant le suivi des mêmes animaux à plusieurs moments de l'infection, cette technique réduit le nombre d'animaux et permet d'observer l'évolution de l'infection au sein du même animal : l'imagerie par bioluminescence contribue donc à la « réduction » et au « raffinement », deux des principes de la « Règle des 3R » qui servent de repères pour un traitement éthique des animaux de laboratoire (Russell & Burch, 1959).

Ce travail a visé à mieux comprendre le processus de dissémination de *Y. pestis* au cours de la peste bubonique, en réalisant une étude longitudinale de la propagation de la bactérie. La bioluminescence n'avait jamais été appliquée à *Y. pestis* au cours d'une infection, il a d'abord fallu en vérifier la possibilité technique. La capacité d'émettre un signal bioluminescent *in vitro* a été démontrée pour la souche EV76 de *Y. pestis* après introduction des gènes *luxAB* codant les deux sous-unités de la luciférase en aval des promoteurs des gènes *ymt*, *caf1* et *cafR* (Du *et al*, 1995). La présente étude a prouvé qu'il est possible de construire une souche virulente et bioluminescente de *Y. pestis* hébergeant le plasmide p_{Em7}-*luxCDABE*. Ce plasmide à faible nombre de copies contient les gènes codant la luciférase LuxAB et les enzymes synthétisant son substrat (Lane *et al*, 2007). Le plasmide a conféré à la bactérie *Y. pestis* la capacité de produire un signal bioluminescent détectable *in vitro* et *in vivo*. Le maintien du plasmide et la conservation de la production de bioluminescence ont été contrôlés sans pression de sélection chez les générations bactériennes en culture et au cours d'une infection.

La construction d'une souche bioluminescente de *Y. pseudotuberculosis* a également été réalisée. IP32953(pLux), une bactérie recombinante hébergeant le plasmide a été obtenue. Au cours d'une culture avec passages successifs, cette souche a conservé la résistance à carbénicilline indépendamment de la capacité de bioluminescence. La culture et l'isolement ont été réalisés dans des milieux dépourvus de carbénicilline : la conservation de la résistance n'a donc pas apporté un avantage sélectif à cette souche. La perte d'un plasmide exogène conférant des fonctions de bioluminescence a été décrite après introduction du plasmide p_{Em7}-*luxCDABE* dans la souche de *E. coli* CFT073 (Lane *et al*, 2007), avec un taux de perte de 13% en trois jours, et après introduction du plasmide P_{gapA}-*luxCDABE*(pFU 166) dans les souches de

Y. pseudotuberculosis YPIII, *E. coli* MC4100 et *S. enterica* SL1344 (Uliczka *et al*, 2011) avec un taux de perte supérieur à 50% en 10 jours.

Dans les souches bioluminescentes commerciales de *Y. pseudotuberculosis* (Caliper), l'opéron *luxCDABE* est inséré dans le plasmide de virulence. Le maintien *in vitro* de la capacité de bioluminescence de lumière n'a pas été décrit ; néanmoins, dans les modèles d'infection de souris par voie orale, les souches isogéniques ont continué d'émettre de la lumière après 13 jours d'infection (Isaksson *et al*, 2009; Thorslund *et al*, 2011).

En revanche, lorsque l'opéron *luxCDABE* a pour support un plasmide exogène, la stabilité diminue nettement après 6 jours de culture *in vitro* (Uliczka *et al*, 2011). Les résultats obtenus au cours du présent travail avec le plasmide $p_{Em7-luxCDABE}$ indiquent aussi une forte instabilité. *Y. pseudotuberculosis* semblerait donc ne pas pouvoir maintenir les plasmides exogènes de bioluminescence. Le plasmide $p_{Em7-luxCDABE}$ possède les modules *hok/sok* et le système *par* qui ont pour fonction d'améliorer son maintien dans les générations successives (Galen *et al*, 1999). Ces modules ne font pas partie des loci toxine-antitoxine chromosomiques de *Y. pestis* C092 (Goulard *et al*, 2010), ce qui pourrait expliquer le maintien du plasmide $p_{Em7-luxCDABE}$ dans la souche C092(pLux). La présence dans le génome de *Y. pseudotuberculosis* IP32953 d'un locus toxine-antitoxine incompatible avec ceux du plasmide $p_{Em7-luxCDABE}$ pourrait expliquer la perte de la capacité de bioluminescence de IP32953(pLux) au cours de la culture *in vitro*. Le maintien de la résistance pourrait avoir été causé par l'intégration du gène *bla* de $p_{Em7-luxCDABE}$ dans le génome de IP32953(pLux).

La construction d'une souche de *Y. pseudotuberculosis* dotée d'une capacité de bioluminescence stable pourrait être réalisée grâce à l'intégration de l'opéron *luxCDABE* dans le génome (Uliczka *et al*, 2011). L'utilisation d'un mini-transposon (Choi *et al*, 2005) pour insérer l'opéron *luxCDABE* dans le chromosome de *Y. pseudotuberculosis* est en cours de réalisation dans l'unité.

La présence de plasmides exogènes pourrait affecter la virulence de *Y. pestis* (Bland *et al*, 2011). De plus, la toxicité de la protéine LuxD a été décrite chez une mycobactérie (Andreu *et al*, 2010) : les acides gras constituant la paroi de cette mycobactérie sont altérés en sa présence. Ni la vitesse de croissance *in vitro*, ni la

virulence de *Y. pestis* dans un modèle murin de peste bubonique n'ont été significativement affectées par rapport celles de la souche sauvage.

Lorsque la souche CO92(pLux) a été cultivée à 37°C en gélose ou en bouillon, elle a émis plus de lumière que lorsqu'elle a été cultivée à 28°C dans le même milieu. Les gènes codant la luciférase LuxAB de CO92(pLux) viennent de la bactérie *P. luminescens* qui vit en symbiose avec des nématodes parasites d'insecte (Bowen & Ensign, 1998). Cette luciférase présente une remarquable stabilité à 45°C, en comparaison de la luciférase de la bactérie bioluminescente *Vibrio harveyi* (Szittner & Meighen, 1990). Il a été suggéré que la luciférase de *P. luminescens* pourrait être adaptée aux températures des mammifères, en dépit du mode de vie de la bactérie (Szittner & Meighen, 1990). De plus, le promoteur synthétique Em7 (Invitrogen) développé pour *E. coli* pourrait être plus actif à la température optimale de cette bactérie qu'à 28°C.

L'activité bioluminescente de CO92(pLux) est suffisante pour être détectée pendant le processus infectieux depuis l'extérieur de l'animal. Les signaux détectés dans les animaux infectés ont pu être associés avec certitude à la colonisation des organes situés à l'emplacement des signaux. La bioluminescence nous a donc permis de repérer de façon non-invasive et en temps réel les organes colonisés par *Y. pestis* CO92(pLux).

La corrélation entre l'intensité du signal émis par un organe et sa charge bactérienne a été vérifiée dans d'autres modèles tels que la maladie du charbon dans ses formes pulmonaire et intragastrique (Glomski *et al*, 2007) et l'infection par *E. coli* dans un modèle de souris neutropénique (Rocchetta *et al*, 2001). Toutefois, dans une étude portant sur l'infection pulmonaire par *S. pneumoniae*, l'intensité de signal n'a pas été corrélée à la charge bactérienne dans certains organes (Henken *et al*, 2010). Nous avons montré que l'intensité du signal émis par *Y. pestis* CO92(pLux) dans les ganglions inguinaux, la rate et le foie a été corrélée à la charge bactérienne. Ces observations ont donc permis une estimation non invasive de la charge bactérienne dans ces organes.

La corrélation entre charge bactérienne et intensité de signal luminescent n'a pas été observée pour les ganglions axillaires : ce résultat pourrait être dû au faible nombre de ganglions axillaires analysés et à des erreurs lors du prélèvement qui ont conduit à une sous-estimation de la charge bactérienne.

Un réglage standard pour l'observation a été utilisé pour comparer l'ensemble des acquisitions de l'imagerie IVIS 100 d'une expérience à l'autre et à différents temps. Ce choix a été choisi pour fournir une gamme dynamique suffisante entre les différents niveaux de signal et réduire la gêne causée par le bruit de fond. Une limite de détection bactérienne a été déduite de ce réglage : 10^4 UFC dans le ganglion inguinal, $1,3 \times 10^5$ UFC dans la rate, $8,3 \times 10^5$ UFC dans le foie. Ces seuils sont largement supérieurs au seuil d'une numération bactérienne (10 UFC) : en appliquant le réglage standard, la moitié des échantillons d'organes ayant servi à vérifier la corrélation entre signal lumineux et charge bactérienne aurait été considérée comme non colonisée. Un organe commence à être détecté par bioluminescence approximativement à la « moitié » de son processus de colonisation. Trois paramètres (profondeur, vascularisation et dimensions des organes) pourraient expliquer les écarts entre ces trois limites de détection : 1) Le ganglion inguinal est plus proche de la surface du corps que le foie et la rate. 2) Le ganglion inguinal contient moins de vaisseaux sanguins que les organes filtrants ; l'absorption de lumière causée par l'hémoglobine (Tromberg *et al*, 2000) pourrait donc être moindre dans le ganglion que dans le foie et la rate. 3) Sur une image de souris observée en bioluminescence, et compte tenu des dimensions de ces organes, la surface correspondant au ganglion inguinal est plus petite que la surface correspondant à la rate, et cette surface est plus petite que la surface correspondant au foie. La lumière émise par les bactéries contenues dans ces organes est donc répartie sur une surface plus petite dans le ganglion que dans la rate et dans le foie ; à charge bactérienne égale, la radiance pourrait donc être plus grande dans le ganglion inguinal que dans la rate et dans le foie.

Nous avons utilisé la souche C092(pLux) pour suivre l'infection dans un groupe de 46 animaux. La comparaison de ces individus a permis de décrire un schéma général de la dissémination, représentatif de 74% de l'effectif. La première étape du processus infectieux était l'apparition de signal au site d'injection. Ce signal initial a crû en étendue et en intensité dans les jours qui ont suivi son apparition. L'étape suivante était la colonisation du ganglion inguinal, le ganglion le plus proche du site d'injection. Cette observation était cohérente avec les rapports cliniques de la peste bubonique humaine qui rendaient compte de la formation d'un bubon caractéristique au niveau du ganglion drainant le site de la piqûre de puce (Pollitzer, 1954). Dans le modèle de peste bubonique, l'injection sous-cutanée est réalisée selon un axe aussi médian que possible.

De ce fait, l'infection du ganglion inguinal a parfois été observée des deux côtés de la *linea alba*, le même jour ou avec un délai.

Le site d'infection suivant repéré par bioluminescence a été le ganglion lymphatique axillaire du même côté que le ganglion inguinal infecté. Les examens réalisés sur des patients morts de peste ont suggéré que les bactéries disséminaient du premier ganglion infecté, appelé bubon primaire du premier ordre, vers le ganglion suivant dans la circulation lymphatique, situé du même côté, appelé bubon primaire du second ordre (Flexner, 1901; Pollitzer, 1954). Ces examens, réalisés à un stade *post-mortem*, ne pouvaient pas prouver que les bactéries migraient directement du bubon primaire du premier ordre vers le ganglion suivant. Au cours de l'infection, nous avons observé une ligne lumineuse entre le ganglion inguinal et le ganglion axillaire ipsilatéral. C'est la première observation *in vivo* d'un tel cheminement de *Y. pestis*.

L'existence d'une circulation lymphatique allant du ganglion inguinal au ganglion axillaire, visualisée par Bleu d'Evans, suggère que les bactéries utilisent la circulation lymphatique pour migrer du ganglion inguinal vers le ganglion axillaire. Cette route a été suggérée dans un modèle de peste bubonique chez le rat : les bactéries accèdent au ganglion axillaire ipsilatéral par son sinus marginal, qui est drainé par les vaisseaux lymphatiques afférents (Sebbane *et al*, 2005).

L'infection progresse ensuite vers deux organes spécialisés dans la filtration du sang : la rate et le foie qui sont colonisés de façon quasiment concomitante. Ce résultat est en accord avec les rapports cliniques décrivant des charges bactériennes élevées dans ces organes chez les victimes humaines et les animaux modèles (Jawetz & Meyer, 1944; Flexner, 1901; Sebbane *et al*, 2005). Contrairement au processus de formation des bubons primaires, la colonisation de ces tissus lymphoïdes requiert le passage des bactéries dans la circulation sanguine, soit après libération de celles-ci dans le canal thoracique, soit au niveau des ganglions lymphatiques infectés par dégradation *in situ* des vaisseaux sanguins. Cette deuxième hypothèse est appuyée par l'observation de vaisseaux sanguins endommagés et d'hémorragies dans les premiers ganglions colonisés des rats et souris infectés (Sebbane *et al*, 2005; Guinet *et al*, 2008). Au cours d'une bactériémie précoce et modérée, les bactéries en provenance des ganglions infectés gagneraient la rate et le foie, deux organes filtrant le sang. Cette hypothèse expliquerait

la prolifération ultérieure de bactéries dans la rate et dans le foie ainsi que l'absence de septicémie à ce stade, comme l'indique le suivi par bioluminescence.

La saturation des capacités filtrantes de la rate et du foie, associée à la multiplication bactérienne massive dans leurs tissus, provoquerait une septicémie terminale à l'aspect caractéristique en imagerie de bioluminescence : l'émission de signal par le corps entier. Une septicémie terminale a été fréquemment décrite chez les humains atteints de peste (Guarner *et al*, 2005; Frank *et al*, 2011; Flexner, 1901; Pollitzer, 1954) et dans les modèles animaux (Hoessly *et al*, 1955; Chen & Meyer, 1965; Flashner *et al*, 2010; Derbise *et al*, 2012; Jawetz & Meyer, 1944; Sebbane *et al*, 2005).

Hormis le site d'injection, les ganglions lymphatiques primaires et les tissus lymphoïdes secondaires, aucun organe n'a émis de signal lumineux avant la phase septicémique terminale. La colonisation des poumons au cours d'une peste bubonique expérimentale a pourtant été décrite dans le modèle murin (Brubaker, 1991; Demeure *et al*, 2011). Nous avons réalisé des numérations bactériennes dans les poumons d'animaux autopsiés. Lorsque les animaux ne présentaient pas de septicémie, les charges bactériennes étaient généralement inférieures à 10^4 UFC et par conséquent en deçà de la plus basse limite de détection par bioluminescence. Lorsque les animaux étaient en phase septicémique, les charges bactériennes des poumons étaient toujours supérieures à 10^5 UFC. Compte tenu de la vascularisation des poumons, les bactéries qui ont été collectées et comptées dans ces organes pourraient provenir du sang de l'animal, en début de phase septicémique. Bien que pouvant être colonisés, les poumons pourraient donc ne pas être des sites essentiels de réplication de *Y. pestis*.

L'ensemble des résultats du suivi d'infection par la bioluminescence montre que les principaux organes dans lesquels *Y. pestis* se multiplie sont les organes lymphoïdes (ganglions lymphatiques, rate et foie), et que la colonisation des autres organes est probablement associée à la phase septicémique terminale de l'infection.

Le délai entre l'infection initiale et la colonisation des organes a varié considérablement d'un individu à l'autre. Grâce à la capacité de suivre la progression de la maladie chez un même animal, nous avons montré que cette variabilité était essentiellement due au temps pendant lequel la bactérie est restée confinée au site d'injection (de 1 à 6 jours), et nous avons mis en évidence une cinétique infectieuse

régulière et très rapide qui a eu pour point de départ la colonisation du premier ganglion, et a conduit à la colonisation des organes cibles et à l'invasion du corps entier en deux jours. Ceci illustre le caractère rapide de la peste bubonique et la capacité exceptionnelle de *Y. pestis* à proliférer et disséminer dans les organes lymphoïdes en causant une septicémie fatale.

L'utilisation de la bioluminescence comme rapporteur d'expression de gènes d'intérêt au cours de l'infection a été présentée chez *Y. enterocolitica* (Trcek *et al*, 2010b, 2010a) et *Y. pseudotuberculosis* (Uliczka *et al*, 2011). Chez *Y. pestis*, son application permettrait de mieux comprendre les conditions dans lesquelles un facteur de virulence établi ou putatif est exprimé au cours de l'infection. Pour quantifier l'expression d'un tel gène, il est préférable que l'opéron *luxCDABE* soit présent en une unique copie, par exemple dans le chromosome. De même que pour *Y. pseudotuberculosis*, les outils permettant l'insertion du rapporteur et de son promoteur *via* un mini-transposon (Choi *et al*, 2005) dans le chromosome de *Y. pestis* sont en cours de construction dans l'Unité. Le suivi d'infection chez des souches dont un gène aurait été inactivé permettrait aussi de mieux appréhender le rôle de ce gène.

Le système de sécrétion de type III joue un rôle essentiel dans la résistance des *Yersinia* pathogènes à la phagocytose par les macrophages. La translocation des Yops pourrait être révélée au moyen d'une transcomplémentation : une sous-unité de la luciférase bactérienne (Dunlap & Kita-Tsukamoto, 2006) à laquelle un domaine de localisation membranaire (Isaksson *et al*, 2009) serait cloné aurait une masse de l'ordre de grandeur de YopH (Sample *et al*, 1987) et pourrait être sécrétée dans le cytoplasme d'une cellule eucaryote dans laquelle les gènes *luxCDE* auraient été préalablement clonés. Après formation de l'hétérodimère fonctionnel dans la cellule eucaryote et en présence de luciférine, la réaction de bioluminescence indiquerait que l'injectisome est fonctionnel.

Bien que *Y. pestis* dispose du plasmide pYV et de la pseudocapsule, sa présence dans les macrophages dans les temps précoces de l'infection est rapportée et associée au mode de vie intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis* (Lukaszewski *et al*, 2005; Pujol & Bliska, 2003). L'activité éventuelle de *Y. pestis* dans un mode de vie intracellulaire pourrait être observée à l'aide d'un rapporteur d'expression.

La bioluminescence est une technique polyvalente permettant de révéler les processus à l'œuvre dans les organismes. Pour la première fois, la dissémination du bacille pesteux a été suivie dans l'organisme d'un même animal depuis l'infection jusqu'à la septicémie terminale. Les différentes étapes ont pu être étudiées de façon longitudinale, ce qui a permis de montrer l'homogénéité et la vitesse de la cinétique de progression de *Y. pestis*. Les observations et comparaison en temps réel que permet le suivi d'imagerie *in vivo* pourront apporter de nouvelles perspectives sur l'étude de la pathologie pesteuse.

