

NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available.

UMI

VICKY BROCHU

**DÉMONSTRATION DU RÔLE DES PROTÉASES DE
PORPHYROMONAS GINGIVALIS DANS L'ACQUISITION DU FER
DE LA TRANSFERRINE HUMAINE**

Mémoire
présenté
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

Département de biochimie
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL

JUIN 1999

© Vicky Brochu, 1999



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-43785-X

Canada

RÉSUMÉ

Porphyromonas gingivalis, un microorganisme associé à la parodontite chronique de l'adulte, s'est avéré capable de croître en présence de transferrine comme seule source de fer. Le mécanisme par lequel cette bactérie acquiert le fer de la transferrine n'implique pas d'activité de liaison de la transferrine, de production de sidérophores et d'activité réductase du fer ferrique. Par contre, les activités protéolytiques présentes chez *P. gingivalis* semblent intervenir dans son acquisition du fer de la transferrine. D'ailleurs, ce microorganisme a dégradé la transferrine en fragments de faible poids moléculaire, lors d'une incubation avec la protéine. L'utilisation de souches mutantes, déficientes en activités protéolytiques, et d'inhibiteurs de protéases a permis de confirmer l'importance des protéases de *P. gingivalis* dans l'acquisition du fer de la transferrine. Les mutants déficients en activités Arg- et Lys-gingipaines ont été incapables de dégrader et d'utiliser la transferrine comme source de fer. Toutefois, la présence d'un seul type d'activité protéolytique, soit Arg- ou Lys-gingipaine, est apparue suffisante pour la dégradation et l'utilisation de la transferrine comme source de fer. En outre, certains inhibiteurs de protéases ont inhibé la dégradation de la transferrine par *P. gingivalis* et la croissance de cette bactérie en présence de transferrine comme source de fer. La capacité de *P. gingivalis* à acquérir le fer de la transferrine pourrait représenter un facteur de virulence important lors des parodontites.

AVANT-PROPOS

Je suis très reconnaissante envers mon directeur de maîtrise, le Dr. Daniel Grenier, pour m'avoir accueillie dans son équipe et m'avoir prodigué un enseignement de qualité tout au long de ce projet. Je désire également remercier les Drs. Denis Mayrand et Michel Frenette pour leurs précieux conseils et recommandations lors des comités aviseurs. En terminant, je ne peux passer sous silence l'assistance technique et les encouragements de Mmes Sonia Labbé et Pascale Plamondon.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
AVANT-PROPOS.....	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
CHAPITRE I.....	1
INTRODUCTION.....	1
1.1 Maladies parodontales.....	1
1.1.1 Définition et classification.....	1
1.1.2 Étiologie des maladies parodontales.....	2
1.1.3 Bactériologie des maladies parodontales.....	3
1.1.4 Facteurs bactériens de virulence.....	4
1.2 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	5
1.2.1 Caractéristiques générales.....	5
1.2.2 Potentiel pathogène.....	6
1.3 Protéases.....	7
1.3.1 Classification des protéases.....	7
1.3.2 Protéases chez <i>P. gingivalis</i>	7
1.3.2.1 Localisation et type d'activité enzymatique.....	7
1.3.2.2 Activités Arg-gingipaine et Lys-gingipaine.....	8
1.3.2.3 Souches mutantes déficientes pour les activités Arg-gingipaine et/ou Lys-gingipaine.....	9
1.4 Inhibiteurs de protéases.....	10
1.4.1 Définition.....	10
1.4.2 Origine.....	10
1.4.3 Effet des inhibiteurs de protéases.....	11
1.4.3.1 Pathologies humaines.....	11