Références bibliographiques

- Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A & Carniel É (1999) *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 14043–14048
- Agar SL, Sha J, Foltz SM, Erova TE, Walberg KG, Baze WB, Suarez G, Peterson JW & Chopra AK (2009) Characterization of the rat pneumonic plague model: infection kinetics following aerosolization of *Yersinia pestis* CO92. *Microbes and Infection* **11**: 205–214
- Aleksic S, Steigerwalt AG, Bockemuhl J, Huntley-Carter GP & Brenner DJ (1987) *Yersinia rodheii* sp. nov. Isolated from Human and Dog Feces and Surface Water. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**: 327–332
- Andreu N, Zelmer A, Fletcher T, Elkington PT, Ward TH, Ripoll J, Parish T, Bancroft GJ, Schaible U, Robertson BD & Wiles S (2010) Optimisation of bioluminescent reporters for use with mycobacteria. *PLoS One* **5**: 1–16
- Arbaji A, Kharabsheh S, Al-Azab S, Al-Kayed M, Amr ZS, Abu Baker M & Chu MC (2005) A 12-case outbreak of pharyngeal plague following the consumption of camel meat, in north-eastern Jordan. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **99**: 789–793
- Ayyadurai S, Lepidi H, Nappez C, Raoult D & Drancourt M (2010) Lovastatin Protects against Experimental Plague in Mice. *PLoS One* **5**:
- Bacot AW & Martin CJ (1914) Observations on the mechanism of the transmission of plague by fleas. *Journal of Hygiene* **13**: 423–429
- Bartra S, Cherepanov P, Forsberg A & Schesser K (2001) The *Yersinia* YopE and YopH type III effector proteins enhance bacterial proliferation following contact with eukaryotic cells. *BMC Microbiology* **1**: 1–11
- Bearden SW, Fetherston JD & Perry RD (1997) Genetic organization of the *yersiniabactin* biosynthetic region and construction of avirulent mutants in *Yersinia pestis*. *Infection and Immunity* **65**: 1659–1668
- Bearden SW & Perry RD (1999) The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague. *Molecular Microbiology* **32**: 403–414
- Bercovier H, Mollaret HH, Alonso J-M, Brault J, Fanning GR, Steiger AG & Brenner DJ (1980a) Intra- and Interspecies Relatedness of *Yersinia pestis* by DNA

- Hybridization and Its Relationship to *Yersinia pseudotuberculosis*. *Current Microbiology* **4**: 207–212
- Bercovier H, Steigerwalt AG, Guiyoule A, Huntley-Carter G & Brenner DJ (1984) *Yersinia aldovae* (Formerly *Yersinia enterocolitica*-Like Group X2): a New Species of Enterobacteriaceae Isolated from Aquatic Ecosystems. *International Journal of Systematic Bacteriology* **34**: 166–172
- Bercovier H, Ursing J, Brenner DJ, Steigerwalt AG, Fanning GR, Carter GP & Mollaret HH (1980b) *Yersinia kristensenii*: A New Species of Enterobacteriaceae Composed of Sucrose-Negative Strains (Formerly Called Atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-Like). *Current Microbiology* **4**: 219–224
- Bertherat E, Bekhoucha S, Chougrani S, Razik F, Duchemin JB, Houti L, Deharib L, Fayolle C, Makrrougrass B, Dali-Yahia R, Bellal R, Belhabri L, Chaieb A, Tikhomirov E & Carniel É (2007) Plague reappearance in Algeria after 50 years, 2003. *Emerging Infectious Diseases* **13**: 1459–1462
- Bertherat É, Lamine KM, Formenty P, Thullier P, Mondonge V, Mitifu A & Rahalison L (2005) Épidémie de peste pulmonaire dans un camp minier de la République Démocratique du Congo : le réveil brutal d'un vieux fléau. *Médecine Tropicale*: 511–514
- Bina XR, Miller MA & Bina JE (2010) Construction of a bioluminescence reporter plasmid for *Francisella tularensis*. *Plasmid* **64**: 156–161
- Blanchet C, Jaubert J, Carniel É, Fayolle C, Milon G, Szatanik M, Panthier J-J & Montagutelli X (2011) *Mus spretus* SEG/Pas mice resist virulent *Yersinia pestis*, under multigenic control. *Genes and Immunity* **12**: 23–30
- Bland DM, Eisele NA, Keleher LL, Anderson PE & Anderson DM (2011) Novel Genetic Tools for Diaminopimelic Acid Selection in Virulence Studies of *Yersinia pestis*. *PLoS One* **6**: Article No.: e17352
- Bowen DJ & Ensign JC (1998) Purification and Characterization of a High-Molecular-Weight Insecticidal Protein Complex Produced by the Entomopathogenic Bacterium *Photobacterium luminescens*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 3029–3035
- Brenner DJ, Bercovier H, Ursing J, Alonso J-M, Steigerwalt AG, Fanning GR, Carter GP & Mollaret HH (1980) *Yersinia intermedia*: A New Species of Enterobacteriaceae Composed of Rhamnose-Positive, Melibiose-Positive, Raffinose-Positive Strains

- (Formerly Called *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-Like). *Current Microbiology* **4**: 207–212
- Brock M, Droin-Bergère S, Dussurget O, Nicola M-A & Ibrahim-Granet O (2008) Bioluminescent *Aspergillus fumigatus*, a New Tool for Drug Efficiency Testing and In Vivo Monitoring of Invasive Aspergillosis. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 7023–7035
- Brubaker RR (1972) The genus *Yersinia*: Biochemistry and Genetics of Virulence. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **57**: 112–158
- Brubaker RR (1991) Factors Promoting Acute and Chronic Diseases Caused by *Yersinia*. *Clinical Microbiology Reviews* **4**: 309–324
- Bubeck SS, Cantwell AM & Dube PH (2007) Delayed inflammatory response to primary pneumonic plague occurs in both outbred and inbred mice. *Infection and Immunity* **75**: 697–705
- Buchrieser C, Prentice MB & Carniel É (1998) The 102-Kilobase Unstable Region Of *Yersinia Pestis* Comprises a High-Pathogenicity Island Linked to a Pigmentation Segment Which Undergoes Internal Rearrangement. *Journal of Bacteriology* **180**: 2321–2329
- Buchrieser C, Rusniok C, Frangeul L, Couve E, Billault A, Kunst F, Carniel É & Glaser P (1999) The 102-Kilobase *pgm* Locus of *Yersinia pestis*: Sequence Analysis and Comparison of Selected Regions among Different *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* Strains. *Infection and Immunity* **67**: 4851–4861
- Carter PB (1975) Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* for Mice. *Infection and Immunity* **11**: 164–170
- Chain PSG, Carniel É, Larimer FW, Lamerdin J, Stoutland PO, Regala WM, Georgescu AM, Vergez LM, Land ML, Motin VL, Brubaker RR, Fowler JM, Hinnebusch BJ, Marceau MB, Medigue C, Simonet M, Chenal-Francois V, Souza B, Dacheux D, Elliott JM, *et al* (2004) Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 13826–13831
- Chen TH & Meyer KF (1965) Susceptibility of the langur monkey (*Semnopithecus entellus*) to experimental plague: pathology and immunity. *Journal of Infectious Diseases* **115**: 456–464

- Choi K-H, Gaynor JB, White KG, Lopez C, Bosio CM, Karkhoff-Schweizer RR & Schweizer HP (2005) A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nature Methods* **2**: 443–448
- Chouikha I, Charrier L, Filali S, Derbise A & Carniel É (2010) Insights into the infective properties of YpfΦ, the *Yersinia pestis* filamentous phage. *Virology* **407**: 43–52
- Christie AB, Chen TH & Elberg SS (1980) Plague in Camels and Goats: Their Role in Human Epidemics. *Journal of Infectious Diseases* **141**: 724–726
- Conchas RF & Carniel É (1990) A Highly Efficient Electroporation System for Transformation of *Yersinia*. *Gene* **87**: 133–137
- Congleton YH, Wulff CR, Kerschen EJ & Straley SC (2006) Mice naturally resistant to *Yersinia pestis* Delta pgm strains commonly used in pathogenicity studies. *Infection and Immunity* **74**: 6501–6504
- Contag CH & Bachmann MH (2002) Advances In In Vivo Bioluminescence Imaging Of Gene Expression. *Annual review of biomedical engineering* **4**: 235–260
- Contag CH, Contag PR, Mullins JI, Spilman SD, Stevenson DK & Benaron DA (1995) Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. *Molecular Microbiology* **18**: 593–603
- Cowan C, Jones HA, Kaya YH, Perry RD & Straley SC (2000) Invasion of epithelial cells by *Yersinia pestis*: Evidence for a *Yersinia pestis*-specific invasin. *Infection and Immunity* **68**: 4523–4530
- Darby C (2008) Uniquely insidious : *Yersinia pestis* biofilms. *Trends in Microbiology*
- Day JB, Ferracci F & Plano GV (2003) Translocation of YopE and YopN into eukaryotic cells by *Yersinia pestis* yopN, tyeA, sycN, yscB and lcrG deletion mutants measured using a phosphorylatable peptide tag and phosphospecific antibodies. *Molecular Microbiology* **47**: 807–823
- Demeure CE, Blanchet C, Fitting C, Fayolle C, Khun H, Szatanik M, Milon G, Panthier J-J, Jaubert J, Montagutelli X, Huerre M, Cavaillon J-M & Carniel É (2011) Early Systemic Bacterial Dissemination and a Rapid Innate Immune Response Characterize Genetic Resistance to Plague of SEG Mice. *Journal of Infectious Diseases* **205**: 134–143
- Derbise A, Cerda Marin A, Avé P, Blisnick T, Huerre M, Carniel É & Demeure CE (2012) An encapsulated *Yersinia pseudotuberculosis* is a highly efficient vaccine against pneumonic plague. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **6**: e1528

- Derbise A, Chenal-Francisque V, Pouillot F, Fayolle C, Prévost M-C, Médigue C, Hinnebusch BJ, Carniel É, Prevost MC & Medigue C (2007) A horizontally acquired filamentous phage contributes to the pathogenicity of the plague bacillus. *Molecular Microbiology* **63**: 1145–1157
- Desjardin DE, Oliveira AG & Stevani CV (2008) Fungi bioluminescence revisited. *Photochemical & Photobiological Sciences* **7**: 170–182
- Doll JM, Zeitz PS, Ettestad P, Bucholtz AL, Davis T & Gage K (1994) Cat-transmitted fatal pneumonic plague in a person who traveled from Colorado to Arizona. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **51**: 109–114
- Du J, Zhao F, Zhou Y, Yan H, Duan X-G, Liang S-Q, Wang Y-L, Fu Q-X, Wang X-H, Peng J-C & Zhan L-S (2010) Bioluminescence imaging allows monitoring hepatitis C virus core protein inhibitors in mice. *PLoS One* **5**:
- Du YD, Galyov E, Forsberg Åke & Forsberg A (1995) Genetic analysis of Virulence Determinants Unique to *Yersinia pestis*. In *Yersiniosis: Present and Future*, Ravagnan G & Chiesa C (eds) pp 321–324. Basel: Basel, Karger
- Du YD, Rosqvist R & Forsberg A (2002) Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. *Infection and Immunity* **70**: 1453–1460
- Dunlap PV & Kita-Tsukamoto K (2006) Luminous Bacteria. In *Prokaryotes* pp 863–892.
- Duplantier J-MM, Duchemin J-BB, Chanteau S & Carniel É (2005) From the recent lessons of the Malagasy foci towards a global understanding of the factors involved in plague reemergence. *Veterinary Research* **36**: 437–453
- Eisen RJ, Bearden SW, Wilder AP, Montenieri JA, Antolin MF & Gage KL (2006) Early-phase transmission of *Yersinia pestis* by unblocked fleas as a mechanism explaining rapidly spreading plague epizootics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 15380–15385
- Elgat M & Ben-Gurion R (1969) Mode of action of pesticin. *Journal of Bacteriology* **98**: 359–367
- Ewing WH, Ross AJ, Brenner DJ & Fanning GR (1978) *Yersinia ruckeri* sp. nov., the Redmouth (RM) Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* **28**: 37–44
- Fetherston JD & Perry RD (1994) The pigmentation locus of *Yersinia pestis* KIM6+ is flanked by an insertion sequence and includes the structural genes for pesticin sensitivity and HMWP2. *Molecular Microbiology* **13**: 697–708

- Fetherston JD, Schuetze P & Perry RD (1992) Loss of the pigmentation phenotype in *Yersinia pestis* is due to the spontaneous deletion of 102 kb of chromosomal DNA which is flanked by a repetitive element. *Molecular Microbiology* **6**: 2693–2704
- Filippov AA, Solodovnikov NS, Kookleva LM & Protsenko OA (1990) Plasmid Content in *Yersinia pestis* Strains of Different Origin. *FEMS Microbiology Letters* **67 (55)**: 45–48
- Flashner Y, Fisher M, Tidhar A, Mechaly A, Gur D, Halperin G, Zahavy E, Mamroud E & Cohen S (2010) The search for early markers of plague: evidence for accumulation of soluble *Yersinia pestis* LcrV in bubonic and pneumonic mouse models of disease. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **59**: 197–206
- Flexner S (1901) The Pathology of bubonic plague. *American journal of the medical sciences* **122**: 396–416
- Forman S, Wulff CR, Myers-Morales T, Cowan C, Perry RD & Straley SC (2008) yadBC of *Yersinia pestis*, a new virulence determinant for bubonic plague. *Infection and Immunity* **76**: 578–587
- Fraga H (2008) Firefly luminescence : A historical perspective and recent developments. *Photochemical & Photobiological Sciences* **212**:
- Francis KP, Yu JUN, Bellinger-Kawahara C, Joh D, Hawkinson MJ, Xiao G, Purchio TF, Caparon MG, Lipsitch M & Contag PR (2001) Visualizing Pneumococcal Infections in the Lungs of Live Mice Using Bioluminescent *Streptococcus pneumoniae* Transformed with a Novel Gram-Positive lux Transposon. *Infection and Immunity* **69**: 3350–3358
- Frank KM, Schneewind O & Shieh W-J (2011) Investigation of a Researcher's Death Due to Septicemic Plague. *New England Journal of Medicine* **364**: 2563–2564
- Friedlander AM, Welkos SL, Worsham PL, Andrews GP, Heath DG, Anderson GW, Pitt MLM, Estep J & Davis K (1995) Relationship between virulence and immunity as revealed in recent studies of the F1 capsule of *Yersinia pestis*. *Clinical Infectious Diseases* **21**: S178–S181
- Gage KL & Kosoy MY (2005) Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. *Annual Review of Entomology* **50**: 505–28
- Galen JE, Nair JAY, Wang JINY, Wasserman SS, Tanner MK, Sztein MB & Levine MM (1999) Optimization of Plasmid Maintenance in the Attenuated Live Vector Vaccine Strain *Salmonella typhi* CVD 908-htrA. *Infection and Immunity* **67**: 6424–6433

- Galimand M, Carniel É & Courvalin P (2006) Resistance of *Yersinia pestis* to antimicrobial agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **50**: 3233–3236
- Glomski IJ, Piris-Gimenez A, Huerre M, Mock M & Goossens PL (2007) Primary Involvement of Pharynx and Peyer's Patch in Inhalational and Intestinal Anthrax. *PLoS Pathogens* **3**:
- Gommet C, Billecocq A, Jouvion G, Hasan M, Zaverucha do Valle T, Guillemot L, Blanchet C, Rooijen N van, Montagutelli X, Bouloy M & Panthier J-J (2011) Tissue Tropism and Target Cells of NSs-Deleted Rift Valley Fever Virus in Live Immunodeficient Mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **5**:
- Goulard C, Langrand S, Carniel É & Chauvaux S (2010) The *Yersinia pestis* Chromosome Encodes Active Addiction Toxins. *Journal of Bacteriology* **192**: 3669–3677
- Gratz N (1999) Rodent reservoirs & flea vectors of natural foci of plague. In *Plague Manual Epidemiology, Distribution, Surveillance and Control* pp 63–96.
- Groves E, Ritinger K, Amstutz M, Berry S, Holden DW, Cornelis GR & Caron E (2010) Sequestering of Rac by the *Yersinia* Effector YopO Blocks Fc gamma Receptor-mediated Phagocytosis. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 4087–4098
- Guarner J, Shieh WJ, Chu M, Perlman DC, Kool J, Gage KL, Etestad P & Zaki SR (2005) Persistent *Yersinia pestis* antigens in ischemic tissues of a patient with septicemic plague. *Human Pathology* **36**: 850–853
- Guinet F, Ave P, Jones L, Huerre M, Carniel É & Avé P (2008) Defective Innate Cell Response and Lymph Node Infiltration Specify *Yersinia pestis* Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **3**: e1688
- Guinet F & Carniel É (2008) Faut-il encore craindre la peste aujourd'hui? *médecine/sciences*: 865–868
- Guiyoule A, Grimont F, Iteman I, Grimont PAD, Lefevre M & Carniel É (1994) Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains. *Journal of Clinical Microbiology* **32**: 634–641
- Haddock SHD, Moline MA & Case JF (2010) Bioluminescence in the Sea. *The Annual Review of marine science* **2**: 443–493
- Haffkine WM (1906) Les inoculations anti-pesteuses. *Bulletin de l'Institut Pasteur* **4**: 1–16
- Harrell MI, Iritani BM & Ruddell A (2008) Lymph node mapping in the mouse. *Journal of Immunological Methods* **332**: 170 – 174

- Heine HS, Louie A, Sorgel F, Bassett J, Miller L, Sullivan LJ, Kinzig-Schippers M & Drusano GL (2007) Comparison of 2 antibiotics that inhibit protein synthesis for the treatment of infection with *Yersinia pestis* delivered by aerosol in a mouse model of pneumonic plague. *Journal of Infectious Diseases* **196**: 782–787
- Henken S, Bohling J, Ogunniyi AD, Paton JC, Salisbury VC, Welte T & Maus UA (2010) Evaluation of Biophotonic Imaging To Estimate Bacterial Burden in Mice Infected with Highly Virulent Compared to Less Virulent *Streptococcus pneumoniae* Serotypes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**: 3155–3160
- Herring PJ (1983) The Spectral Characteristics of Luminous Marine Organisms. *Proceedings of the Royal Society B* **220**: 183–217
- Heuts F, Carow B, Wigzell H & Rottenberg ME (2009) Use of non-invasive bioluminescent imaging to assess mycobacterial dissemination in mice, treatment with bactericidal drugs and protective immunity. *Microbes and Infection* **11**: 1114–1121
- Hinnebusch BJ & Erickson DL (2008) *Yersinia pestis* Biofilm in the Flea Vector and Its Role in the Transmission of Plague. In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Romeo T (ed) pp 229–248.
- Hinnebusch BJ, Jarrett CO, Callison J a, Gardner D, Buchanan SK & Plano GV (2011) Role of the *Yersinia pestis* Ail protein in preventing a protective polymorphonuclear leukocyte response during bubonic plague. *Infection and immunity* **79**: 4984–9
- Hinnebusch BJ, Rudolph AE, Cherepanov P, Dixon JE, Schwan TG & Forsberg A (2002a) Role of *Yersinia murine* toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. *Science* **296**: 733–735
- Hinnebusch BJ, Rudolph AE, Cherepanov P, Dixon JE, Schwan TG & Forsberg A (2002b) Role of *Yersinia murine* toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. *Science* **296**: 733–5
- Hoessly GF, Walker DL, Larson A & Meyer KF (1955) Experimental Bubonic Plague in Monkeys. I. Study of the Development of the Disease and the Peripheral Circulatory Failure. *Acta Tropica* **12**: 240–251
- Huang X-Z & Lindler LE (2004) The pH 6 antigen is an antiphagocytic factor produced by *Yersinia pestis* independent of yersinia outer proteins and capsule antigen. *Infection and Immunity* **72**: 7212–7219

- Huang X-Z, Nikolich MP & Lindler LE (2006) Current trends in plague research: from genomics to virulence. *Clinical Medicine & Research* **4**: 189–99
- Hurst MRH, Becher SA, Young SD, Nelson TL & Glare TR (2011) *Yersinia entomophaga* sp. nov., isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**: 844–849
- Hurtrel B, Alonso JM, Lagrange PH & Hurtrel M (1981) Delayed-type hypersensitivity and acquired resistance to plague in mice immunized with killed *Yersinia pestis* and immunoregulators. *Immunology* **44**: 297–304
- Isaksson EL, Aili M, Fahlgren A, Carlsson SE, Rosqvist R & Wolf-Watz H (2009) The Membrane Localization Domain Is Required for Intracellular Localization and Autoregulation of YopE in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity* **77**: 4740–4749
- Jarrett CO, Deak E, Isherwood KE, Oyston PC, Fischer ER, Whitney AR, Kobayashi SD, DeLeo FR & Hinnebusch BJ (2004) Transmission of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector. *Journal of Infectious Diseases* **190**: 783–792
- Jawetz E & Meyer KF (1944) The behaviour of virulent and avirulent *P. pestis* in normal and immune experimental animals. *Journal of Infectious Diseases* **74**: 1–13
- Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology (1985) Opinion 60 : Rejection of the Name *Yersinia pseudotuberculosis* subsp . *pestis* (van Loghem) Bercovier et al . 1981 and Conservation of the Name *Yersinia pestis* (Lehmann and Neumann) van Loghem 1944 for the Plague Bacillus. *International Journal of Systematic Bacteriology*: 540
- Kutyrev V, Mehig RJ, Motin VL, Pokrovskaya MS, Smirnov GB & Brubaker RR (1999) Expression of the plague plasminogen activator in *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **67**: 1359–1367
- Lane MC, Alteri CJ, Smith SN & Mobley HLT (2007) Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**:
- van Loghem JJ (1944) The classification of the plague- bacillus. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology* **10**: 15–16
- Lukaszewski RA, Kenny DJ, Taylor R, Rees GC, Hartley MG & Oyston PCF (2005) Pathogenesis of *Yersinia pestis* Infection in BALB/c Mice : Effects on Host Macrophages and Neutrophils. *Infection and Immunity* **73**: 7142–7150

- Malassez L & Vignal W (1883) Physiologie pathologique - Tuberculose zoogléique. *Archives de physiologie normale et pathologique* **97**: 1006–1009
- Merhej V, Adekambi T, Pagnier I, Raoult D, Drancourt M, Adékambi T, Pagnier I, Raoult D & Drancourt M (2008) *Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**: 779–784
- Michiels T, Wattiau P, Brasseur R, Ruyschaert JM & Cornelis G (1990) Secretion of Yop Proteins by *Yersinia*. *Infection and Immunity* **58**: 2840–2849
- Mohammadi S & Isberg RR (2009) *Yersinia pseudotuberculosis* Virulence Determinants Invasin, YopE, and YopT Modulate RhoG Activity and Localization. *Infection and Immunity* **77**: 4771–4782
- Mollaret HH (1963) Conservation expérimentale de la peste dans le sol. Experimental conservation of plague in the soil. *Bulletin de la Société de pathologie exotique* **56**: 1168–1182
- Mollaret HH, Karimi Y, Eftekhari M & Baltazard M (1963) La peste de fouissement. Burrowing plague. *Bulletin de la Société de pathologie exotique* **50**: 1186–1193
- Morin JG (1983) Coastal Bioluminescence: Patterns and Functions. *Bulletin of Marine Science* **33**: 787–817
- Mueller CA, Broz P, Muller SA, Ringler P, Erne-Brand F, Sorg I, Kuhn M, Engel A & Cornelis GR (2005) The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science* **310**: 674–676
- Murros-Konttinen A, Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H, Johansson P, Rahkila R & Björkroth J (2011a) *Yersinia nurmii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 2368–2372
- Murros-Konttinen A, Johansson P, Niskanen T, Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H & Björkroth J (2011b) *Yersinia pekkanenii* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **61**: 2363–2367
- Nealson KH, Platt T & Hastings JW (1970) Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System. *Journal of Bacteriology* **104**: 313–322
- Oba Y, Branham MA & Fukatsu T (2011) The terrestrial bioluminescent animals of Japan. *Zoological Science* **28**: 771–789
- Parkhill J, Wren BW, Thomson NR, Titball RW, Holden MTG, Prentice MB, Sebahia M, James KD, Churcher C, Mungall KL, Baker S, Basham D, Bentley SD, Brooks K, Cerdeño-Tárraga AM, Chillingworth T, Cronin A, Davies RM, Davis P, Dougan G, *et al*