1.4.3.2 Croissance microbienne.....	11
1.5 Fer.....	12
1.5.1 Importance du fer dans le métabolisme.....	12
1.5.2 Disponibilité du fer chez l'hôte.....	13
1.5.3 Transferrine, protéine liant le fer.....	14
1.6 Mécanismes d'acquisition du fer.....	15
1.6.1 Acquisition du fer intracellulaire.....	15
1.6.2 Acquisition du fer extracellulaire.....	16
1.6.2.1 Liaison de la transferrine ou la lactoferrine.....	16
1.6.2.2 Production de sidérophores.....	18
1.6.2.3 Activité réductase du fer ferrique.....	20
1.6.2.4 Activité protéolytique.....	20
1.6.2.5 Autres mécanismes.....	23
1.7 Acquisition du fer chez <i>P. gingivalis</i>	23
1.8 Objectifs du projet.....	25
CHAPITRE II.....	27
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	27
2.1 Matériel.....	27
2.2 Souches bactériennes et conditions de culture.....	27
2.3 Études de croissance avec les différentes souches de <i>P. gingivalis</i>	30
2.3.1 Milieu <i>Mycoplasma</i>	30
2.3.2 Sérum humain.....	31
2.4 Mise en évidence de mécanismes d'acquisition du fer.....	32
2.4.1 Activité de liaison de la transferrine aux cellules bactériennes.....	32
2.4.2 Production de sidérophores.....	33
2.4.3 Activité réductase du fer ferrique.....	34
2.4.4 Activité protéolytique.....	35
2.4.4.1 Dégradation de la transferrine suite à une croissance bactérienne.....	35
2.4.4.2 Dégradation de la transferrine <i>in vitro</i>	35

2.5 Activités Arg- et Lys-gingipaines.....	36
2.6 Détection de fragments de transferrine s'attachant aux cellules bactériennes.....	37
2.7 Effet de l'ajout d'inhibiteurs sur la croissance et la dégradation de différents substrats.....	38
2.7.1 Inhibiteurs de glycosidases.....	38
2.7.2 Inhibiteurs de protéases.....	38
2.7.2.1 Dégradation de différents substrats.....	38
2.7.2.2 Croissance en présence de transferrine.....	41
2.8 Effet de la présence de sérum sur les activités protéolytiques.....	41
2.8.1 Activités Arg- et Lys-gingipaines.....	41
2.8.2 Dégradation de la transferrine.....	41
2.9 Électrophorèses.....	42
2.9.1 En présence de dodécyl sulfate de sodium.....	42
2.9.2 En présence d'urée.....	42
2.9.3 Marqueurs de poids moléculaire et coloration des gels.....	43
CHAPITRE III.....	45
RÉSULTATS.....	45
3.1 Utilisation de la transferrine comme source de fer par <i>P. gingivalis</i>	45
3.2 Mise en évidence de mécanismes d'acquisition du fer chez <i>P.</i> <i>gingivalis</i> 33277.....	47
3.2.1 Activité de liaison de la transferrine aux cellules bactériennes.....	47
3.2.2 Production de sidérophores.....	47
3.2.3 Activité réductase du fer ferrique.....	49
3.2.4 Capture du fer de la transferrine.....	49
3.2.5 Activité protéolytique.....	49
3.3 Analyse comparative d'activités protéolytiques et de croissance chez différentes souches parentales et mutées de <i>P. gingivalis</i>	52
3.3.1 Activité Arg-gingipaine et Lys-gingipaine.....	52
3.3.2 Croissance en présence de transferrine comme source de fer.....	56