- (2001) Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* **413**: 523–527
- Perry RD & Fetherston JD (1997) *Yersinia pestis* — Etiologic Agent of Plague. *Clinical Microbiology Reviews* **10**: 35–66
- Perry RD, Pendrak ML & Schuetze P (1990) Identification and Cloning of a Hemin Storage Locus Involved in the Pigmentation Phenotype of *Yersinia pestis*. *Journal of Bacteriology* **172**: 5929–5937
- Pollitzer R (1954) Plague. In *World Health Organization Monograph Series 22* Geneva: World Health Organization, Geneva, Switzerland
- Portnoy DA & Falkow S (1981) Virulence-Associated Plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. *Journal of Bacteriology* **144**: 877
- Pouillot F, Derbise A, Kukkonen M, Foulon J, Korhonen TK & Carniel É (2005) Evaluation of O-antigen inactivation on Pla activity and virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* harbouring the pPla plasmid. *Microbiology* **151**: 3759–3768
- Pouliot K, Pan N, Wang SX, Lu S, Lien E & Goguen JD (2007) Evaluation of the role of LcrV-Toll-Like receptor 2-mediated immunomodulation in the virulence of *Yersinia pestis*. *Infection and Immunity* **75**: 3571–3580
- Prentice MB & Rahalison L (2007) Plague. *The Lancet* **369**: 1196–1207
- Prior JL, Parkhill J, Hitchen PG, Mungall KL, Stevens K, Morris HR, Reason AJ, Oyston PCF, Dell A, Wren BW & Titball RW (2001) The failure of different strains of *Yersinia pestis* to produce lipopolysaccharide O-antigen under different growth conditions is due to mutations in the O-antigen gene cluster. *FEMS Microbiology Letters* **197**: 229–233
- Pujol C & Bliska JB (2003) The ability to replicate in macrophages is conserved between *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity* **71**: 5892–5899
- Ramalingaswami V (1995) Plague in India. *Nature Medicine* **1**: 1237–1239
- Rocchetta HL, Boylan CJ, Foley JW, Iversen PW, Letourneau DL, Millian CLMC, Contag PR, Jenkins DE & Parr TR (2001) Validation of a Noninvasive, Real-Time Imaging Technology Using Bioluminescent *Escherichia coli* in the Neutropenic Mouse Thigh Model of Infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**: 129–137
- Rosqvist R, Persson C, Hakansson S, Nordfeldt R & Wolfwatz H (1995) Translocation of the *Yersinia* YopE and YopH virulence proteins into target cells is mediated by YopB

- and YopD. In *Yersiniosis: Present and Future*, Ravagnan G & Chiesa C (eds) pp 230–234. Postfach, CH-4009 Basel, Switzerland: Karger
- Russel P, Eley SM, Hibbs SE, Manchee RJ, Stagg AJ & Titball RW (1995) A comparison of Plague vaccine, USP and EV76 vaccine induced protection against *Yersinia pestis* in a murine model. *Vaccine* **13**: 1551–1556
- Russell WMS & Burch RL (1959) *The Principles of Humane Experimental Technique* Universiti. Wheathampstaed, UK.
- Sample AK, Fowler JM & Brubaker RR (1987) Modulation of the low-calcium response in *Yersinia pestis* via plasmid-plasmid interaction. *Microbial Pathogenesis* **2**: 443–453
- Sauvonnet N, Lambermont I, van der Bruggen P & Cornelis GR (2002) YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in macrophages and T-cell proliferation through inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Molecular Microbiology* **45**: 805–815
- Schleifstein JI, Marion B & Coleman B (1939) An unidentified microorganism resembling *B. lignieri* and *Pasteurella pseudotuberculosis* and pathogenic for man. *New York State Journal of Medicine* **39**: 1749–1753
- Sebbane F, Devalckenaere A, Foulon J, Carniel É & Simonet M (2001) Silencing and reactivation of urease in *Yersinia pestis* is determined by one G residue at a specific position in the ureD gene. *Infection and Immunity* **69**: 170–176
- Sebbane F, Gardner D, Long D, Gowen BB & Hinnebusch BJ (2005) Kinetics of Disease Progression and Host Response in a Rat Model of Bubonic Plague. *American Journal of Pathology* **166**: 1427–1439
- Sha J, Agar SL, Baze WB, Olano JP, Fadhil AA, Erova TE, Wang SF, Foltz SM, Suarez G, Motin VL, Chauhan S, Klimpel GR, Peterson JW & Chopra AK (2008) Braun lipoprotein (Lpp) contributes to virulence of yersiniae: Potential role of lpp in inducing bubonic and pneumonic plague. *Infection and Immunity* **76**: 1390–1409
- Shimomura O (2006) *Bioluminescence: chemical principles and methods* World Scientific Publishing Co
- Shimomura O & Johnson FH (1976) Chemical Nature of Bioluminescence Systems in Coelenterates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **72**: 1546–1549
- Simond P (1898) La propagation de la peste. *Annales de l'Institut Pasteur* **12**: 625–687

- Simonet M, Riot B, Fortineau N & Berche P (1996) Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the *inv* gene. *Infection and Immunity* **64**: 375–379
- Skurnik M, Peippo A & Ervela E (2000) Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Yersinia pseudotuberculosis* serotype O. *Molecular Microbiology* **37**: 316–330
- Sodeinde OA, Subrahmanyam YVBKVBK, Stark K, Quan T, Bao YD & Goguen JD (1992) A Surface Protease and the Invasive Character of Plague. *Science* **258**: 1004–1007
- Sprague LD & Neubauer H (2005) *Yersinia aleksiciae* sp nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **55**: 831–835
- Sprague LD, Scholz HC, Amann S, Busse H-JJ & Neubauer H (2008) *Yersinia similis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**: 952–958
- Stenseth NC, Atshabar BB, Begon M, Belmain SR, Bertherat E, Carniel É, Gage KL, Leirs H, Rahalison L & Bertherat É (2008) Plague: Past, Present, and Future. *PLoS Medicine* **5**: 9–13
- Swartz MA (2001) The physiology of the lymphatic system. *Advanced Drug Delivery Reviews* **50**: 3–20
- Szittner R & Meighen E (1990) Nucleotide Sequence, Expression, and Properties of Luciferase Coded by *lux* Genes from a Terrestrial Bacterium. *Journal of Biological Chemistry* **265**: 16581–16587
- Tarantola A, Mollet T, Gueguen J, Barboza P, Bertherat & Bertherat E (2009) Plague outbreak in the Libyan Arab Jamahiriya. *Eurosurveillance* **14**: 1–3
- Thorslund SE, Edgren T, Pettersson J, Nordfelth R, Sellin ME, Ivanova E, Francis MS, Isaksson EL, Wolf-Watz H & Fallman M (2011) The RACK1 Signaling Scaffold Protein Selectively Interacts with *Yersinia pseudotuberculosis* Virulence Function. *PLoS One* **6**:
- Trcek J, Berschl K & Trülsch K (2010a) In vivo analysis of *Yersinia enterocolitica* infection using *luxCDABE*. *FEMS Microbiology Letters* **307**: 201–206
- Trcek J, Fuchs TM, Trülsch K & Trulzsch K (2010b) Analysis of *Yersinia enterocolitica* invasins expression in vitro and in vivo using a novel *luxCDABE* reporter system. *Microbiology* **156**: 2734–2745

- Tromberg BJ, Shah N, Lanning R, Cerussi A, Espinoza J, Pham T, Svaasand L & Butler J (2000) Non-invasive in vivo characterization of breast tumors using photon migration spectroscopy. *Neoplasia* **2**: 26–40
- Turner JK, McAllister MM, Xu JL & Tapping RI (2008) The Resistance of BALB / cJ Mice to *Yersinia pestis* Maps to the Major Histocompatibility Complex of Chromosome 17. *Infection and Immunity* **76**: 4092–4099
- Uliczka F, Pisano F, Kochut A, Opitz W, Herbst K, Stolz T & Dersch P (2011) Monitoring of Gene Expression in Bacteria during Infections Using an Adaptable Set of Bioluminescent, Fluorescent and Colorigenic Fusion Vectors. *PLoS One* **6**: 1–12
- Ursing J, Brenner DJ, Bercovier H, Fanning GR, Steigewalt AG, Brault J, Mollaret HH & Steigerwalt AG (1980) *Yersinia frederiksenii*: A New Species of Enterobacteriaceae Composed of Rhamnose-Positive Strains (Formerly Called Atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-Like). *Current Microbiology* **4**: 213–217
- Vestheim H & Kaartvedt S (2006) Plasticity in coloration as an Antipredator Strategy among Zooplankton. *Limnology and Oceanography* **51**: 1931–1934
- Viboud GI, Mejia E & Bliska JB (2006) Comparison of YopE and YopT activities in counteracting host signalling responses to *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Cellular Microbiology* **8**: 1504–1515
- Wauters G, Janssens M, Steigerwalt AG & Brenner DJ (1988) *Yersinia mollaretii* sp. nov. and *Yersinia bercovieri* sp. nov., Formerly Called *Yersinia enterocolitica* Biogroups 3A and 3B. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**: 424–429
- Welkos SL & Friedlander AM (1996) Studies on the role of plasminogen activator in systemic infection of mice by *Yersinia pestis*. *Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology* **96**: 192
- Welkos SL, Pitt MLM, Martinez MJ, Friedlander AM, Vogel AP & Tammariello R (2002) Determination of the virulence of the pigmentation-deficient and pigmentation-/plasminogen activator-deficient strains of *Yersinia pestis* in non-human primate and mouse models of pneumonic plague. *Vaccine* **20**: 2206–2214
- Wiles S, Robertson BD, Frankel G & Kerton A (2009) Bioluminescent Monitoring of In Vivo Colonization and Clearance Dynamics by Light-Emitting Bacteria. In *Methods in Molecular Biology* pp 137–153.

- World Health Organization (2010) Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. In *Weekly Epidemiological Record* pp 37–48. Genève
- Xiong YQ, Willard J, Kadurugamuwa JL, Francis KP & Bayer AS (2005) Real-Time In Vivo Bioluminescent Imaging for Evaluating the Efficacy of Antibiotics in a Rat *Staphylococcus aureus* Endocarditis Model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**: 380–387
- Yersin A (1894) La peste bubonique à Hong-Kong. *Annales de l'Institut Pasteur*: 662–667
- Yersin A (1897) Sur la peste bubonique (séro-thérapie). *Annales de l'Institut Pasteur* **11**: 81–93
- Zhou D, Tong Z, Song Y, Han Y, Pei D, Pang X, Zhai J, Li M, Cui B, Qi Z, Jin L, Dai R, Du Z, Wang JJ, Guo Z, Huang P & Yang R (2004) Genetics of Metabolic Variations between *Yersinia pestis* Biovars and the Proposal of a New Biovar, *microtus*. *Journal of Bacteriology* **186**: 5147–5152
- Zhou H, Monack DM, Kayagaki N, Wertz I, Yin J, Wolf B & Dixit VM (2005) *Yersinia* virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NF-kappa B activation. *Journal of Experimental Medicine* **202**: 1327–1332

Annexes

Article publié dans le cadre de la thèse

Nham T, Filali S, Danne C, Derbise A, Carniel E. Imaging of bubonic plague dynamics by in Vivo tracking of bioluminescent Yersinia pestis. PLoS One. 2012;7(4):e34714. Epub 2012 Apr 5. PubMed PMID: 22496846; PubMed Central PMCID:PMC3320629.

Imaging of Bubonic Plague Dynamics by *In Vivo* Tracking of Bioluminescent *Yersinia pestis*

Toan Nham, Sofia Filali, Camille Danne, Anne Derbise, Elisabeth Carniel*

Yersinia Research Unit, Institut Pasteur, Paris, France

Abstract

Yersinia pestis dissemination in a host is usually studied by enumerating bacteria in the tissues of animals sacrificed at different times. This laborious methodology gives only snapshots of the infection, as the infectious process is not synchronized. In this work we used *in vivo* bioluminescence imaging (BLI) to follow *Y. pestis* dissemination during bubonic plague. We first demonstrated that *Y. pestis* CO92 transformed with pGEN-*luxCDABE* stably emitted bioluminescence *in vitro* and *in vivo*, while retaining full virulence. The light produced from live animals allowed to delineate the infected organs and correlated with bacterial loads, thus validating the BLI tool. We then showed that the first step of the infectious process is a bacterial multiplication at the injection site (*linea alba*), followed by a colonization of the draining inguinal lymph node(s), and subsequently of the ipsilateral axillary lymph node through a direct connection between the two nodes. A mild bacteremia and an effective filtering of the blood stream by the liver and spleen probably accounted for the early bacterial blood clearance and the simultaneous development of bacterial foci within these organs. The saturation of the filtering capacity of the spleen and liver subsequently led to terminal septicemia. Our results also indicate that secondary lymphoid tissues are the main targets of *Y. pestis* multiplication and that colonization of other organs occurs essentially at the terminal phase of the disease. Finally, our analysis reveals that the high variability in the kinetics of infection is attributable to the time the bacteria remain confined at the injection site. However, once *Y. pestis* has reached the draining lymph nodes, the disease progresses extremely rapidly, leading to the invasion of the entire body within two days and to death of the animals. This highlights the extraordinary capacity of *Y. pestis* to annihilate the host innate immune response.

Citation: Nham T, Filali S, Danne C, Derbise A, Carniel E (2012) Imaging of Bubonic Plague Dynamics by *In Vivo* Tracking of Bioluminescent *Yersinia pestis*. PLoS ONE 7(4): e34714. doi:10.1371/journal.pone.0034714

Editor: Yousef Abu Kwaik, University of Louisville, United States of America

Received: December 15, 2011; **Accepted:** March 9, 2012; **Published:** April 5, 2012

Copyright: © 2012 Nham et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: elisabeth.carniel@pasteur.fr

Introduction

Plague is an infectious disease caused by the Gram-negative bacillus *Yersinia pestis* [1]. The incidence of the disease has gradually decreased during the course of the third pandemic that started from Hong Kong in 1894. However, since the 1990's, human plague reappeared in countries where no cases had been reported for decades, and thus the plague is now categorized as a re-emerging disease [2]. Rodents are the main plague reservoir and the disease is transmitted from rodent to rodent via the bite of infected fleas [3]. Humans, which are incidental hosts of *Y. pestis*, are most commonly infected after the inoculation of the bacillus into the dermis during a fleabite. This mode of *Y. pestis* penetration generally gives rise to the development of the most common form of infection, bubonic plague, which is characterized by the appearance of a painful and inflammatory lymph node, the pathognomonic bubo. The infection then spreads to various organs, leading to a terminal and fatal septicemia. In the absence of treatment, bubonic plague lethality varies from 50 to 70% [4].

Various animal models are utilized to study plague pathogenesis (mice, monkeys, rats, etc.) [5–9], the most widely used being the mouse experimental model. This model is appropriate and reliable to study a natural *Y. pestis* infection, as rodents are the normal hosts for *Y. pestis*. To follow disease progression, the conventional method is to experimentally infect mice with *Y. pestis*, sacrifice

groups of animals at various time intervals, and determine bacterial counts in their tissues. This methodology has brought valuable information about the mode of *Y. pestis* spread during the infectious process, but it is laborious and time consuming, as it requires to collect various organs at various times post-infection, to crush them, to prepare serial dilutions of the tissue suspensions, to streak them on agar plates, and to count the bacterial colonies. Moreover, with this method, bacterial dissemination can be followed only in the tissues that have been collected. Most importantly, this approach suffers from a serious drawback attributable to intrinsic variations of biological systems. Indeed, the kinetics of bacterial spread and the fatal outcome greatly vary from one animal to another, even when inbred mouse strains are used. It is thus not possible to accurately follow disease progression as, at a given time of sacrifice, the animals are at different phases of the pathological process. One way to partly circumvent this biological variability is to use large cohorts of animals in order to obtain statistically significant data. This approach may bring reliable results, but is labor-intensive, expensive, and goes against the Animal Care standards and the current trend to reduce as much as possible the number of animals used for experimental studies. Other ways to limit biological variability include the injection of bacteria at very high doses or through artificial routes (intravenously or intraperitoneally), thus allowing a more rapid bacterial spread and therefore a narrower window of variation.

However, these non-physiological doses or modes of penetration generate pathological processes that do not accurately reflect the normal course of the bubonic infection [10].

The recent advent of *in vivo* bioluminescence imaging (BLI), that allows tracking the spread of inert particles or microorganisms in live animals, has been a step forward in the study of physiological and pathological processes. This technology has been successfully applied to the analysis of various viral, bacterial and fungal infections [11–14], including diseases caused by category A biowarfare bacterial agents such as *Bacillus anthracis* [15] and *Francisella tularensis* [16]. This technique relies on the introduction into a bacterium of genes encoding an enzyme that, in the presence of its substrate, catalyzes a reaction generating bioluminescence. The light emitted by the recombinant microorganism is measured using an *in vivo* BLI system. The bioluminescence tool has recently been applied to members of the genus *Yersinia*. For instance, the impact of a partial deletion of the pYV-encoded YopE protein on the course of a *Yersinia pseudotuberculosis* infection in BALB/c mice was followed using recombinant bacteria carrying on the pYV plasmid, the *luxCDABE* locus that encodes the luciferase and its substrate [17]. More recently, monitoring of gene expression during a *Y. pseudotuberculosis* infection was made possible after inserting various gene promoters upstream of the *luxCDABE* operon [18]. In *Yersinia enterocolitica*, a strain in which the *luxCDABE* operon has been inserted into the chromosome allowed tracking of the bacteria in living animals and comparison of the fate of the wild type strain to that of an *inv* mutant derivative [19].

In this study we first determined whether a bioluminescent *Y. pestis* could be a reliable tool to perform *in vivo* imaging, and we subsequently used this recombinant strain to study bubonic plague progression in a mouse model of experimental infection.

Results

Construction of a bioluminescent *Y. pestis* strain

A bioluminescent clone of *Y. pestis* was obtained by introduction of plasmid pGEN-*luxCDABE*, which harbors the *luxCDABE* operon from *Photobacterium luminescens* under the control of the *Pem7* promoter [12] into the virulent *Y. pestis* strain CO92, yielding CO92(pLux). Bioluminescence emission by the recombinant strain grown on LBH-Carb agar plates was checked with the IVIS 100 device. A luminescence signal was emitted by all CO92(pLux) colonies on the plate, while no signal was detected in the CO92 wild-type strain (Figure 1). Similarly, CO92(pLux) but not CO92 grown in broth emitted a bioluminescence signal detected with a Xenius plate reader (data not shown). The *luxCDABE* operon is thus functional in *Y. pestis*.

Evaluation of the bioluminescence tool under *in vitro* conditions

Since exogenous plasmids may impair *Y. pestis* multiplication, the growth kinetics in LB broth of CO92 and CO92(pLux) were followed over a two-day period. Both strains exhibited similar growth kinetics (Figure S1). A slight delay in bacterial multiplication was observed between 24 h and 28 h of growth. However, this growth delay disappeared after 30 h ($P \geq 0.2$ for the median cfu of CO92 and CO92(pLux) according to the Mann Whitney test).

The linear relation between light intensity and cfu counts was calculated using a large range of bacterial concentrations. For this purpose, CO92(pLux) was grown on LBH-Carb agar plates at 28°C, suspended in LB broth, and serially diluted from 7.5×10^1 to 7.5×10^8 cfu/ml. Each dilution was used to quantify the intensity of bioluminescence produced. As shown on Figure S2.A, a linear relationship between cfu and light emission was obtained for

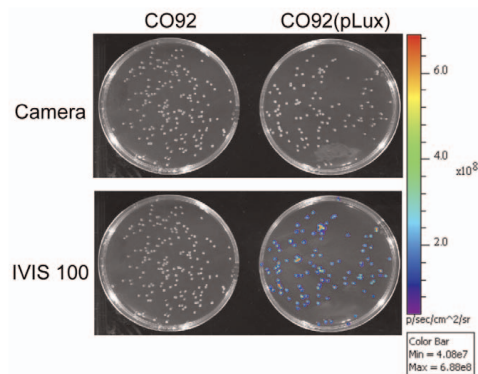


Figure 1. Bioluminescence imaging of *Y. pestis*. *Y. pestis* CO92 or CO92(pLux) were grown for 48 h at 28°C on LB-Carb plates. The plates were placed in an IVIS 100 device dark chamber, photographed under normal light and then bioluminescence emission was detected using a 7 s exposure time and a picture binning of 4. Both pictures were superimposed by the Living image software. Colored dots represent bioluminescence emitting bacteria. The color bar on the right shows the intensity of bioluminescence light coded in the picture from indigo (4.1×10^7 photon/s.cm².steradian) to red (6.9×10^8 photon/s.cm².steradian). doi:10.1371/journal.pone.0034714.g001

bacterial concentrations $\geq 7.5 \times 10^4$ cfu/ml. After logarithmic transformation of light intensity and cfu counts $\geq 7.5 \times 10^4$ cfu/ml, the Pearson two-tailed test indicated a highly significant correlation ($P < 0.0001$). Light signals generated by bacterial concentrations below 7.5×10^4 cfu/ml represented the background level, which was around 175 photons/s.ml. The correlation between cfu and light emission was further analyzed in actively multiplying bacteria. Aliquots of CO92(pLux) growing in LB-Carb broth were taken at various time points to both quantify bioluminescence emission and determine cfu counts. A robust correlation ($P < 0.0001$) between the two sets of data was again observed (Figure S2.B). The intensity of the bioluminescent signal could thus provide an accurate estimate of the number of cells for bacterial concentrations $\geq 7.5 \times 10^4$ cfu/ml.

The *luxCDABE* operon is under the control of the *Pem7* promoter, which is constitutive in *E. coli* [12]. Since *Y. pestis* has to adapt to different environments and temperatures during its life stage in the flea (21–30°C) and in a mammalian host (37°C), we considered whether expression of *luxCDABE* would be constitutive in this species, or whether it would be temperature-dependent. As shown on Figure S3, the amount of light per cfu was significantly higher when bacteria were grown at 37°C than at 28°C, both on agar plates and in broth. These results suggest that the temperature of the mammalian host might be favorable for an efficient production of luciferase activity.

The stability of pGEN-*luxCDABE* and of the bioluminescence signal over time and bacterial division was determined by performing 13 subcultures of CO92(pLux) in LB broth without carbenicillin over 19 days. At different time points (day 0, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 17 and 19), bacterial aliquots were streaked on LBH plates and individual colonies were checked for their capacity to grow in the presence of Carb (maintenance of the pGEN-*luxCDABE* plasmid), and to emit luminescence (maintenance of the luciferase activity). The proportion of pGEN-*luxCDABE*-harboring

colonies remained high (>95%) throughout the experiment, and all emitted light (data not shown), indicating a high stability of bioluminescence emission in CO92(pLux) under *in vitro* conditions.

Evaluation of the bioluminescence tool under *in vivo* conditions

The potential impact of the presence of pGEN-*luxCDABE* on *Y. pestis* virulence was evaluated in the mouse model of bubonic plague. The presence in the recombinant CO92(pLux) strain of the major virulence factors that are easily lost in *Y. pestis* (pPla, pYV and the HPI) was confirmed by PCR prior to infections. The LD₅₀ by the subcutaneous (sc) route of CO92(pLux) was similar to that of the wild-type CO92 (<10 cfu for both strains). The survival curves were also similar (Figure S4), with no statistical difference (Mantel-Cox test) in animals infected with 10 cfu (P = 0.63) or 100 cfu (P = 0.19) of either strain, indicating that the presence of pGEN-*luxCDABE* did not affect the virulence of *Y. pestis* upon sc infection.

The maintenance of the plasmid and of the capacity of CO92(pLux) to emit light upon *in vivo* multiplication was verified by analyzing bacteria recovered from the spleen and liver of two moribund mice on day 5. All 300 colonies tested (200 recovered from the spleen and 100 from the liver) grew on LBH-Carb plates and emitted light (data not shown), indicating that the plasmid and the luminescence activity were retained during *in vivo* growth of *Y. pestis*.

To determine whether the bioluminescence signal emitted by *Y. pestis* was sufficient to be detected during the infectious process, mice were infected sc with 100 cfu of strain CO92(pLux). The animals were anesthetized and monitored daily for bioluminescence emission with the IVIS 100 device. A signal was visible at the injection site from the first observation (24 h post-infection) and appeared in other locations in the following days (Figure 2A), indicating that the bioluminescent signal emitted by CO92(pLux) could be used to track *Y. pestis* dissemination *in vivo*.

To link the signal sources to the colonization of specific organs, infected mice were bioluminescence-monitored at different times post-infection (pi). They were subsequently sacrificed, dissected to expose the organs, and monitored again. The luminescent signals observed in live animals in a dorsal position matched those of the

anatomical sites (injection site, liver, axillary and inguinal lymph nodes) from which the signal was predicted to be emitted (Fig. 2B). Bacterial colonization of the spleen was best visualized when the animals were placed in ventral position.

Next we wanted to determine whether the amount of bioluminescence emitted from the inguinal lymph nodes, spleen and liver of live animals correlate with bacterial loads. For this purpose 14 mice were infected sc with 100 cfu of CO92(pLux), they were bioluminescence-monitored at different time points, and the radiance from the region of interest (ROI) defining each organ was measured. The animals were immediately sacrificed afterwards and their organs were removed and crushed to determine cfu counts. Light emission increased with bacterial burden in the three organs (Figure 3), and according to the Pearson test, the number of bacteria significantly correlated with the intensity of light emission in these tissues (inguinal lymph nodes: P = 0.0392, spleen: P < 0.0001, liver: P = 0.0017). The higher P value observed for the inguinal lymph nodes might be at least partly attributable to several nodes that emitted light while no cfu were obtained (triangles below the detection limit on Figure 3A). This could be due to a technical problem linked to the difficulty to differentiate the inguinal lymph nodes from the surrounding fat tissue in some mice. A removal of these probably falsely cfu-negative nodes would have further improved the correlation between bacterial loads and light emission. Nevertheless, our results indicate that bioluminescence quantification can provide reliable non-invasive measures of *Y. pestis* burden in the organs of infected live animals.

To obtain data that could be used to compare disease progression between mice, as well as at different times pi in the same mouse, a predefined standard setting ranging from 7×10^5 to 5×10^8 p/sec/cm²/sr was selected and used for all *in vivo* measurements of bioluminescent signals in live animals. This range of radiance was chosen to avoid most of background light (lower setting high enough), while reflecting a wide dynamic scale (the highest upper setting that still permitted contrast). Using this predefined setting, the minimal amounts of bacteria that allowed a signal detection were 8.3×10^5 cfu for the spleen, 1.3×10^5 cfu for the liver, and 1.5×10^4 cfu for the inguinal lymph nodes.

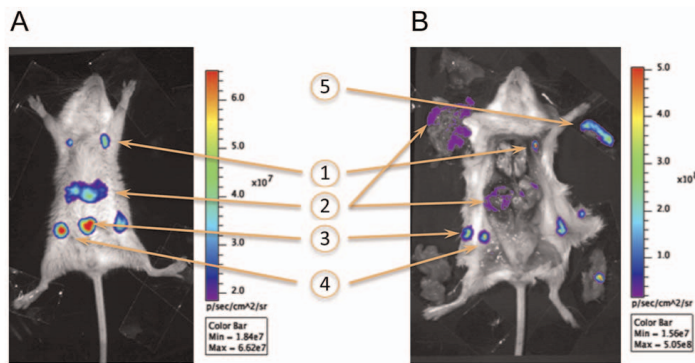


Figure 2. Linking a bioluminescence signal to the colonization of a specific organ. (A) Example of the light emitted by a live animal. (B) Light emitted by the organs of the same animal. Arrows point at: (1) axillary lymph nodes, (2) liver (one lobe still in place and the remaining of the organ removed from its anatomical site), (3) injection site (split in two parts during dissection), (4) inguinal lymph nodes, and (5) spleen (removed from its anatomical site and visualized in live animals mostly in ventral position). On the dissection picture, the gut has been removed and placed next to the right hind leg, while the peritoneum including a portion of the infection site is located next to the left hind leg. Color bars on the right of each picture show the intensity of bioluminescence light coded in the picture from indigo to red.
doi:10.1371/journal.pone.0034714.g002

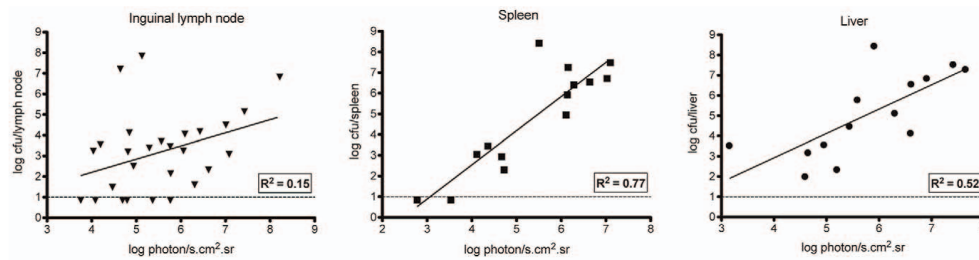


Figure 3. Correlation between bioluminescence emission by specific organs in live animals and cfu counts. Live animals were monitored for bioluminescence emission and subsequently sacrificed at various times pi. Their inguinal lymph nodes, spleen and liver were taken to determine the bacterial load in each organ. Each point accounts for one organ taken from an infected animal. The continuous line represents the least square fit linear regression, and the related goodness of fit coefficient (R^2) is indicated on each graph. The horizontal dotted line indicates the detection limit of the bacterial load (10 cfu). doi:10.1371/journal.pone.0034714.g003

General scheme of *Y. pestis* dissemination in vivo

Once the characteristics of the bioluminescent tool were defined and its suitability to track *Y. pestis* in live animals confirmed, we used this tool to follow the course of bubonic plague in individual animals. BALB/cByJ female mice were infected sc in the *linea alba* with 100 cfu of CO92(pLux) on day 0 (D0), and the animals were anesthetized and monitored daily for bioluminescence emission from D1 until their death, using our defined IVIS settings. To limit the effect of individual variations inherent to live biological systems, a large group of mice (46 animals) was used in six independent experiments, and the data were pooled and analyzed.

The bioluminescent signal followed the same route of spread in most animals (74%), allowing to delineate successive steps and to draw a general scheme of dissemination. An example of each of these steps is shown on Figure 4. A signal, already visible in all animals on the first day of observation (D1), was initially limited to the site of injection (Figure 4A). The second site to emit light was the inguinal lymph node either on one side or on both sides of the animal (Figure 4B). The following luminescent organs were the ipsilateral axillary lymph nodes (Fig. 4C). A light-emitting line running between the inguinal and axillary lymph nodes was sometimes visible both on live and necropsied animals (Figure 5A), suggesting a direct connection between the two lymph nodes via the lymphatic vessels. To visualize this route of lymphatic drainage, 100 μ l of a 5% Evans Blue solution were injected sc in the *linea alba* of four mice. The animals were sacrificed 1, 10, 20 or 30 min after the injection to follow the fate of the dye. The two lymph nodes were stained in blue and a thin, pale vessel also colored in blue and connecting the two lymph nodes was visible adjacent to the blood vessels (Fig. 5B). These results are consistent with a route of bacterial dissemination starting from the injection site and using the lymphatic stream to reach first the inguinal lymph node and then the axillary lymph node. Next, the bioluminescence extended to the sub diaphragmatic zone identified as the liver region, and a spot corresponding to the spleen was also visible on the back of the animals (Figure 4D, dorsal and ventral position). A bioluminescence of the entire animal, including peripheral sites such as the tail or the ears (Figure 4E), highly evocative of a septicemic stage was then observed. This terminal septicemia, which was confirmed by the recovery of circulating *Y. pestis* from the blood, was systematically followed by the death of the animals.

Exceptions to this general scheme were a limitation of the signal to the injection site until the animal death (11% of the mice) or a

direct colonization of the inner organs without visualizing the lymph node steps in 15% of the animals, both suggestive of a direct passage of the bacteria in the blood.

Of note, no signal at anatomical sites corresponding to the intestine, the lungs or the kidneys were detected on living animal before the final septicemic phase. This was in accordance with the absence of bioluminescence detected in these organs when animals were autopsied (Figure 2B).

Kinetics of bacterial progression during bubonic plague

To determine the kinetics of bacterial spread in our mouse model of bubonic plague, the average time at which the anatomical sites started to emit light was calculated for 24 individual mice for which all data were available from D1 until their death. The injection site was always bioluminescent from the first day of observation (D1) in all animals. On average, the signal appeared on D3 in the inguinal lymph node ($D3.3 \pm 0.4$) and soon after in the axillary lymph node ($D3.6 \pm 0.4$) (Figure 6). The next affected organs were the spleen and liver, which both started to emit light around D4 (4.1 ± 0.3 and 3.9 ± 0.3 , respectively). Their colonization was followed on D5 (5 ± 0.6) by a bioluminescence of the entire body, characteristic of a septicemic phase. Because of the very short period of time elapsed between invasion of the whole body and death, the septicemic phase could not always be observed with our daily monitoring window. The death of the animals occurred on average around D6 (5.8 ± 0.4).

This chronology of bacterial dissemination allowed estimating of the average time at which the colonization of each organ occurred in a group of animals. However, our observations also evidenced important differences from one animal to another. The constant feature was that all mice emitted light at the site of injection on D1, and that the signal was restricted to this site in all except one animal at this early time point (Figure 6). After D1, large variations in the times at which the various colonization steps occurred were observed. For instance, the time of the first light emission in the inguinal lymph node varied from D1 to D7 in different animals. Similarly, a variation of 6 days was observed for the appearance of bioluminescence in the axillary lymph node, of 4 days in the spleen and liver, of 3 days for the whole body and of 6 days for the fatal outcome. These results reflect a high variability in the rapidity of dissemination of the bacteria in each animal.

Despite this variability, the analysis of the time interval elapsed between the appearance of a signal at two consecutive steps during disease progression for each individual mouse revealed a

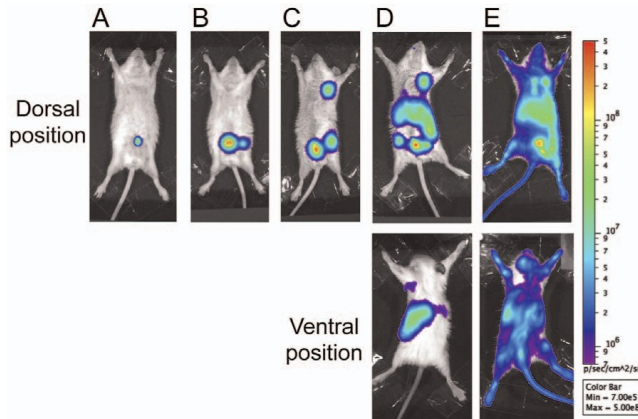


Figure 4. Different steps of bacterial spread during bubonic plague. The bioluminescent signal was visible first at the injection site (A). It then reached the inguinal lymph node (B), the axillary lymph node (C), the liver (D, dorsal position) and the spleen (D, ventral position), and finally the entire body (E). Each picture is an example of an animal displaying a signal characteristic of each step. The color scale on the right represents the settings used to monitor light emission in all mice throughout the observation period.
doi:10.1371/journal.pone.0034714.g004

remarkably consistent trend. Although emission of light from the inguinal lymph nodes could take up to 7 days, once this site started to emit light, the kinetics of dissemination to other organs was remarkably constant in all animals. Indeed, from the lymph nodes, the signal reached the liver and spleen within one day (1 ± 0.2), the entire body (septicemic phase) in two days (2 ± 0.5), and the animal died soon after ($D2.2 \pm 0.3$). All animals seen at the septicemic phase were systematically found dead on the next day. In a few cases, the disease progressed even faster and the window frame of one day did not allow to visualize the intermediate steps between lymph node colonization and the terminal phase of the infection. Therefore, our results revealed two important phenomena: (i) the variations in the kinetics of bacterial spread were essentially

attributable to the length of time the signal remained limited to the injection site, and (ii) as soon as the signal reached the lymph nodes, the disease progressed very rapidly, leading to the animal death within two days.

Discussion

Past studies performed at the post-mortem stage on autopsied human plague victims have been invaluable for understanding pathological processes that took place during bubonic plague. However, they were performed after the terminal phase of the disease, when the entire body was colonized, and therefore the mode of *Y. pestis* dissemination could not be clearly established.

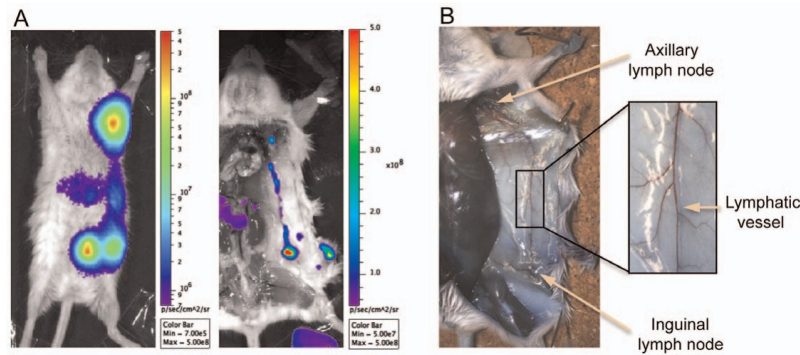


Figure 5. Lymphatic connection between the inguinal and axillary lymph nodes. (A) Observation of a bioluminescent signal connecting the two lymph nodes on a live and on a necropsied mouse. (B) Staining of the lymphatic system after injection in the *linea alba* of the Evans blue dye. The axillary and inguinal lymph nodes are stained in blue and the lymphatic vessel draining the two nodes is seen as a thin pale blue line adjacent to the blood vessels.
doi:10.1371/journal.pone.0034714.g005

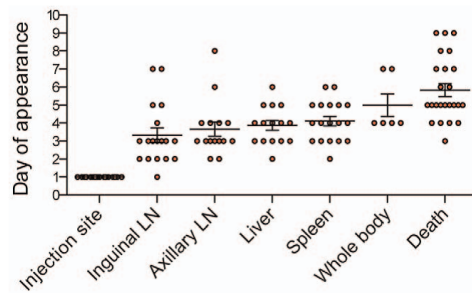


Figure 6. Time of appearance of a bioluminescent signal in the various organs of infected mice. Each circle corresponds to an individual animal. Horizontal bars represent the mean and vertical bars the standard error of the mean of the data collected from 24 mice. LN: lymph node.
doi:10.1371/journal.pone.0034714.g006

Works using various animal models brought additional and useful information. However, they only give snapshots of the infection, as the infectious process is not synchronized in all animals. Indeed, follow up of bacterial infection progression is most often hampered by the biological variability inherent to animal models. This phenomenon is exemplified by the fact that the LD₅₀, commonly used as a means for quantifying bacterial virulence, relies on the fact that a similar bacterial inoculum will be lethal for only half of the animals, even if they have an identical genetic background (syngenic mice) and are kept under similar conditions. In addition, when physiological doses and routes of inoculation are utilized, variations in time to death are commonly observed. This lack of synchronization makes the analysis of bacterial spread, tissue lesions or innate immune response difficult, as the animals are not at the same phase of the infectious process at the time of sacrifice. Tracing bacterial spread through the monitoring of a bioluminescent signal can bring a technical answer to this issue. The use of *in vivo* imaging has been applied to the study of various bacterial infections and has revealed some pathophysiological processes that had not been previously seen using conventional methods [12,15]. This technique is much simpler and less time consuming than methods relying on bacterial isolation and enumeration from different organs. It has also the advantage over conventional methods based on the sacrifice of groups of animals at given time points to make possible both reduction and refining of animal use, two of the '3R principles' of Russell and Burch [20].

The aim of this work was to use the *in vivo* BLI technology to gain a deeper knowledge of the mode of *Y. pestis* dissemination during bubonic plague. Since bioluminescence has never been used to track *Y. pestis* during the infectious process, the first step of this study was to determine its applicability to the plague bacillus. The capacity of *Y. pestis* to emit bioluminescence *in vitro* was previously shown after insertion of the *luxAB* genes downstream of the *ymt* or *caf* promoters in strain EV76 [21]. Similarly, we observed here that a *Y. pestis* CO92 carrying pGEN-*luxCDABE*, a low-copy number plasmid that encodes the luciferase enzyme and its substrate [12], gained the capacity to emit light during growth in broth or on agar plates.

However, this technology would only be applicable if the plasmid carrying the *lux* operon is stable and if the bioluminescent signal does not wane with bacterial division *in vitro* or *in vivo*. We found that the pGEN-*luxCDABE* plasmid was kept and the

luciferase activity was retained in 95% of the colonies despite repeated *Y. pestis* subcultures *in vitro*, and in 100% of the colonies upon multiplication in mouse organs. Introduction of exogenous plasmids into *Y. pestis* may impair its virulence [22]. Moreover, the product of *luxD* has been found to be toxic in mycobacteria, most likely because, in conjunction with the products of *luxC* and *luxE*, it forms part of an enzyme complex which alters the cell wall structure of these bacteria [23]. We found that neither the presence of the pGEN-*luxCDABE* plasmid, nor the luciferase activity had an impact on the kinetics of bacterial growth *in vitro* and on the virulence of *Y. pestis* in the mouse experimental model of bubonic plague.

The luciferase activity produced by *Y. pestis* CO92(pLux) during the infectious process was high enough to generate a light signal that was detectable by the IVIS. Moreover, the assignment of a specific organ to each light spot based on its anatomical location in live mice was confirmed after animal dissection and organ exposure, thus indicating that the bioluminescent signal could be used to track *Y. pestis* progression in the mouse experimental model of bubonic plague. In other infection models, the intensity of light emission did not systematically give an accurate estimate of bacterial loads in various organs. While a good correlation between these two parameters was observed during inhalational and intestinal anthrax [15], or in the neutropenic mouse thigh model of *Escherichia coli* infection [24], this was not the case in the *Streptococcus pneumoniae* lung infection model for instance [25]. We found here that *Y. pestis* cfu counts and light intensity emitted by infected organs (lymph nodes, spleen and liver) in live mice were significantly correlated, thus providing a reliable picture of the route of bacterial dissemination.

To study the kinetics of bacterial spread in the same animal and to compare disease progression in different animals and at different time points, we decided to use a predefined standard light setting that was not too sensitive to minimize background luminescence while providing a good contrast between light emitting spots. Using this setting, the detection limit ranged from $\approx 10^4$ to 8×10^3 cfu depending on the organ. Hence, an absence of light emission in an organ means that the bacterial load is below this threshold, and not necessarily that there is a complete absence of bacteria in this organ. Similar thresholds have been reported in the rat endocarditis model of *Staphylococcus aureus* infection [26].

Having demonstrated that a bioluminescent *Y. pestis* strain could be used for *in vivo* BLI, we applied this technology to the analysis of bubonic plague development in live mice. The use of a large set of animals allowed us to confidently draw a general scheme of *Y. pestis* dissemination. Our results indicate that the first step of the infectious process is a bacterial multiplication at the site of injection in the *linea alba*. This step is followed by a colonization of the draining inguinal lymph node, in accordance with the clinical descriptions of bubonic plague in humans, characterized by a bubo draining the site of the flea bite [4]. Since we performed the sc injection approximately in a median line on the abdomen, either a unilateral or a bilateral infection of the inguinal lymph nodes was observed. The next site colonized is the ipsilateral axillary lymph node. This route of dissemination from the initial draining lymph node (designated primary bubo of first order) to the next one located on the same side (primary bubo of second order) was suggested by pathological examinations of patients who died of bubonic plague [4,27]. Since these analyses were done at a post-mortem stage characterized by an invasion of the whole body, the direct migration from the initial bubo to the contiguous lymph node could not be fully established. The fact that we observed a bioluminescent line connecting the two lymph nodes at an early stage of the infection demonstrates that this route of spread is

correct. The existence of known lymphatic connections between the two nodes [28], and our visualization of lymph vessels linking them, strongly suggest that the bacteria use the lymphatic stream to migrate from one lymph node to the next one. This route is also supported by the observation that in a rat model of bubonic plague, the bacteria penetrate into the primary bubo of second order (corresponding to the ipsilateral axillary lymph node), through the marginal sinus, which is drained by the afferent lymph channels [9].