3.3.3 Dégradation de la transferrine.....	56
3.4 Analyse détaillée de la dégradation et de l'utilisation de la transferrine par <i>P. gingivalis</i>	59
3.4.1 Détermination de l'effet du niveau de saturation en fer de la transferrine sur sa susceptibilité à la dégradation protéolytique.....	59
3.4.2 Détection de fragments de transferrine s'attachant aux cellules.....	59
3.4.3 Détermination de l'effet d'inhibiteurs de glycosidases sur la dégradation de la transferrine.....	64
3.4.4 Détermination de l'effet d'inhibiteurs de protéases sur la dégradation de différents substrats.....	64
3.4.4.1 Activité Arg-gingipaine et Lys-gingipaine.....	64
3.4.4.2 Dégradation de la transferrine.....	68
3.4.5 Effet d'inhibiteurs de protéases sur la croissance de <i>P. gingivalis</i> en présence de transferrine comme source de fer.....	71
3.4.6 Détermination de l'effet de l'ajout de protéases au milieu de culture sur la capacité des souches M1 et M2 à croître en présence de transferrine.....	71
3.4.7 Comparaison des croissances des souches parentales et mutées de <i>P. gingivalis</i> en présence de transferrine comme source de fer.....	74
3.5 Évaluation du sérum humain comme milieu de culture pour <i>P. gingivalis</i> et de son effet sur l'activité protéolytique.....	74
3.5.1 Croissance dans le sérum humain actif et inactif.....	74
3.5.2 Dégradation de différents substrats en présence de sérum humain.....	77
3.5.2.1 Activité Arg-gingipaine et Lys-gingipaine.....	77
3.5.2.2 Dégradation de la transferrine.....	80
3.5.3 Effet des conditions de croissance de <i>P. gingivalis</i> sur la dégradation de différents substrats.....	80
3.5.4 Croissance dans le sérum humain supplémenté de différentes sources de fer.....	83
3.6 Analyse comparative de l'activité protéolytique de cultures obtenues suite à des conditions de croissance riches et pauvres en fer.....	83
CHAPITRE IV.....	87
DISCUSSION.....	87

BIBLIOGRAPHIE..... 101

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Mécanisme d'acquisition du fer impliquant une activité de liaison de la transferrine.....	17
Figure 2.	Mécanisme d'acquisition du fer impliquant la production de sidérophores.....	19
Figure 3.	Mécanisme d'acquisition du fer impliquant une activité réductase.....	21
Figure 4.	Mécanisme d'acquisition du fer impliquant une activité protéolytique.....	22
Figure 5.	Activité de liaison de la transferrine chez trois espèces bactériennes.....	48
Figure 6.	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'urée de la holo-transferrine incubée en présence des cellules ou du surnageant de <i>P. gingivalis</i> 33277.....	51
Figure 7.	Analyse SDS-PAGE de la dégradation de la transferrine par <i>P. gingivalis</i> 33277.....	53
Figure 8.	Analyse SDS-PAGE des surnageants de culture de <i>P. gingivalis</i> 33277 et 49417 et de leurs mutants spontanés suite à une croissance (24 h) dans le milieu MBB additionné de transferrine.....	60
Figure 9.	Analyse SDS-PAGE des surnageants de culture de <i>P. gingivalis</i> 381 et de ses mutants dirigés suite à une croissance (11 h) dans le milieu MBB additionné de transferrine.....	61
Figure 10.	Analyse SDS-PAGE des surnageants de culture de <i>P. gingivalis</i> W83 et 33277 et de leurs mutants dirigés suite à une croissance (11 h) dans le milieu MBB additionné de transferrine.....	62
Figure 11.	Analyse SDS-PAGE des surnageants de culture de <i>P. gingivalis</i> W50 et de ses mutants dirigés suite à une croissance (11 h) dans le milieu MBB additionné de transferrine.....	63

Figure 12.	Analyse SDS-PAGE et Western immunoempreinte des fragments de transferrine se liant aux cellules de <i>P. gingivalis</i>	65
Figure 13.	Effet d'inhibiteurs de protéases sur la dégradation de la transferrine par <i>P. gingivalis</i> 33277.....	69
Figure 14.	Effet de différentes combinaisons d'inhibiteurs de protéases sur la dégradation de la transferrine par <i>P. gingivalis</i> 33277.....	70
Figure 15.	Dégradation de la transferrine présente dans le milieu de culture MBB par la trypsine pancréatique.....	73
Figure 16.	Croissance de <i>P. gingivalis</i> 33277 et KDP112 dans le milieu MBB additionné de transferrine.....	76
Figure 17.	Analyse SDS-PAGE et western immunoempreinte de la dégradation de la transferrine présente dans le sérum humain par <i>P. gingivalis</i> 33277 en fonction du temps d'incubation.....	81