Next the infection progresses to the liver and spleen, which are colonized almost simultaneously. This is consistent with previous works reporting high bacterial loads in these organs in human plague victims and animal models [4,9,27,29]. The colonization of these lymphoid tissues requires a passage of the bacteria into the blood circulation, either after a bacterial discharge into the thoracic duct, or directly within the infected lymph nodes by *in situ* disruption of the blood vessels. Arguing for the latter mode of blood invasion is the observation of major hemorrhages with disrupted blood vessels in the primary lymph nodes of infected mice or rats [6,9]. This early bacteremia should be moderate and transient, as no diffuse bioluminescent signal characteristic of a heavy blood infection was observed prior to the infection of the spleen and liver. An effective filtering of the blood stream by these lymphoid organs may explain the early clearance of the bacteria from the blood circulation and the ensuing development of secondary bacterial foci within these organs. The saturation of the filtering capacity of the spleen and liver coupled with massive *in situ* bacterial multiplication subsequently leads to a terminal septicemia with an invasion of the entire body, as attested by a luminescent signal emitted from the whole animal. This terminal septicemic stage of bubonic plague has been largely documented, both in human victims [4,27,30,31] and in non-human hosts [5,8,9,29,32,33].

It is worth noting that anatomical sites other than secondary lymphoid tissues did not emit light until the terminal septicemic phase in live animals. Previous studies that quantified bacterial loads in various tissues of experimentally infected animals showed for instance that the lungs could be infected. When we performed cfu counts from the lungs of necropsied animals, we could also detect the presence of bacteria, but most of the time they were present in low amounts ($<10^4$ cfu), and therefore below the detection limit. Therefore, although this non-lymphoid organ could be colonized, it does not seem to be a major site of *Y. pestis* multiplication. It is possible that the bacteria recovered from the lungs were from animals at the beginning of the systemic phase of the infection. Altogether, *in vivo* BLI suggests that the main targets of *Y. pestis* multiplication are the secondary lymphoid tissues (lymph nodes, spleen and liver), and that colonization of other organs is much less pronounced and may result from a secondary septicemic spread, at the terminal stage of the infectious process.

The ability to follow the progression of the disease over time in the same animal also allowed us to better define the kinetics of infection. Our observations evidenced important animal-to-animal variations in the rapidity of bacterial dissemination. Remarkably, our analysis showed that the high individual variability in the chronology of disease progression was directly linked to the time the bacteria remained confined at the site of injection (1 to 6 days). Impressively, once the bacteria had reached the lymph nodes, the disease progressed extremely rapidly, leading to the invasion of the entire body (septicemic phase) within two days and soon after to the death of all animals. This highlights the extreme acuteness of bubonic plague and the extraordinary capacity of *Y. pestis* to disseminate through secondary lymphoid organs to cause an extremely rapid and fatal septicemia.

In conclusion, the *in vivo* imaging, by tracking the spread of *Y. pestis* in live animals, allowed us to draw a general scheme that delineates the successive steps and kinetics of bacterial dissemination. This tool may have other promising applications, such as the analysis of *Y. pestis* gene expression during disease progression, or the study of the impact of gene mutations on the course of the infectious process.

Materials and Methods

Bacterial strains and growth conditions

The fully virulent *Y. pestis* strain CO92 [34] and its derivatives were grown in Luria Bertani (LB) broth for 24 h, or on LB agar plates supplemented with 0.2% hemin (LBH) for 48 h at 28°C. When necessary, carbenicillin (Carb; 100 µg/ml) was added to the media. All *in vitro* experiments with *Y. pestis* were performed in a Biosafety Level 3 laboratory. *E. coli* strain CFT073(pGEN-*luxCDABE*) [12] was grown for 24 h at 37°C in LB-Carb broth.

Construction of a bioluminescent *Y. pestis*

Plasmid pGEN-*luxCDABE* [12], which carries the *luxCDABE* operon and confers resistance to carbenicillin, was extracted from strain CFT073(pGEN-*luxCDABE*) and introduced by electroporation [35] into *Y. pestis* CO92, yielding CO92(pLux). Presence of pGEN-*luxCDABE* in Carb^R colonies was checked by PCR with primers 5'-CCAGGTTGAAATCTTTCCCG-3' and 5'-CTTTTGAACATAAGAATAGGC-3', which amplify a portion of the *luxC* gene. The maintenance of major and unstable virulence factors was also checked by PCR with primers amplifying a portion of Pla (5'-ATCTTACTTTCCGTGAGAAG-3'; 5'-CTTGATGTTGAGCTTCCCTA-3'), the pYV (5'-ATAACT-CATCGGGGCAAAAT-3'; 5'-GCGTTATTTATCCGAATT-TAGC-3' that target *yopM*), or the High Pathogenicity Island (HPI) (5'-ATGCTGCATATCGCCTTTCGCCCGAC-3'; 5'-GGACGTCGTGAATTTCCGACAGCGTTAGA-3' that amplify *irp2*). Template DNA was obtained by suspending one bacterial colony into 100 µl of 50 mM sodium hydroxide and 0.25% sodium dodecyl sulfate, and heating at 95°C for 5 min. Each PCR reaction was done in a volume of 50 µl containing 2 µl of template DNA, 0.3 µM of each primer, 200 µM dNTP, 2 mM MgCl₂, 1.25 U Taq Polymerase (Applied Biosystems) and 5 µl of 10× buffer. The PCR reactions comprised an initiation step of 5 min at 94°C; 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 55°C and 90 s at 72°C; and a termination step of 10 min at 72°C. Bioluminescence emission was detected and quantified with an In Vivo Imaging System (IVIS 100, Caliper Life Sciences) and a Xenius plate reader (SAFAS Monaco).

Mouse infections

Animals were housed at the Institut Pasteur animal facility, which has been accredited by the French Ministry of Agriculture to perform experiments on live mice (accreditation B 75 15-01, May 22, 2008), in compliance with the French and European regulations on care and protection of Laboratory Animals (EC Directive 86/609, French Law 2001-486, June 6, 2001). The protocol used in this study (#03.99, May 13, 2009) was approved by the Hygiene & Security, and Veterinary Committees of the Institut Pasteur, and was performed in compliance with the NIH Animal Welfare Insurance (#A5476-01 issued on 02/07/2007).

Six- to eight-week-old BALB/cByJ mice (Charles River Laboratories) were maintained under specific pathogen-free conditions in a Biosafety Level 3 animal facility at the Institut Pasteur, in compliance with the European animal welfare regulations. Subcutaneous infections were performed by injecting

100 μ l of bacterial suspensions in saline into the abdominal *linea alba*. Bacterial counts were estimated by measuring the optical density at 600 nm and confirmed by plating the suspensions on LBH or LBH-Carb agar plates. The 50% lethal doses (LD₅₀) were determined using groups of five mice infected sc with 10-fold serial dilutions of the bacterial suspensions. Animal deaths were followed for three weeks and the LD₅₀ was calculated according to the method of Reed and Muench [36].

To quantify *Y. pestis* numbers in organs of infected animals or to study pGEN-*luxCDABE* and bioluminescence maintenance after *Y. pestis* multiplication *in vivo*, mice were infected sc with 100 cfu. At various time points pi, the animals were sacrificed, their organs were removed aseptically and crushed in a Mixer Mill MM 301 (Retsch). The suspensions were diluted in PBS and various dilutions were streaked on LBH plates. Individual colonies were streaked on LBH-Carb and light emission was determined with the IVIS 100 device.

In vivo imaging

For *in vivo* tracking of *Y. pestis*, mice were infected sc with 100 cfu of CO92(pLux). They were anesthetized every day by intraperitoneal injection of 200 μ l of a solution containing 20 μ l of ketamine (Imalgene 1000) and 10 μ l of xylazine (Rompun 2%) in saline. Mice were then set in a poly(methyl methacrylate) confinement box (TEM SEGA) and introduced in an IVIS 100 system (Caliper Life Sciences). Image acquisition and analysis were performed with the Living Image 3.2 software (Caliper Life Sciences), using acquisition times of 1 s to 240 s to allow maximal acquisition while avoiding signal saturation, and a binning set on "small". To quantify the amount of light emitted by bioluminescent bacteria in a specific organ, the region corresponding to this organ (ROI or "region of interest") was defined in the software and the average radiance of the defined region was calculated. To analyze and compare the signals in a large number of animals, a predefined setting ranging from 7×10^5 p/sec/cm²/sr to 5×10^8 p/sec/cm²/sr was used and applied to all measurements.

Visualization of lymphatic drainage

To visualize the lymph nodes and the draining lymphatic vessels, a 5% (w/v) solution of Evans blue dye was injected into the mouse *linea alba*. After 1 to 30 min, the mice were sacrificed and the internal side of the skin extending from the lower to the upper limbs was exposed to visualize the axillary and inguinal lymph nodes.

Statistical analyses

Statistical analyses and the plotting of graphs were performed using the software GraphPad Prism version 5.0d (San Diego, USA). For correlations, data of cfu counts and light radiances were processed as follows: after logarithmic transformation of both sets of values, normality of the sampling was controlled by a d'Agostino and Pearson omnibus normality test, and when the sample distribution was normal, a Pearson two-tailed correlation test was

performed. When the correlation test was positive, a linear regression was performed using the least square fit method. Differences between bacterial concentrations or between ratios of photons/cfu in *in vitro* conditions were analyzed with the Mann Whitney test. Differences between survival curves were tested with a log-rank (Mantel-Cox) test.

Supporting Information

Figure S1 Comparison of the growth kinetics of CO92 and CO92(pLux). CO92 (white circles) and CO92(pLux) (black squares) were grown for 48 h at 28°C in LB broth and aliquots were taken at various time points for bacterial counts. Shown are mean values and standard error of the means (vertical bars) of triplicate measures.

(PDF)

Figure S2 Correlation between bioluminescence emission and cfu counts. Bacteria were grown at 28°C on agar plates (A) before being suspended in LB and serially diluted, or in broth (B) and aliquots were taken at different time points to determine bacterial counts and light emission. The line represents the least square fit linear regression. The related goodness of fit coefficient (R^2) is indicated on each graph.

(PDF)

Figure S3 Temperature-dependent expression of *luxCDABE* in *Y. pestis*. Bacteria were grown at 28°C (red circles) or 37°C (blue triangles), in LB broth or on LBH agar plates. Each spot represents the number of photons (count/s) emitted per cfu. The horizontal bar represents the mean light emission per cfu and the vertical bar the standard error. P values were determined with the Mann Whitney test.

(PDF)

Figure S4 Survival curves of mice infected with *Y. pestis* CO92 or CO92(pLux). Groups of five mice were infected subcutaneously with approximately 10 cfu of *Y. pestis* CO92 (red line) or bioluminescent *Y. pestis* CO92(pLux) (blue line) and their mortality was followed daily.

(PDF)

Acknowledgments

We thank Marie-Anne Nicola for her advice in the use and management of the bioluminescence system, and David Govindin and Gilles Massoneau (Institut Pasteur) for their help in the improvement of the confinement boxes used for *in vivo* imaging. We also thank Harry Mobley (University of Michigan) who constructed the plasmid pGEN-*luxCDABE* used in this study, and Rebecca Flynn for her critical reading of this manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: TN EC. Performed the experiments: TN SF CD. Analyzed the data: TN AD EC. Wrote the paper: TN EC.

References

1. Yersin A (1894) La peste bubonique à Hong-Kong. Ann Inst Pasteur. pp 662–667.
2. Schrag SJ, Wiener P (1995) Emerging infectious diseases: what are the relative roles of ecology and evolution? Trends Evol Ecol 10: 319–324.
3. Simond P (1898) La propagation de la peste. Ann Institut Pasteur 12: 625–687.
4. Pollitzer R (1954) Plague World Health Organization Monograph Series.
5. Chen TH, Meyer KF (1965) Susceptibility of the langur monkey (*Semnopithecus entellus*) to experimental plague: pathology and immunity. J Infect Dis 115: 456–464.
6. Guinet F, Ave P, Jones L, Huerre M, Carniel E (2008) Defective innate cell response and lymph node infiltration specify *Yersinia pestis* infection. PLoS One 3: e1688.
7. Bizanov G, Dobrokhotova ND (2007) Experimental infection of ground squirrels (*Citellus pygmaeus Pallas*) with *Yersinia pestis* during hibernation. J Infect 34: 198–203.
8. Hoessly GF, Walker DL, Larson A, Meyer KF (1955) Experimental Bubonic Plague in Monkeys. I. Study of the Development of the Disease and the Peripheral Circulatory Failure. Acta Trop 12: 240–251.

9. Sebbane F, Gardner D, Long D, Gowen BB, Hinnebusch BJ (2005) Kinetics of disease progression and host response in a rat model of bubonic plague. *Am J Pathol* 166: 1427–1439.
10. Brubaker B (2006) *Yersinia pestis* and Bubonic Plague. A Handbook on the Biology of Bacteria Proteobacteria: Gamma Subclass Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, eds. Springer. pp 399–442.
11. Francis KP, Yu J, Bellinger-Kawahara C, Joh D, Hawkinson MJ, et al. (2001) Visualizing Pneumococcal Infections in the Lungs of Live Mice Using Bioluminescent *Streptococcus pneumoniae* Transformed with a Novel Gram-Positive *lux* Transposon. *Infect Immun* 69: 3350–3358.
12. Lane MC, Alteri CJ, Smith SN, Mobley HLT (2007) Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. *Proc Natl Acad Sci* 104: 16669–16674.
13. Brock M, Jouvion G, Droin-Bergere S, Dussurget O, Nicola MA, et al. (2008) Bioluminescent *Aspergillus fumigatus*, a New Tool for Drug Efficiency Testing and In Vivo Monitoring of Invasive Aspergillosis. *Appl Environ Microbiol* 74: 7023–7035.
14. Cook SH, Griffin DE (2003) Luciferase Imaging of a Neurotropic Viral Infection in Intact Animals. *J Virol* 77: 5333–5338.
15. Glomski IJ, Piris-Gimenez A, Huerre M, Mock M, Goossens PL (2007) Primary Involvement of Pharynx and Peyer's Patch in Inhalational and Intestinal Anthrax. *PLoS Pathog* 3: e76.
16. Bina XR, Miller MA, Bina JE (2010) Construction of a bioluminescence reporter plasmid for *Francisella tularensis*. *Plasmid* 64: 156–161.
17. Isaksson EL, Aili M, Fahlgren A, Carlsson SE, Rosqvist R, et al. (2009) The Membrane Localization Domain Is Required for Intracellular Localization and Autoregulation of YopE in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* 77: 4740–4749.
18. Uliczka F, Pisano F, Kochut A, Opitz W, Herbst K, et al. (2011) Monitoring of gene expression in bacteria during infections using an adaptable set of bioluminescent, fluorescent and colorigenic fusion vectors. *PLoS One* 6: e20425.
19. Tréck J, Berschl K, Trütsch K (2010) In vivo analysis of *Yersinia enterocolitica* infection using *luxCDABE*. *FEMS Microbiol Lett* 307: 201–206.
20. Russell W, Burch R (1959) *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen & Co Ltd. 238 p.
21. Du YD, Galyov E, Forsberg A (1995) Genetic analysis of virulence determinants unique to *Yersinia pestis*. In: Ravagnan G, Chiesa C, eds. *Yersiniosis: Present and Future*. Basel: Karger. pp 321–324.
22. Bland DM, Eisele NA, Keleher LL, Anderson PE, Anderson DM (2011) Novel Genetic Tools for Diaminopimelic Acid Selection in Virulence Studies of *Yersinia pestis*. *PLoS ONE* 6: e17352.
23. Andreu N, Zelmer A, Fletcher T, Elkington PT, Ward TH, et al. (2010) Optimisation of bioluminescent reporters for use with mycobacteria. *PLoS One* 5: e10777.
24. Rocchetta HL, Boylan CJ, Foley JW, Iversen PW, LeTournieu DL, et al. (2001) Validation of a noninvasive, real-time imaging technology using bioluminescent *Escherichia coli* in the neutropenic mouse thigh model of infection. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 129–137.
25. Henken S, Bohling J, Ogunniyi AD, Paton JC, Salisbury VC, et al. (2010) Evaluation of biophotonic imaging to estimate bacterial burden in mice infected with highly virulent compared to less virulent *Streptococcus pneumoniae* serotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 3155–3160.
26. Xiong YQ, Willard J, Kadurugamuwa JL, Yu J, Francis KP, et al. (2005) Real-Time In Vivo Bioluminescent Imaging for Evaluating the Efficacy of Antibiotics in a Rat *Staphylococcus aureus* Endocarditis Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 380–387.
27. Flexner S (1901) The pathology of bubonic plague. *Am J Med Sci* 122: 396–416.
28. Harrell MI, Iritani BM, Ruddell A (2008) Lymph node mapping in the mouse. *J Immunol Methods* 332: 170–174.
29. Jawetz E, Meyer KF (1944) The behaviour of virulent and avirulent *P. pestis* in normal and immune experimental animals. *J Infect Dis* 74: 1–13.
30. Frank KM, Schneewind O, Shieh W-J (2011) Investigation of a Researcher's Death Due to Septicemic Plague. *N Engl J Med* 364: 2563–2564.
31. Guarner J, Shieh WJ, Chu M, Perlman DC, Kool J, et al. (2005) Persistent *Yersinia pestis* antigens in ischemic tissues of a patient with septicemic plague. *Human Pathol* 36: 850–853.
32. Demeure CE, Blanchet C, Fitting C, Fayolle C, Khun H, et al. (2012) Early Systemic Bacterial Dissemination and a Rapid Innate Immune Response Characterize Genetic Resistance to Plague of SEG Mice. *J Infect Dis* 205: 134–143.
33. Flashner Y, Fisher M, Tidhar A, Mechaly A, Gur D, et al. (2010) The search for early markers of plague: evidence for accumulation of soluble *Yersinia pestis* LcrV in bubonic and pneumonic mouse models of disease. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59: 197–206.
34. Parkhill J, Wren BW, Thomson NR, Titball RW, Holden MT, et al. (2001) Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* 413: 523–527.
35. Conchas RF, Carniel E (1990) A highly efficient electroporation system for transformation of *Yersinia*. *Gene* 87: 133–137.
36. Reed LJ, Muench H (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg* 27: 493–497.

Article publié en-dehors de la thèse

Ferrières L, Hémerly G, Nham T, Guérout AM, Mazel D, Beloin C, Ghigo JM. Silent mischief: bacteriophage Mu insertions contaminate products of Escherichia coli random mutagenesis performed using suicidal transposon delivery plasmids mobilized by broad-host-range RP4 conjugative machinery. J Bacteriol. 2010 Dec;192(24):6418-27. Epub 2010 Oct 8. PubMed PMID: 20935093; PubMed Central PMCID: PMC3008518.

Silent Mischief: Bacteriophage Mu Insertions Contaminate Products of *Escherichia coli* Random Mutagenesis Performed Using Suicidal Transposon Delivery Plasmids Mobilized by Broad-Host-Range RP4 Conjugative Machinery[∇]

Lionel Ferrières,^{1,2} Gaëlle Hémerly,^{1,2} Toan Nham,^{1,2}† Anne-Marie Guérout,^{3,4} Didier Mazel,^{3,4} Christophe Beloin,^{1,2} and Jean-Marc Ghigo^{1,2*}

Institut Pasteur, Unité de Génétique des Biofilms, 25-28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris cedex 15, France¹; CNRS, URA 2172, 75015 Paris, France²; Institut Pasteur, Unité Plasticité du Génome Bactérien, 25-28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris cedex 15, France³; and CNRS, URA2171, 75015 Paris, France⁴

Received 1 June 2010/Accepted 3 October 2010

Random transposon mutagenesis is the strategy of choice for associating a phenotype with its unknown genetic determinants. It is generally performed by mobilization of a conditionally replicating vector delivering transposons to recipient cells using broad-host-range RP4 conjugative machinery carried by the donor strain. In the present study, we demonstrate that bacteriophage Mu, which was deliberately introduced during the original construction of the widely used donor strains SM10 λ pir and S17-1 λ pir, is silently transferred to *Escherichia coli* recipient cells at high frequency, both by *hfr* and by release of Mu particles by the donor strain. Our findings suggest that bacteriophage Mu could have contaminated many random-mutagenesis experiments performed on Mu-sensitive species with these popular donor strains, leading to potential misinterpretation of the transposon mutant phenotype and therefore perturbing analysis of mutant screens. To circumvent this problem, we precisely mapped Mu insertions in SM10 λ pir and S17-1 λ pir and constructed a new Mu-free donor strain, MFDpir, harboring stable *hfr*-deficient RP4 conjugative functions and sustaining replication of Π -dependent suicide vectors. This strain can therefore be used with most of the available transposon-delivering plasmids and should enable more efficient and easy-to-analyze mutant hunts in *E. coli* and other Mu-sensitive RP4 host bacteria.

Functional study of the genes of a given organism is an essential step toward biological characterization. This is generally performed by gene alteration using procedures designed to either modify or delete specific target genes or to introduce random mutations in the genome of the studied bacterium (8, 20, 24, 30). Many of these strategies rely on the integration of an exogenous fragment of DNA, such as an antibiotic marker or a transposon, taking advantage of processes involved in natural horizontal gene transfer, such as transformation, phage transduction, or bacterial conjugation (37).

One of the most popular methodologies for performing unbiased genetic screens is the analysis of the phenotypic consequences of random insertion of transposon elements. While transposon mutagenesis can now be achieved using partial or total *in vitro* procedures, the method of choice usually involves efficient conjugative transfer from a donor strain to the target recipient strain of a conditionally replicative suicide vector carrying transposon delivery machinery (19–21). Once in the recipient cell, the vector cannot replicate, allowing subsequent

selection of a random transposon insertion in the bacterial genome.

Conditionally replicating plasmids of the R6K family (IncX) are very often used to deliver gene-inactivating elements in enteric bacteria (11, 28, 38). The replication of these plasmids requires the *pir*-encoded Π protein, which is usually provided in *trans* in the donor strain. In the absence of Π in the recipient strain, these plasmids cannot replicate. Therefore, these “suicide” vectors are rapidly lost but allow the integration of passenger exogenous DNA carrying selection markers through transposition or homologous recombination in the chromosomes of recipient strains. Although the delivery of these conditional replicative plasmids can be achieved through transformation, this is a highly inefficient procedure, even in transformable bacteria. Common derivatives of these plasmids that carry the *oriT* transfer origin of the broad host-range conjugative plasmid RP4 (IncP α) were therefore constructed (45). Such plasmids can be mobilized and transferred between Gram-negative and even some Gram-positive bacteria, provided that the RP4 delivery machinery is expressed in *trans* from a plasmid or from chromosomal inserted genes (17, 40).

In the early 1980s, Pühler and collaborators designed two specialized *Escherichia coli* donor strains, SM-10 and S17-1, which enable mobilization of *oriT*-containing plasmids to a broad range of recipient strains through RP4-dependent conjugative transfer (Fig. 1) (40). Later, λ pir prophage was introduced into both strains to enable replication of Π -dependent suicide vectors (14, 28). These two strains carry, at different

* Corresponding author. Mailing address: Institut Pasteur, Unité de Génétique des Biofilms, 25-28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. Phone: (33) 01 40 61 34 18. Fax: (33) 01 45 68 88 36. E-mail: jmghigo@pasteur.fr.

† Present address: Institut Pasteur, Unité de Recherche des Yersinia, 25-28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

[∇] Published ahead of print on 8 October 2010.

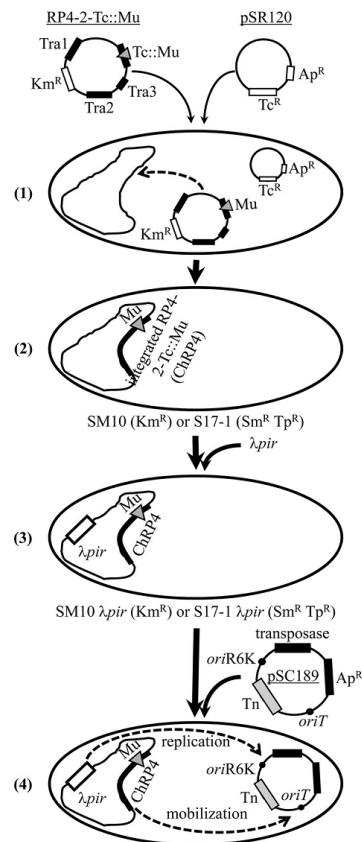


FIG. 1. History of construction of S17-1 λ pir(pSC189) and SM10 λ pir(pSC189) donor strains for transposon-based random mutagenesis using the R6K suicide plasmid pSC189. The RP4-2-Tc::Mu plasmid carries loci coding for RP4 conjugation machinery (Tra1, Tra2, and Tra3), a tetracycline resistance marker interrupted by Mu (Tc::Mu), and genetic elements coding for kanamycin resistance (Km^r). RP4-2-Tc::Mu integration into the chromosome of *E. coli* was isolated after cotransformation with the incompatible mini-RP4 plasmid pSR120 and selection for clones displaying both kanamycin and tetracycline resistance (step 1). The clones obtained were cured from pSR120, leading to SM10 (parental strain, S49-20 Km^r) or S17-1 (parental strain, *E. coli* 294 Sm^r Tp^r), following inactivation of the RP4-associated kanamycin resistance gene by Tn7 insertion, which contain the integrated RP4-2-Tc::Mu plasmid (ChrP4), as described previously (step 2) (40). For simplicity, only a single depiction is presented for strains SM10 and S17-1. Finally, the Π -encoding gene *pir* was introduced at the λ site (step 3), and the strains were transformed with the suicide vector pSC189, which carries a *mariner*-based transposon (Tn) and its C9 transposase (transposase) and harbors the RP4-dependent origin of conjugation, *oriT*, for mobilization and the Π -dependent origin of replication, *oriR6K* (step 4) (11, 14, 28).

chromosomal locations, an RP4 derivative, RP4-2-Tc::Mu, in which the RP4 tetracycline resistance gene is interrupted by a fully functional Mu temperate prophage that could potentially undergo lytic development and liberate phage particles. These

genetic procedures led to the creation of SM10 λ pir, which is kanamycin resistant, and S17-1 λ pir, which is kanamycin sensitive and streptomycin/trimethoprim resistant (Fig. 1). These strains have since been widely used for genetic analyses performed by random mutagenesis or allelic exchange in *E. coli* (4, 23, 29, 38) and many other bacteria: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (25, 27), *Sinorhizobium meliloti* (33), *Pseudomonas fluorescens* (52), *Erwinia carotovora* (32), *Vibrio cholerae* (28), and many more.

Although generally disregarded, it has been reported that the *oriT* located within the RP4-2-Tc::Mu region can promote *hfr* conjugative transfer of chromosomal genes, including transposable elements native to the *E. coli* donor strain (3, 40, 41). Whereas mutations of the *oriT nic* region of RP4-2-Tc::Mu prevent the mobilization of the integrated RP4 (3), there were also reports mentioning that phenotypes displayed by transconjugants obtained using S17-1 λ pir or SM10 λ pir were either unstable or not linked to the insertion event, suggesting that secondary mutational events could also have occurred (references 3, 26, and 38 and our own observations).

Here, we show that bacteriophage Mu originating from the RP4-2-Tc::Mu derivative present in S17-1 λ pir and SM10 λ pir chromosomes can transfer to *E. coli* recipient strains at very high frequency concomitantly with bona fide transposon mutagenesis. This silent Mu insertion in Mu-sensitive strains, therefore, leads to a double-mutagenesis procedure and could be at the origin of some inconsistencies reported in genetic screens performed via RP4-mediated transposon mutagenesis using S17-1 λ pir or SM10 λ pir strains. To circumvent this problem, we constructed a new Mu-free donor strain, MFDpir (for Mu-free donor), that will simplify the analysis of future mutant hunts performed in *E. coli* and other Mu-sensitive RP4 host bacteria.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions. The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. All experiments were carried out in lysogeny broth (LB) medium (MP Biomedicals, LLC; 10 g/liter tryptone, 5 g/liter yeast extract, 10 g/liter NaCl) at 37°C (5). When required, antibiotics were added to the medium at the following concentrations: ampicillin (Ap) (100 μ g/ml), apramycin (Apra) (30 μ g/ml), chloramphenicol (Cm) (25 μ g/ml), erythromycin (Erm) (200 μ g/ml), kanamycin (Km) (50 μ g/ml), streptomycin (Sm) (100 μ g/ml), tetracycline (Tc) (7.5 μ g/ml), and zeocin (Zeo) (50 μ g/ml). Detection of the Lac⁺ phenotype was done on plates containing 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal) (40 μ g/ml) and isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (0.1 mM). *dapA::pir116-erm* mutants were grown in medium supplemented with 0.3 mM diaminopimelic acid (DAP). Most gene deletions and replacements with an antibiotic resistance cassette were performed using the λ Red linear DNA gene replacement system and the 3-step PCR procedure described previously (16) and on our website (<http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Ggb/3SPCRprotocol.html>). Briefly, the 500-bp left and 500-bp right regions flanking the gene to be deleted were amplified using gene.500-5/gene.cassette.L-3 and gene.cassette.L-5/gene.500-3 primer pairs, respectively (Table 2) and fused to the antibiotic resistance cassette by PCR. Alternatively, some constructions were made using linear DNA obtained in a single-step procedure; in this case, the PCR products of the DNA fragment to be inserted were flanked by 40-bp sequences homologous to the target region and amplified using primers gene.cassette.TL-5 and gene.cassette.TL-3 (Table 2). The PCR products were finally introduced by electroporation into cells expressing λ Red recombinase from plasmid pKOBEG or pKOBEGA, and transformants were recovered on selective LB agar plates. Mutations were confirmed by PCR amplification of the targeted genomic region using primers gene.ext-5 and gene.ext-3 (16). The sequences of all the primers used are given in Table 2. Mutations were moved between strains by P1vir transduction.

TABLE 1. *E. coli* strains and plasmids used in this study

Name	Genotype or main characteristics	Antibiotic resistance	Reference
Strains			
JW2669	BW25113 $\Delta recA::kan$	Km ^r	2
MFDpir	MG1655 RP4-2-Tc::[$\Delta Mu1::aac(3)IV-\Delta aphA-\Delta nic35-\Delta Mu2::zoo$] $\Delta dapA::(erm-pir) \Delta recA$	Apra ^r Zeo ^r Erm ^r	This study
MG1655	K-12 wild-type strain		6
MG1655-s	Spontaneous streptomycin-resistant mutant of MG1655		Laboratory collection
MG1655 Δlac	MG1655 $\Delta lacIZ::cat Lac^-$	Cm ^r	This study
MG1655-s Δlac	MG1655-s $\Delta lacIZ::frr Lac^-$	Sm ^r	This study
S17-1 λpir	(F ⁻) RP4-2-Tc::Mu <i>aphA</i> ::Tn7 <i>recA</i> λ <i>pir</i> lysogen	Sm ^r Tp ^r	40
SM10 λpir	(F ⁻) RP4-2-Tc::Mu <i>recA</i> λpir lysogen	Km ^r	40
ω 7249	(F ⁻) RP4-2-Tc::Mu $\Delta nic35 \Delta dapA::(erm-pir)$	Km ^r Erm ^r	3
Plasmids			
pKD3	Source of the <i>cat</i> ::FRT cassette	Ap ^r Cm ^r	12
pKOBEG	<i>oriR101ts araC</i> arabinose-inducible λ red $\gamma\beta\alpha$ operon	Cm ^r	9
pKOBEGA	pKOBEG derivative	Ap ^r	9
pSC189	<i>oriT</i> II-dependent <i>ori</i> R6K <i>mariner</i> -based transposon TnSC189	Km ^r Ap ^r	11
pSC189-Cm	Like pSC189 but carries TnSC189 $\Delta kan::cat$	Cm ^r Ap ^r	F. Leroux
pCP20	Rep(Ts) Flp ⁺	Cm ^r Ap ^r	10

Bacterial mating and pSC189 mutagenesis. The recipient strain and the donor strain with or without the pSC189 plasmid were grown to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.6, at 37°C with aeration, washed twice, and resuspended in fresh LB medium to a similar OD₆₀₀. Six hundred microliters of the donor strain and 200 μ l of the recipient strain were mixed. The bacteria were pelleted by centrifugation, resuspended in 30 μ l of medium, and spotted on 0.45- μ m nitrocellulose filters, which were placed on LB agar plates. After 24 h at 37°C, bacterial cells were recovered from the filter in 1.5 ml LB. Serial dilutions of the suspension were made and plated on selective media. When appropriate, 10 mM sodium citrate was added to the agar plates during mating and during transconjugant selection. Finally, several transconjugants were selected and screened for the Lac⁺ phenotype (blue colonies on X-Gal), *lacIZ* insertion (by PCR, using primers LACZ.ACTIV.A1.500-5 and LacZatg+100-3), or Mu insertion (by PCR, using primers Mu1470bp-5 and Mu1470bp-3). The percentage of transconjugants containing pSC189, which could have been stabilized by transfer of λpir to the recipient strain, was determined by plating on ampicillin-containing plates and stood below 2% in all matings performed.

Localization of bacteriophage Mu insertions in the chromosome. The site of the Mu insertion was determined by arbitrary primed PCR (31). One microliter of a suspension of the mutant to be analyzed was added to 50 μ l of a PCR mixture (1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.2 mM each deoxynucleoside triphosphate [dNTP], 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.05 U/ μ l LA *Taq* [TaKaRa]) containing 0.6 μ M randomized primers ARB1 and ARB6 and 1.2 μ M MuL200-3, which hybridized the left-end region of Mu. The amplification conditions were as follows: 5 min at 94°C; six cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 30°C, and 3 min at 72°C; 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 45°C, and 3 min at 72°C; and 5 min at 72°C. A second round of PCR was subsequently performed after dilution of 1 μ l from the first PCR mixture into 50 μ l of a fresh PCR mixture. This second amplification (40 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 60°C, and 3 min at 72°C; 5 min at 72°C) was carried out with 1.2 μ M ARB2 and 1.2 μ M MuL100-3 as primers. The PCR products were purified by migration on agarose gels and sequenced using MuL100-3. The sequence flanking the right-end region of Mu was determined similarly using MuR200-5 and MuR100-5, respectively.

Detection of Mu in S17-1 λpir and SM10 λpir culture supernatants. S17-1 λpir and SM10 λpir cells were grown at 37°C in LB until late exponential phase (OD₆₀₀ = 1). The supernatant was harvested and filter sterilized (0.22 μ m). Twenty microliters was spotted onto a lawn of Mu-sensitive bacteria inoculated to an OD₆₀₀ of 0.001 in fresh LB agar (0.75% [wt/vol]) supplemented with 10 mM MgSO₄ and 20 mM CaCl₂ (42). The plates were incubated at 37°C overnight, and the emergence of plaques was examined the next day. In parallel, cultures of the sensitive strain in liquid LB containing 10 mM MgSO₄ and 20 mM CaCl₂ were inoculated to an OD₆₀₀ of 0.05 and grown in the presence of 100 μ l of serial dilutions of S17-1 λpir or SM10 λpir supernatants. The presence of Mu was assessed by premature lysis of the culture. Both kinds of experiments were carried out in LB supplemented with 50 mM sodium citrate as a negative control.

Construction of the new Mu-free donor strain MFDpir. The two copies, Mu1 and Mu2, flanking RP4 in ω 7249 were deleted and replaced by cassettes encoding resistance to apramycin or zeocin, respectively. The cassettes were obtained by PCR amplification using the Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Finnzymes). The primers MuL-apra-L3 and tetR.Mu.apra.L-5 were designed so that the apramycin cassette removed the Mu1 copy, with the exception of 640 bp at the 5' end and the *tetA-tetR* remaining downstream region; as for the zeocin resistance cassette, the primers tetA.zeo.L-3 and glvB.zeo.L-5 were designed to remove the entire Mu2 copy and the *tetA*^r remaining upstream region (Table 2). The new construct was then transduced into MG1655, and the absence of any Mu was confirmed by PCR using Mu1470bp.500-5 and Mu1470bp.500-3. In order to remove the RP4-associated kanamycin resistance marker, most of the *aphA* gene of RP4 was replaced by the *cat*-Flp recombination target (FRT) cassette carried by pKD3 (12). This cassette was amplified by PCR using the primers *aphA.Cmfrt.TL-5* and *aphA.Cmfrt.TL-3*. The chloramphenicol resistance marker was subsequently excised using the Flp recombinase-encoding plasmid pCP20, as previously described (10). In order to enable replication of R6K plasmids in this strain, the *dapA::pir116-erm* mutation, which codes for the II protein, was introduced by P1vir transduction, and transductants were checked by PCR using primers *dapA.100-5* and *dapA.100-3* (15). Finally, possibilities for unwanted internal homologous recombination were reduced by introducing the $\Delta recA::kan$ mutation. To do so, the $\Delta recA::kan$ from the Keio collection was amplified by PCR using primers *recA.500-5* and *recA.500-3* and integrated into the chromosome by λ Red recombination (2). The associated kanamycin resistance marker was excised using pCP20 (2, 10). The inability of MFDpir to produce Mu particles in culture supernatant was confirmed as described above.

RESULTS

Evidence for bacteriophage Mu transfer between donor and recipient strains during transposon mutagenesis using *E. coli* S17-1 λpir or SM10 λpir . Bacterial genetic screens often involve RP4-mediated mobilization of *pir*-dependent suicide vectors that deliver transposons into the genomes of *pir*-less recipient strains, in which they cannot replicate. During the course of such a genetic analysis, we used the well-known donor strain *E. coli* S17-1 λpir (pSC189) to deliver a TnSC189 kanamycin-resistant *mariner*-based transposon into *E. coli* MG1655 Δlac (11). Intriguingly, we characterized a transconjugant with a transposon inserted into a region corresponding to bacteriophage Mu DNA. Considering the absence of Mu in the original recipient strain and the presence, by construction,

TABLE 2. Primers used in this study

Strain construction and analysis	Name	Sequence
<i>ΔlacZ::cat</i>	lacI.ext-5	5'-GGGCGATCTGTTGCGCGAAG-3'
	lacI.500-5	5'-CTTATCCTTTCACCGGCAATG-3'
	lacI.cat.L-3	5'-CTGCGAGTGATCTTCCGTCACAGGATTCACCACCCTGAATTGACTCT-3'
	lacZ.cat.L-5	5'-GATGAGTGCCAGGGCGGGCGTAATAATAACCGGGCAGGCCATGTC-3'
	lacZ.500-3	5'-CGACCAAATTCGAAATTACTG-3'
	lacZ.ext-3	5'-CAAATGATTATTGATGGTGAACA-3'
<i>lacI-lacZ</i> intergenic region	LACZACTIV.A1.500-5	5'-CTCACTCGCAATCAAATTCAG-3'
	lacZATG+100-3	5'-GGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAG-3'
Random-primed PCR	ARB1	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNGATAT-3'
	ARB2	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'
	ARB6	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNACGCC-3'
Localization of Mu	MuR200-5	5'-AATTTAATCAGTATCGCTAC-3'
	MuR100-5	5'-ATGTAATGAATAAAAAGCA-3'
	MuL200-3	5'-GTTTTGAACGTTTTTTGAAG-3'
	MuL100-3	5'-CTAAAATTTGCACTACAGGC-3'
Detection of Mu	Mu1470bp.500-5	5'-GTTACTTTTCAAAAATTTAAAC-3'
	Mu1470bp.500-3	5'-CGCAGATAATCTGCAATCAG-3'
<i>ΔMu1::apra</i>	MuL.apra.ext-5	5'-ACATTGGATTATTCGGGATC-3'
	Mu.apra.500-5	5'-CGGGATCTGATGGGATTAGATTTG-3'
	MuL.apra.L-3	5'-CAAGGGCTCCAAGGATCGGCGCTTGATAAAACAAATTAACCAAC-3'
	tetR.MuR.apra.L-5	5'-CGCCAGTCGATTGGCTGAGCTCATGATCAGGACCGCTGCCGGAG-3'
	tetR.apra.500-3	5'-CGGCGTTTCTGGCGCTTTG-3'
	tetR.apra.ext-3	5'-CCACATCATCTGTGGGAAACTC-3'
<i>ΔMu2::zeo</i>	tetA.zeo.ext-5	5'-ATATTTGCTATTCTGGAGC-3'
	tetA.zeo.500-5	5'-GGTGTGACACCAACCGCAG-3'
	tetA.zeo.L-3	5'-GTCAACACGTGCTCGGATCCAGAATCGTGGAACGATAGGCCATG-3'
	glvB.zeo.L-5	5'-TTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGAACAGCTCGATAGCTTAATTAATTC-3'
		glvB.500-3
	glvB.ext-3	5'-GCGGGATATCGCCGACCACC-3'
<i>ΔaphA::cat-FRT</i>	aphA.Cmfrt.ext-5	5'-ACTACGAAATCGCCTACAGC-3'
	aphA.Cmfrt.TL-5	5'-TGAAATGGTGAGATTGCGTTGGCTGGCGGGGCACATTTCTTAATGTGTA GGCTGGAGCTGCTTC-3'
	aphA.Cmfrt.TL-3	5'-CCCCCCCAACGTCGATGCAGCCGACTACCTTACCTTCGATTAGTTCTCAT TCCGAAGTTC-3'
	aphA.Cmfrt.ext-3	5'-GCATGAAAATGGCAAATAAC-3'
<i>ΔrecA::kan-FRT</i>	recA.ext-5	5'-GTGCTATCTTGTCCGGCATA-3'
	recA.500-5	5'-GTTAAGTGAACAGGTTGGGC-3'
	recA.500-3	5'-CAGAAAACGCTGGATCTTAAC-3'
	recA.ext-3	5'-CTTCATCAGATAGCCACGA-3'
<i>ΔdapA::pir116-erm</i>	dapA.100-5	5'-TGAGTGTCTTAAGGAAAG-3'
	dapA.100-3	5'-CAGGCAGCGAGTAATAAAACAAG-3'

of an integrated Mu derivative in *E. coli* S17-1 λ pir (RP4-2-Tc::Mu) (see the introduction) (Fig. 1), we investigated the potential silent transfer of Mu from *E. coli* S17-1 λ pir into recipient cells. We screened more than 100 transconjugants by PCR using primers specific for Mu transposase gene *A*, and we indeed found that, in addition to TnSC189 transposon insertion, 63% \pm 13% of them also carried bacteriophage Mu DNA into their chromosomes (Table 3). Moreover, a high frequency of Mu (61% \pm 17%) was also observed in recipient cells when conjugation was performed using a plasmid-free S17-1 λ pir, suggesting that the transfer of Mu is independent of the bona fide transposon delivery (Table 3). The use of the

alternative strain SM10 λ pir also led to frequent transfer of Mu into *E. coli* recipients, thereby demonstrating that the popular donor strains *E. coli* S17-1 λ pir and SM10 λ pir are sources of very significant contamination by bacteriophage Mu (Table 3).

Release of Mu phage particles in *E. coli* S17-1 λ pir and SM10 λ pir culture supernatants. The presence of an RP4-2-Tc::Mu insertion into the genome of *E. coli* S17-1 λ pir or SM10 λ pir qualifies these two strains as Mu lysogens that should spontaneously release Mu at a frequency of 10⁻⁴ bacteria (47). In order to check for the presence of free Mu phage particles in *E. coli* S17-1 λ pir and SM10 λ pir culture supernatants, we spotted a drop of filter-sterilized supernatant onto a

TABLE 3. Frequencies of Mu and Lac⁺ transfers during conjugation with SM10 λ pir and S17-1 λ pir donor strain derivatives

Donor [relevant characteristics] (plasmid) ^a	Recipient	Transconjugant frequency ^b	% Mu transfer	% Lac ⁺ ^c
S17-1 λ pir [ChRP4 <i>pir</i> ⁺] (pSC189)	MG1655 Δ lac	$1.7 \times 10^{-2} \pm 5.5 \times 10^{-3}$	63 \pm 13	0.014 \pm 0.009
S17-1 λ pir [ChRP4 <i>pir</i> ⁺] with 10 mM sodium citrate	MG1655 Δ lac with 10 mM sodium citrate	$3.4 \times 10^{-3} \pm 1.8 \times 10^{-3}$	35 \pm 34	ND ^d
S17-1 λ pir [ChRP4 <i>pir</i> ⁺]	MG1655 Δ lac	ND	61 \pm 17 ^e	0.55 \pm 0.37 ^e
SM10 λ pir [ChRP4 <i>pir</i> ⁺] (pSC189-Cm)	MG1655-s Δ lac	$6.3 \times 10^{-2} \pm 5.4 \times 10^{-2}$	89 \pm 10	<0.001
ω 7249 [ChRP4 Δ nic <i>pir</i> ⁺] (pSC189-Cm)	MG1655-s Δ lac	$1.2 \times 10^{-3} \pm 3.2 \times 10^{-4}$	93 \pm 3	<0.001
MFD <i>pir</i> [ChRP4 Δ nic Δ Mu <i>pir</i> ⁺] (pSC189-Cm)	MG1655-s Δ lac	$2.0 \times 10^{-3} \pm 1.0 \times 10^{-3}$	<0.72	<0.001

^a ChRP4, chromosomal integration of RP4-2-Tc::Mu.

^b Expressed as the mean number \pm standard deviation of transconjugants per recipient cell.

^c Expressed as the percentage \pm standard deviation of events in the transconjugant population. The percentage of Mu transfer was determined by PCR on 46 colonies per mating. The percentage of Lac⁺ colonies was determined by plating on X-Gal-containing agar plates. Three independent matings were done for each condition.

^d ND, not determined.

^e Expressed as the percentage \pm standard deviation of events in the exconjugant recipient population.

lawn of Mu-sensitive MG1655 Δ lac or Mu-resistant MG1655 Δ lac already carrying a Mu bacteriophage. Incubation at 37°C revealed confluent lysis plaques in the case of the Mu-sensitive MG1655 Δ lac strain only, confirming that the lysis was Mu dependent and that Mu particles were released by the donor strains into the medium (Fig. 2 and data not shown). Consistently, the addition of filter-sterilized S17-1 λ pir supernatant into an exponential-phase liquid culture of MG1655 Δ lac led to cell lysis, as monitored by a decrease in culture turbidity (data not shown). PCR analysis of the surviving bacteria after they were plated on LB agar plates showed that 22% of them had acquired a Mu prophage.

Mapping RP4-2-Tc::Mu insertions in *E. coli* S17-1 λ pir and SM10 λ pir. *E. coli* S17-1 λ pir and SM10 λ pir were constructed in the early 1980s, but the location and mechanism of RP4-2-Tc::Mu insertion into the *E. coli* chromosome have been poorly described (40). We therefore mapped the location of Mu insertion in *E. coli* S17-1 λ pir by random-primed PCR using primers specific for the left and right extremities of the Mu sequence, and we determined that two potentially functional copies of Mu flanked the integrated RP4 replicon in-

serted in *mhpC* at position 371203 of the *E. coli* chromosome, close to the *lacZ* gene (position 365529) (Fig. 3A). The two copies of Mu are in the same orientation, indicating that integration of RP4-2-Tc::Mu into the original *E. coli* 294 background arises from a Mu-driven replicon fusion mechanism (47). As the integration of RP4-2-Tc::Mu occurred independently in the two donor strains (see the introduction), we also determined that the two copies of Mu flanking the RP4 region in SM10 λ pir were at position 3859682 on the chromosome in the *glvB* gene (minute 83). This location is consistent with genetic evidence provided in 1983 by Simon et al., who mapped the RP4-2-Tc::Mu integration site in SM10 λ pir next to the methionine marker in the *met ilv arg* region (minute 89) (40). We also determined that an additional copy of the Mu prophage was located outside the RP4-2-Tc::Mu region in SM10 λ pir, at position 2450790 (minute 53) in the *yfcU* gene.

Evidence for *hfr* Mu transfer into recipient cells. We took advantage of the insertion of RP4-2-Tc::Mu in the vicinity of *lacZ* on the chromosome of S17-1 λ pir to evaluate the possibility of transfer of RP4-2-Tc::Mu flanking regions into MG1655 Δ lac (a Lac⁻ strain) by *hfr* transfer (35, 40, 50). As shown in Table 3, a large proportion of MG1655 Δ lac transconjugants obtained with S17-1 λ pir or S17-1 λ pir(pSC189) as donor strains and plated on X-Gal-containing agar plates displayed a Lac⁺ phenotype (blue colonies). Using primers hybridizing on the *lacIZ* region initially absent from MG1655 Δ lac, we amplified a product corresponding to the wild-type *lacIZ* region in all tested blue transconjugants, indicating that this Lac⁺ phenotype resulted from the insertion of a functional *lacIZ* region (data not shown). Moreover, the use of primers hybridizing on the left extremity of Mu showed that this functional *lacIZ* region was genetically linked to Mu (Fig. 3B). Finally, conjugations performed in MG1655-s Δ lac using a donor strain carrying a mutation in an RP4 *oriT nic* site that impairs transfer of chromosomal DNA, ω 7249(pSC189-Cm), did not produce any transconjugants with a Lac⁺ phenotype (3). These results confirmed that *hfr*-mediated cotransfer of Mu and the adjacent *lac* region is a frequent event when S17-1 λ pir is used. In contrast, transconjugants displaying a Lac⁺ phenotype were never observed when *E. coli* SM10 λ pir was used as the donor strain, which is consistent with the RP4-2-Tc::Mu insertion position in the strain (minute 83), distant from the *lacZ* gene (minute 8). Interestingly, conjuga-

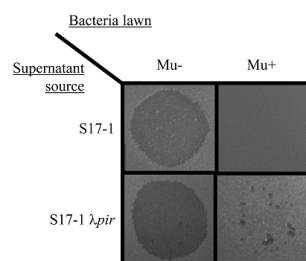


FIG. 2. Mu particles are released into the supernatant of S17-1 and S17-1 λ pir cultures. Confluent lysis was observed when a drop of filter-sterilized supernatant of S17-1 or S17-1 λ pir culture was spotted onto a lawn of growing MG1655 Δ lac cells (Mu⁻). In contrast, no (S17-1 supernatant) or very few (S17-1 λ pir supernatant) plaques appeared when the same supernatants were spotted on a lawn of a Mu lysogenic derivative (Mu⁺), confirming that the lysis is Mu dependent and that Mu particles are present in the supernatant. Mu-independent lysis observed using S17-1 λ pir supernatant probably results from release of λ phage particles into the medium.

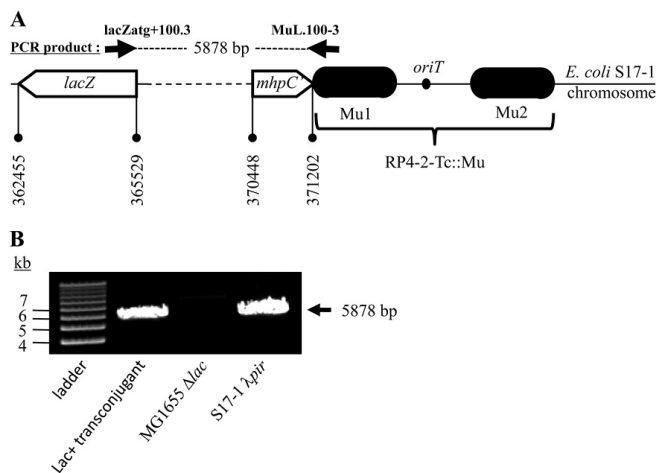


FIG. 3. Genetic map of Mu insertions in *E. coli* S17-1 λ pir. (A) Structure of the RP4-2-Tc::Mu insertion region in *E. coli* S17-1 λ pir showing the *lacZ* region and the *oriT*-carrying RP4 core plasmid flanked by the two copies of bacteriophage Mu, Mu1 and Mu2, in the same orientation. (B) PCR analysis of the junction between Mu and *lacZ* in S17-1 λ pir, MG1655 Δ lac, and a random Lac⁺ transconjugant obtained by conjugation between these strains, using primers lacZatg+100-3 and MuL.100-3. The region amplified using these primers is shown in panel A.

tion using the *hfr*-defective strain ω 7249(pSC189-Cm) still produced a high frequency of Mu-carrying transconjugants (93% \pm 3%). These data therefore suggested that *de novo* infection via Mu phage particles released by the donor strains S17-1 λ pir and SM10 λ pir may occur concomitantly with conjugative transfer of transposon delivery plasmids and not exclusively by *hfr* transfer (Fig. 4).

Site-directed removal of Mu from RP4-2-Tc::Mu-containing donor strains leads to Mu-free delivery of transposons to recipient strains. The presence of Mu prophages in donor strains results in undesirable markerless insertion events in recipient

strains that interfere with analysis of the mutagenesis outcome. To try to inhibit Mu infection of recipient bacteria, we performed mating in the presence of 10 mM sodium citrate, but we still observed high frequencies of Mu transfers in this case (around 30% of the transconjugants) (Table 3). Therefore, to circumvent the problem, we decided to construct a new Mu-free strain. We chose the SM10 derivative ω 7249 as a template to take advantage of the Δ nic35 mutation introduced into the RP4-2-Tc::Mu *oriT* locus, which prevents the transfer of chromosomal DNA by *hfr* (3). The analysis of the RP4 region of SM10 λ pir revealed that integration of RP4-2-Tc::Mu into the

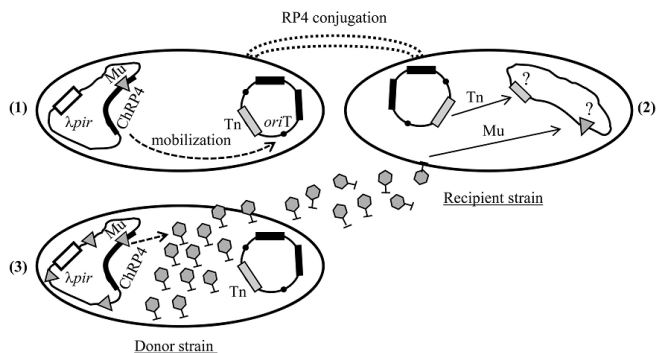


FIG. 4. *De novo* infection by Mu during conjugation results in a second mutation event in the recipient strain. (Step 1) During conjugation, pSC189 is transferred to the recipient cell using the mobilization and conjugation functions of the RP4 plasmid integrated into the chromosomes of donor strains S17-1 λ pir and SM10 λ pir (ChRP4). (Step 2) Once in the cell, the pSC189-carried transposon (gray box) integrates into the chromosome, altering the expression of a gene and its associated function. (Step 3) In parallel, the ChRP4-associated Mu prophage (triangle) is induced spontaneously into a subpopulation of donor cells. Mu particles (tailed hexagons) are then released into the environment and infect the recipient cells, leading, in some cases, to a second mutagenic event by lysogenization (2).

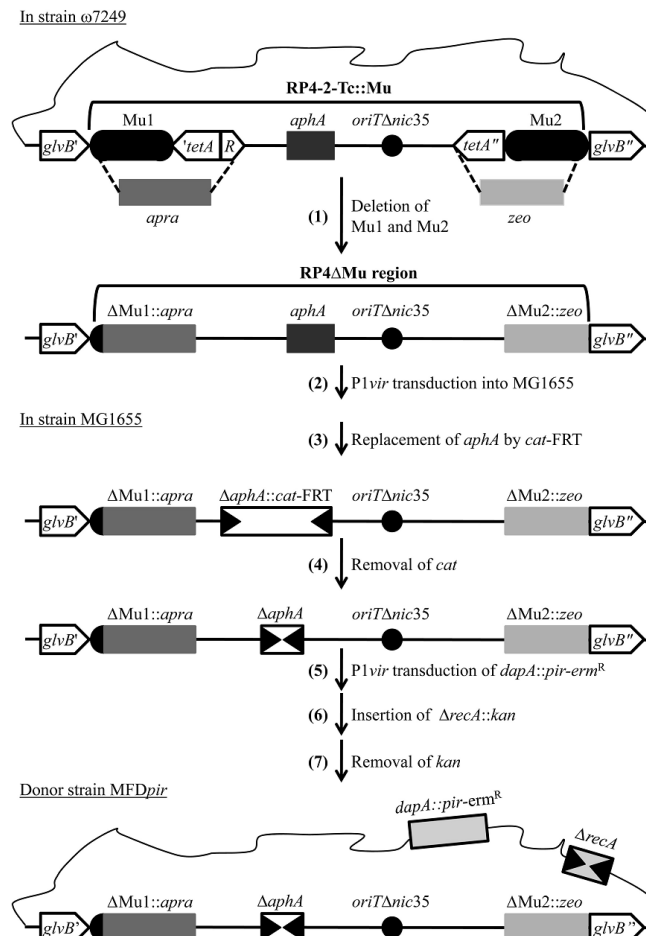


FIG. 5. Construction of a new donor strain, MFD_{pir} (see the text for details). The introduction of RP4-2-Tc::Mu into the chromosome of SM10 and that of its derivative, $\omega 7249$, occurred in *glvB*. This resulted in duplication of Mu, with each copy (Mu1 and Mu2) flanking the core RP4 and displaying the same orientation. The two Mu1 and Mu2 copies, along with the remains of the interrupted tetracycline resistance region (*tetA-R* and *tetA'*), were removed and replaced by cassettes providing resistance to apramycin (*apra*) and zeocin (*zeo*), respectively. After transduction of the Mu-free RP4 region into MG1655, the kanamycin resistance gene *aphA* was replaced by a *cat*-FRT cassette; the chloramphenicol resistance gene, *cat*, was subsequently excised using Flp recombinase. Then, the Π -encoding *dapA*::*pir-erm*^R locus was introduced into the strain. The *recA* gene was finally replaced by a *kan*-FRT cassette, and the kanamycin resistance gene, *kan*, was removed with Flp, giving the new donor strain, MFD_{pir}.

chromosome led to the duplication of Mu, with each copy (termed Mu1 and Mu2, respectively) flanking the RP4 core plasmid (Fig. 5). In order to remove Mu from this strain, we replaced Mu1 and Mu2 with genetic elements conferring apramycin and zeocin resistance, respectively (Fig. 5, step 1). This procedure also enabled us to delete the remains of the *tetA* region that had originally been interrupted by Mu in RP4-2-Tc::Mu (Fig. 5, step 1). We then transduced the RP4 Δ Mu region from $\omega 7249$ Δ Mu1::*apra* Δ Mu2::*zeo* into MG1655,

and we verified that the resulting strain did not contain any other copy of Mu (Fig. 5, step 2). To reduce the number of antibiotic resistance markers and to make the strain compatible with most available delivery vectors, the kanamycin resistance gene carried by the RP4 Δ Mu region was deleted and replaced by an excisable *cat*-FRT chloramphenicol resistance cassette that was subsequently removed using Flp recombinase (Fig. 5, steps 3 and 4) (10). We then introduced the *pir* locus *dapA*::*pir-erm* from $\omega 7249$ and a Δ *recA*::*kan*-FRT mutation to

reduce the efficiency of an internal homologous recombination (Fig. 5, steps 5 and 6). Finally, the kanamycin resistance marker was removed using Flp recombinase to produce the new Mu-free donor strain, MFD λ pir (Fig. 5, step 7).

In order to demonstrate that the RP4 region of MFD λ pir was still functional, we introduced the Π -dependent pSC189-Cm plasmid and performed conjugative mating with the recipient strain, MG1655- Δ lac. The frequency of the transconjugants carrying the TnSC189-Cm transposon (Cm^r) was similar to that observed using the parental strain, ω 7249, suggesting that the alterations we made in the RP4 region did not affect the conjugation process (Table 3). While transconjugant frequency using MFD λ pir is slightly lower than that observed with SM10 λ pir or S17-1 λ pir, it is similar to the transconjugant frequency obtained with the parental Δ nic strain, ω 7249 (3).

The transconjugants tested were all Lac⁻ and devoid of any Mu sequence, as shown by PCR, confirming the absence of Mu or lac transfer when the new Mu-free donor strain was used (Table 3).

Altogether, these results indicate that the new MFD λ pir donor strain is an efficient alternative to the use of S17-1 λ pir and SM10 λ pir donors and can be used to introduce exogenous DNA into a target strain, thus avoiding undesirable side effects resulting from the presence of Mu in currently available donors derived from the original S17-1 λ pir and SM10 λ pir strains.

DISCUSSION

In spite of—or because of—the wealth of information provided by genome sequencing and subsequent microarray gene expression analyses, the functions of a large fraction of identified bacterial genes remain unknown or have not been experimentally validated, even in well-studied model organisms such as *E. coli* (22). Most gene function studies rely on direct investigation of bacterial-gene function through creation of mutants. While different PCR-based site-directed mutagenesis strategies were developed in the past decade to facilitate such analysis, random genetic screens aimed at identifying the genetic basis of phenotypes expressed under different growth conditions or environments remain a very fruitful approach (4, 23, 26, 32, 38, 39). In many bacteria, random mutagenesis is performed via the introduction of transposons carrying antibiotic resistance markers into the chromosome of the target strain (20). The introduction of the inactivating element by conjugation of a suicide vector therefore remains the method of choice for performing cheap, broad, and relatively unbiased genomic screens.

The integration of RP4 mobilization functions in *E. coli* strains S17-1 and SM10 by Pülher and collaborators was originally designed to allow the conjugative transfer of foreign genes in non-*E. coli* Gram-negative bacteria included in the RP4 host range, such as *Rhizobiaceae* (40). Although state of the art at the time, it also allowed the incidental introduction of a functional Mu prophage into these strains and their respective λ pir derivatives, which have since been widely used for conjugation transfer of exogenous DNA, including suicide transposon-carrying vectors, to a large number of bacterial species (*E. coli* [4, 23, 29], *Klebsiella pneumoniae* [7], *Edwardsiella ictaluri* [46], *Rhizobium meliloti* [33], *Vibrio cholerae* [28], and *Erwinia carotovora* [32]). In some cases, it was reported

that transconjugant transposon mutants obtained using S17-1 and SM10 donor strains did not display the expected genetic linkage between the screened phenotype and insertion events or phenotype instability in transconjugants, but the reasons for these inconsistencies were not investigated (26, 38). In this study, we show that both *E. coli* S17-1 λ pir and SM10 λ pir donor strains transfer Mu bacteriophage at high frequencies into recipient *E. coli* cells by both *hfr* and *de novo* infection. Our data demonstrate in particular that Mu transfer to the recipient cell can be independent of the conjugative process and mainly results from infection by Mu phage particles released into the culture medium by *E. coli* S17-1 λ pir and SM10 λ pir donor strains. Since we observed Mu transfer using S17-1 λ pir, SM10 λ pir, and ω 7249 coming from many independent sources (different laboratory collections), this suggests that Mu contamination is not specific to our own strain collection but rather is an intrinsic feature of the original S17-1 λ pir and SM10 λ pir. Moreover, in addition to the conditions used to perform conjugation, we randomly selected two other mating procedures in the literature (38, 40). Despite strong differences between these procedures regarding mating duration (2 h or 24 h), media (LB or RMGC), and growth conditions (on plates or in broth), we observed a high frequency of Mu transfer to the transconjugants in each case (data not shown), suggesting that S17-1 λ pir- and SM10 λ pir-mediated Mu contamination occurs efficiently when classical conjugation protocols are used. Therefore, we speculate that many inconsistencies observed during S17-1 λ pir- and SM10 λ pir-based screens performed on Mu-sensitive bacteria could result from infectious and silent transfer of Mu from donor to recipient strains, in addition to the expected transposon insertion. This second mutagenic event is indeed likely to affect the outcome of many site-directed mutagenesis experiments and to complicate correct gene function assignment. Moreover, Mu is known to replicate by transposition, inducing subsequent DNA rearrangements and therefore contributing to genetic instability and highly variable phenotypes (47). However, despite these shortcomings and to the best of our knowledge, infection of other recipient strains by bacteriophage Mu in transposon mutagenesis experiments has not been reported. This may be due to the fact that not all potential recipient strains display equal sensitivity to Mu infection. Mu phage particles indeed infect their target cells by binding to terminal Glc α 1-2Glc α 1 or GlcNAc α 1-2Glc α 1 oligosaccharide residues in the lipopolysaccharide (LPS) outer end (36). As a consequence, Mu-resistant strains are expected to be less affected or unaffected by the double-mutagenesis event occurring during conjugation. Indeed, we did not observe any transfer of Mu from the S17-1 λ pir donor to uropathogenic *E. coli* strain CFT073, which carries the LPS core type R1 and is not recognized by Mu, when performing mating between these two strains (data not shown). The natural Mu host range is rather limited but includes many pathogenic bacteria, such as *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, *Shigella dysenteriae* (43), *Citrobacter freundii* (13), and *Erwinia chrysanthemi* (49), and clinical strains of *E. coli* that harbor the Mu-sensitive LPS core type R2 (1, 18, 36). While transfer of Mu during mutagenic conjugation may reveal some phenotypes that can only be observed with two independent mutations, it remains an important barrier to the proper genetic characterization of these organisms, some of which are

being used as model bacteria. Furthermore, while Mu insertions are restricted to Mu-sensitive bacteria, this still represents a significant number of strains, considering all natural isolates of each species now studied to explore bacterial biodiversity (34, 44, 48). Finally, Mu-resistant recipient strains are not absolutely protected from Mu contamination, since Mu can also enter the cell via *hfr*. This may seriously impair the outcome of mutagenesis performed on resistant strains, since Mu has been reported to develop in many bacteria besides *E. coli* (*Enterobacteriaceae*, *Rhizobiaceae*, *Pseudomonas*, and other Gram-negative species), where it can generate progeny and chromosomal rearrangements (51).

Whereas alternative methods have been developed based on *in vivo* triparental mating or *in vitro* insertion of transposition complexes into the target strain by electroporation (19, 21, 41), these methods are costly or require appropriate combinations of strain and plasmid markers to allow selection of proper insertion events. To circumvent the problems caused by secondary Mu insertion, we constructed a novel donor strain, MFD π ir, which combines both the improvements made recently by Babic and coworkers in preventing transfer of chromosomal DNA by an RP4-mediated *hfr* mechanism and the absence of any Mu prophage that could contaminate the recipient cells (3). This new donor strain remains as active as the previous S17-1 λ pir and SM10 λ pir strains in promoting mutagenic conjugation and leaves open the possibility of using transposons carrying many different resistance markers. In addition, its inability to grow in the absence of DAP facilitates counterselection of the donor strain after conjugation. The use of this new MFD π ir strain should enable more straightforward analyses of transconjugants produced by future transposon mutagenesis in *E. coli* and other RP4 host bacteria.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ariane Toussaint, Philippe Boulc, and Jean-Claude Lazaroni for critical reading of the manuscript. We are grateful to Frédérique Leroux for providing plasmid pSC189-Cm and to many of our colleagues (Olivera Francetic, Mick Chandler, Romé Voulhoux, and Corinne Dorel) who provided us with SM10 and S17-1 derivative strains of various origins.

L.F. is supported by grants from the European STREP "NPARI" (LSHE-CT-2006-037692C.B), G.H. by grants from Saint-Gobain Recherche, and C.B. and J.-M.G. by grants from the Network of Excellence EuroPathoGenomics (LSHB-CT-2005-512061) and the ERANET Pathogenomics (ANR-06-PATHO-004-01).

REFERENCES

- Appelmeik, B. J., Y. Q. An, T. A. Hekker, L. G. Thijs, D. M. MacLaren, and J. de Graaf. 1994. Frequencies of lipopolysaccharide core types in *Escherichia coli* strains from bacteraemic patients. *Microbiology* **140**:1119–1124.
- Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, and H. Mori. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**:2006.0008.
- Babic, A., A. M. Guerout, and D. Mazel. 2008. Construction of an improved RP4 (RK2)-based conjugative system. *Res. Microbiol.* **159**:545–549.
- Baca-DeLancey, R. R., M. M. South, X. Ding, and P. N. Rather. 1999. *Escherichia coli* genes regulated by cell-to-cell signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:4610–4614.
- Bertani, G. 2004. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J. Bacteriol.* **186**:595–600.
- Blattner, F. R., G. Plunkett III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453–1462.
- Boddicker, J. D., R. A. Anderson, J. Jagnow, and S. Clegg. 2006. Signature-tagged mutagenesis of *Klebsiella pneumoniae* to identify genes that influence biofilm formation on extracellular matrix material. *Infect. Immun.* **74**:4590–4597.
- Bremer, E., T. J. Silhavy, and G. M. Weinstock. 1985. Transposable lambda *placMu* bacteriophages for creating *lacZ* operon fusions and kanamycin resistance insertions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **162**:1092–1099.
- Chaveroche, M. K., J. M. Ghigo, and C. d'Enfert. 2000. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* **28**:E97.
- Cherepanov, P. P., and W. Wackernagel. 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**:9–14.
- Chiang, S. L., and E. J. Rubin. 2002. Construction of a *mariner*-based transposon for epitope-tagging and genomic targeting. *Gene* **296**:179–185.
- Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:6640–6645.
- de Graaff, J., P. C. Kreuning, and P. van de Putte. 1973. Host controlled restriction and modification of bacteriophage Mu and Mu-promoted chromosome mobilization in *Citrobacter freundii*. *Mol. Gen. Genet.* **123**:283–288.
- de Lorenzo, V., and K. N. Timmis. 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235**:386–405.
- Demarre, G., A. M. Guerout, C. Matsumoto-Mashimo, D. A. Rowe-Magnus, P. Marliere, and D. Mazel. 2005. A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncPa) conjugative machineries and their cognate *Escherichia coli* host strains. *Res. Microbiol.* **156**:245–255.
- Derbise, A., B. Lesic, D. Dacheux, J. M. Ghigo, and E. Carniel. 2003. A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **38**:113–116.
- Figurski, D. H., and D. R. Helinski. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**:1648–1652.
- Gibb, A. P., G. R. Barclay, I. R. Poxtan, and F. di Padova. 1992. Frequencies of lipopolysaccharide core types among clinical isolates of *Escherichia coli* defined with monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* **166**:1051–1057.
- Goryshin, I. Y., J. Jendrisak, L. M. Hoffman, R. Meis, and W. S. Reznikoff. 2000. Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes. *Nat. Biotechnol.* **18**:97–100.
- Hayes, F. 2003. Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics. *Annu. Rev. Genet.* **37**:3–29.
- Hoffman, L. M., J. J. Jendrisak, R. J. Meis, I. Y. Goryshin, and S. W. Reznikoff. 2000. Transposome insertional mutagenesis and direct sequencing of microbial genomes. *Genetica* **108**:19–24.
- Hu, P., S. C. Janga, M. Babu, J. J. Diaz-Mejia, G. Butland, W. Yang, O. Pogoutse, X. Guo, S. Phanse, P. Wong, S. Chandran, C. Christopoulos, A. Nazarians-Armavil, N. K. Nasserli, G. Musso, M. Ali, N. Nazemof, V. Eroukova, A. Golshani, A. Paccanaro, J. F. Greenblatt, G. Moreno-Hagelsieb, and A. Emili. 2009. Global functional atlas of *Escherichia coli* encompassing previously uncharacterized proteins. *PLoS Biol.* **7**:e96.
- Hunstad, D. A., S. S. Justice, C. S. Hung, S. R. Lauer, and J. S. Hultgren. 2005. Suppression of bladder epithelial cytokine responses by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **73**:3999–4006.
- Kleckner, N., J. Bender, and S. Gottesman. 1991. Uses of transposons with emphasis on Tn10. *Methods Enzymol.* **204**:139–180.
- Lawley, T. D., K. Chan, L. J. Thompson, C. C. Kim, G. R. Govoni, and D. M. Monack. 2006. Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog.* **2**:e11.
- Létoffé, S., P. Deleplaire, and C. Wandersman. 2006. The housekeeping dipeptide permease is the *Escherichia coli* heme transporter and functions with two optional peptide binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:12891–12896.
- Merighi, M., A. Carroll-Portillo, A. N. Septer, A. Bhatiya, and J. S. Gunn. 2006. Role of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium two-component system PreA/PreB in modulating PmrA-regulated gene transcription. *J. Bacteriol.* **188**:141–149.
- Miller, V. L., and J. J. Mekalanos. 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* **170**:2575–2583.
- Moxley, R. A., E. M. Berberov, D. H. Francis, J. Xing, M. Moayeri, R. A. Welch, D. R. Baker, and R. G. Barletta. 1998. Pathogenicity of an enterotoxigenic *Escherichia coli* hemolysin (*hlyA*) mutant in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* **66**:5031–5035.
- Murphy, K. C. 1998. Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**:2063–2071.
- O'Toole, G. A., L. A. Pratt, P. I. Watnick, D. K. Newman, V. B. Weaver, and R. Kolter. 1999. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol.* **310**:91–109.
- Pemberton, C. L., N. A. Whitehead, M. Sebahia, K. S. Bell, L. J. Hyman,

- S. J. Harris, A. J. Matlin, N. D. Robson, P. R. Birch, J. P. Carr, I. K. Toth, and G. P. Salmond. 2005. Novel quorum-sensing-controlled genes in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: identification of a fungal elicitor homologue in a soft-rotting bacterium. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**:343–353.
33. Pobigaylo, N., D. Wetter, S. Szymczak, U. Schiller, S. Kurtz, F. Meyer, T. W. Nattkemper, and A. Becker. 2006. Construction of a large signature-tagged mini-Tn5 transposon library and its application to mutagenesis of *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:4329–4337.
34. Rasko, D. A., M. J. Rosovitz, G. S. Myers, E. F. Mongodin, W. F. Fricke, P. Gajer, J. Crabtree, M. Sebahia, N. R. Thomson, R. Chaudhuri, I. R. Henderson, V. Sperandio, and J. Ravel. 2008. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J. Bacteriol.* **190**:6881–6893.
35. Rosenberg, C., B. Bergeron, J. S. Julliot, and J. Denarie. 1977. Use of RP4 plasmids carrying bacteriophage Mu insertions in nitrogen fixing bacteria *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti*. *Basic Life Sci.* **9**:411–416.
36. Sandulache, R., P. Prehm, and D. Kamp. 1984. Cell wall receptor for bacteriophage Mu G(+). *J. Bacteriol.* **160**:299–303.
37. Schweizer, H. 2008. Bacterial genetics: past achievements, present state of the field, and future challenges. *Biotechniques* **44**:633–634, 636–641.
38. Serina, S., F. Nozza, G. Nicastro, F. Faggioni, H. Mottl, G. Deho, and A. Polissi. 2004. Scanning the *Escherichia coli* chromosome by random transposon mutagenesis and multiple phenotypic screening. *Res. Microbiol.* **155**:692–701.
39. Shuman, H. A., and T. J. Silhavy. 2003. The art and design of genetic screens: *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Genet.* **4**:419–431.
40. Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Biotechnology* **1**:784–791.
41. Stabb, E. V., and E. G. Ruby. 2002. RP4-based plasmids for conjugation between *Escherichia coli* and members of the *Vibrionaceae*. *Methods Enzymol.* **358**:413–426.
42. Tabor, H., E. W. Hafner, and C. W. Tabor. 1983. Localized mutagenesis of any specific region of the *Escherichia coli* chromosome with bacteriophage Mu. *Methods Enzymol.* **94**:91–104.
43. Taylor, A. L. 1963. Bacteriophage-induced mutation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **50**:1043–1051.
44. Tenaillon, O., D. Skurnik, B. Picard, and E. Denamur. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**:207–217.
45. Thomas, C. M., and C. A. Smith. 1987. Incompatibility group P plasmids: genetics, evolution, and use in genetic manipulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**:77–101.
46. Thune, R. L., D. H. Fernandez, J. L. Benoit, M. Kelly-Smith, M. L. Rogge, N. J. Booth, C. A. Landry, and R. A. Bologna. 2007. Signature-tagged mutagenesis of *Edwardsiella ictaluri* identifies virulence-related genes, including a *Salmonella* pathogenicity island 2 class of type III secretion systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:7934–7946.
47. Toussaint, A., and A. Résibois. 1983. Phage Mu: transposition as a life-style, p. 105–158. *In* J. A. Shapiro (ed.), *Mobile genetic elements*. Academic Press, New York, NY.
48. Valle, J., S. Da Re, S. Schmid, D. Skurnik, R. D'Ari, and J. M. Ghigo. 2008. The amino acid valine is secreted in continuous-flow bacterial biofilms. *J. Bacteriol.* **190**:264–274.
49. van de Putte, P., S. Cramer, and M. Giphart-Gassler. 1980. Invertible DNA determines host specificity of bacteriophage Mu. *Nature* **286**:218–222.
50. Van Gijsegem, F., and A. Toussaint. 1982. Chromosome transfer and R-prime formation by an RP4:mini-Mu derivative in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. *Plasmid* **7**:30–44.
51. Van Gijsegem, F., A. Toussaint, and M. Casadaban. 1987. Mu as a genetic tool, p. 215–250. *In* N. Symonds, A. Toussaint, P. Van de Putte, and M. M. Howe (ed.), *Phage Mu*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
52. Zhang, X. X., and P. B. Rainey. 2008. Dual involvement of CbrAB and NtrBC in the regulation of histidine utilization in *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Genetics* **178**:185–195.

Remerciements

À l'heure où j'écris ces lignes, la soutenance est derrière moi et c'est donc dans une ambiance plus sereine que jamais que je peux témoigner ma reconnaissance.

Pour commencer, je voudrais exprimer mes très vifs remerciements à ma directrice de thèse Élisabeth pour m'avoir intégré à son équipe et pour m'avoir donné les moyens de parvenir au bout de ce travail de recherche et au terme de cette thèse. Il fallait une bonne dose de confiance pour m'accepter au départ, de patience pour m'encadrer quand j'avais besoin d'une direction et de génie de la recherche pour faire de mon modeste travail une véritable production scientifique. Je suis heureux d'avoir côtoyé une personne qui concentre tant ces qualités et je lui souhaite beaucoup de réussite dans la poursuite de son titanesque travail, auquel j'espère avoir apporté une modeste pierre.

Je voudrais remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail, en particulier le Professeur Olivier Dussurget qui a suivi mon parcours depuis l'époque des Cours Pasteur jusqu'au terme du doctorat. Les judicieuses remarques des rapporteurs ont apporté beaucoup à la lisibilité et à l'exactitude du manuscrit.

À Anne, je dois mes premiers pas à la paillasse, ou plutôt à toutes les paillasses : labos standards et P3, animaleries, pas un seul endroit où je n'ai mis des gants sous son œil vigilant. Mon travail de thèse aura beaucoup gagné à être évalué par elle. Mes remerciements également à Camille, Alba, Yuri et Becky : quelle escorte pour Anne !

Mes collègues du « bureau des stagiaires » : dans un ordre arbitrairement chronologique, merci à Iman, Clémence, Céline, Sofia, Emilia, Nicolas, Karine, Manal, Florian, Jérôme, Aurélien et « Jérôme 2, le retour ». Chacun a marqué de son empreinte l'ambiance si particulière de ce bureau. Tantôt salon de dégustation, tantôt salle de fitness, souvent salle de réunion, le bureau a beaucoup profité de leur présence et s'il ne fut pas toujours facile d'y travailler, j'en garderai néanmoins d'excellents souvenirs.

Pour Cyril, une devinette : Casanova toujours à l'affût, conducteur irresponsable et digne du Permis Z, goinfre insatiable, galérien privé de congés, geek médiocre, et clone de mon petit frère, qui suis-je ?

J'ai beaucoup profité des discussions abordées avec Françoise et Christian, que ce soit pour m'apporter une précieuse aide face à un problème à résoudre ou bien que nous abordions un sujet 100% hors laboratoire. Merci de me rappeler si souvent qu'il y a quelque chose de grand à vivre dès qu'on met les pieds hors du labo ! Merci aussi des encouragements prodigués avec générosité.

Nadine, l'indispensable Nadine par qui tout se fait et sans qui rien ne se fait, merci d'avoir supporté mes trois établissements universitaires et mon double statut sans sourciller. Il me faudrait plus qu'une thèse pour simplement résumer tous les services que tu as rendus !

Une mention particulière aux collègues qui sont devenus parents pendant mon séjour dans l'Unité. Chaque annonce et chaque naissance aura été l'occasion de réjouissances que je ne suis pas près d'oublier !

Sans l'indispensable contribution des services de l'Institut Pasteur, je ne serais jamais allé aussi loin. Un grand merci à Isabelle, Françoise, Patrick, Sophie, Nadia, David, Cartini, Claudette, Lilia, Sabine, et Michel au laboratoire de préparation, à Marie-Anne, Joseph, Samantha et Kelly de la Plate-Forme d'Imagerie Dynamique, à tous les animaliers et aux responsables de l'Animalerie Centrale, aux documentalistes et formateurs de la Médiathèque Scientifique, aux agents du Service du Matériel Scientifique, à cette mystérieuse organisation si puissante qui m'a été laconiquement présentée sous le nom de « Gestion Duclaux ».

J'adresse également de chaleureux remerciements à ceux qui ont ajouté leurs conseils, leur expérience, leur bonne volonté et leur bonne humeur à mon chemin durant ces quatre années. Les doctorants devenus docteurs, en particulier Charlène et Céline, mais aussi Marine et Alice, Mathilde et Sophie, Daphné et ceux que j'oublierai de mentionner ; les Pasteuriens, ceux d'à côté, ceux d'en bas, ceux d'un peu plus loin et ceux de l'autre côté de la rue !

L'Institut Pasteur, siège de mes aventures pendant plus de quatre ans, m'a permis de faire des rencontres mémorables. Mes reconnaissantes pensées vont à aux spécialistes des Biofilms, à l'équipe de la Chorale, aux bénévoles de StaPa, aux camarades et encadrants du Cours Pasteur et à tous ceux qui ont garni mon chemin de ces moments forts, propres à égayer le temps de la recherche. À tous une excellente continuation !

Et pour finir, un grand saut vers l'extérieur, un petit pas dans le monde non-Pasteurien où j'ai trouvé d'inestimables trésors de soutien, de confiance et d'amitié. Merci à ma famille et à mes amis du dehors, je vous rejoins à présent avec la satisfaction d'avoir fait mon travail ici !

SUIVI *IN VIVO* ET EN TEMPS RÉEL DU PROCESSUS INFECTIEUX INDUIT PAR *YERSINIA PESTIS*

Mots-clés

Yersinia pestis, *in vivo*, peste bubonique, bioluminescence

Résumé de thèse

La peste a fortement marqué l'humanité au cours de trois grandes pandémies. Cette maladie grave, souvent mortelle, n'a pas encore disparu et reste un problème de santé. L'agent causal est l'entérobactérie *Yersinia pestis*, dont les mécanismes de virulence sont encore mal compris. Le suivi d'infection chez les rongeurs, réservoirs naturels de cet agent, est une méthode classique pour étudier le processus infectieux. Néanmoins, cette méthode souffre beaucoup de la variabilité biologique. Un grand nombre d'animaux et beaucoup de temps sont nécessaires pour obtenir des résultats significatifs. Une méthode plus efficace est apparue récemment pour observer la dissémination bactérienne : l'imagerie *in vivo* et en temps réel par bioluminescence permet de suivre la progression du pathogène au cours du processus infectieux en observant les animaux de façon non invasive. Nous avons transformé la souche virulente CO92 avec le plasmide p_{Em7}-luxCDABE et confirmé la production de bioluminescence à des niveaux détectables *in vitro* et *in vivo*. Dans un modèle murin de peste bubonique, nous avons pu quantifier la charge bactérienne dans plusieurs organes sans sacrifier l'animal et établir le schéma de progression de la bactérie au cours de la maladie. Après formation d'un foyer infectieux au site d'injection, la colonisation du ganglion lymphatique inguinal drainant ce site a été observée. Nous avons démontré que la bactérie suit un trajet direct du ganglion lymphatique inguinal au ganglion lymphatique axillaire. L'étape suivante est la colonisation des organes filtrant le sang, puis survient la septicémie dans les phases terminales de la mort. Nous avons établi que la forte variabilité dans le processus infectieux était due au temps pendant lequel la bactérie était contenue au site d'injection. À partir du moment où les ganglions lymphatiques sont colonisés, la cinétique de progression est à la fois régulière et rapide ; la septicémie survient dans les deux jours. Cette progression rapide illustre la capacité remarquable de *Y. pestis* à s'affranchir des défenses immunes de son hôte.

Summary

The enterobacteria Yersinia pestis causes plague, a deadly infectious disease infamously known for the millions of death caused during three major pandemics. Considered as a reemerging disease and a potential bioterrorism weapon, the bacterium possesses virulence mechanisms that have not been completely elucidated. Mouse model has long been used for pathology studies. Usual experimentation is time-consuming and laborious. Its sensitivity to biological variability implies using large groups of animals, in opposition to ethical concerns. Bioluminescence imaging provides an efficient improvement in infection monitoring by providing non-invasive, real-time in vivo detection of living bacteria. We applied this technique to Y. pestis virulent strain CO92 and proved that this bacterium could emit detectable bioluminescence signals both in vitro and in vivo. Light intensity was correlated to cfu charges in spleen, liver and inguinal lymph node. By monitoring bubonic plague, we observed the sequence of bacterial colonization steps, from the injection site to the inguinal draining lymph node. The next target was the ipsilateral axillary lymph node: we proved that bacteria followed a direct path from the inguinal lymph node to the axillary lymph node. The bacteria then reached and colonized blood-filtering organs such as the spleen and the liver. In the latest times of the disease, septicemia was observed with a typical whole-body bioluminescence. Our results showed that the high variability in the kinetics of bubonic plague was attributable to the length of time during which Y. pestis remained confined in the injection site. Once the bacteria had reached the draining lymph nodes, the disease evolved in a very fast and regular way to septicemia within two days. This is the first report of in vivo monitoring of Y. pestis thanks to bioluminescence.