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Caractéristiques des souches sauvages de <i>P. gingivalis</i> utilisées au cours de l'étude.....	28
Tableau 2.	Caractéristiques des mutants de <i>P. gingivalis</i> utilisés au cours de l'étude.....	29
Tableau 3.	Inhibiteurs de glycosidases utilisés.....	39
Tableau 4.	Inhibiteurs de protéases utilisés.....	40
Tableau 5.	Composition du mélange de marqueurs de poids moléculaire.....	44
Tableau 6.	Croissance de différentes souches de <i>P. gingivalis</i> dans le milieu MBB supplémenté ou non d'une source de fer.....	46
Tableau 7.	Activité réductase du fer ferrique chez <i>P. gingivalis</i> en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose.....	50
Tableau 8.	Activité Arg-gingipaine et Lys-gingipaine des surnageants de culture des différentes souches parentales et mutées de <i>P. gingivalis</i>	54
Tableau 9.	Activités Arg-gingipaine et Lys-gingipaine des cellules des différentes souches parentales et mutées de <i>P. gingivalis</i>	55
Tableau 10.	Croissance de différentes souches parentales et mutées de <i>P. gingivalis</i> dans le milieu MBB supplémenté ou non d'une source de fer.....	57
Tableau 11.	Dégradation de la transferrine par les cellules des différentes souches de <i>P. gingivalis</i>	58
Tableau 12.	Effet de différents inhibiteurs de glycosidases sur la dégradation de la transferrine par <i>P. gingivalis</i> 33277.....	66
Tableau 13.	Effet de différents inhibiteurs de protéases sur les activités Arg- et Lys-gingipaines de <i>P. gingivalis</i> 33277.....	67
Tableau 14.	Effet de différents inhibiteurs de protéases sur la croissance de <i>P. gingivalis</i> 33277 et KDP112.....	72

Tableau 15.	Croissance de différentes souches de <i>P. gingivalis</i> dans le milieu MBB additionné de diverses sources de fer.....	75
Tableau 16.	Croissance de différentes souches de <i>P. gingivalis</i> dans le sérum humain.....	78
Tableau 17.	Comparaison des activités Arg- et Lys-gingipaines de <i>P. gingivalis</i> en présence ou non de sérum humain.....	79
Tableau 18.	Activité Arg- et Lys-gingipaines des cellules et du surnageant de culture de <i>P. gingivalis</i> 33277 selon différentes conditions de croissance.....	82
Tableau 19.	Croissance de <i>P. gingivalis</i> 33277 dans le sérum humain sans supplément ou additionné de différentes sources de fer.....	84
Tableau 20.	Comparaison des activités Arg- et Lys-gingipaines des cellules et du surnageant de <i>P. gingivalis</i> 33277 provenant de croissances dans différents milieux de culture.....	85

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	absorbance
AEBSF	4-(2-aminoethyl)-benzene sulfonyl fluoride
ARN	acide ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
BAPNA	N α -Benzoyl-DL-arginine- <i>p</i> -nitroanilide
BLPNA	N α -Benzoyl-DL-lysine- <i>p</i> -nitroanilide
BPS	acide bathophénanthroline disulfonique
CAS	chrome azuroï sulfaté
D.O.	densité optique
Da	daltons
DFP	diisopropyl fluorophosphate
DMSO	dimethyl sulfoxyde
DTT	dithiothréitol
EDTA	éthylènediaminetetra-acetic acid
FPRCK	D-Phe-Pro-Arg chlorométhyl ketone
kDa	kilodaltons
LPS	lipopolysaccharides
MBB	<i>Mycoplasma</i> Broth Base
PCMP	<i>p</i> -chloromercuriphénylsulfonique acid
SDS	dodécyl sulfate de sodium
TLCK	N- α - <i>p</i> -tosyl-L-lysine chlorométhyl
UFC	unité formatrice de colonies

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Maladies parodontales

1.1.1 Définition et classification

L'ensemble des tissus entourant et supportant la dent constitue le parodonte. Il comprend la gencive, le ligament parodontal, le cément et l'os alvéolaire (1, 2, 3, 4). L'espace situé entre l'émail d'une dent et l'épithélium gingival est appelé le sillon gingivo-dentaire. À l'état sain, la profondeur de ce sillon est d'environ 2 à 3 mm. Le fluide crévicaire se définit comme le liquide d'origine sérique qui prend place à l'intérieur du sillon gingival (5).

Les maladies parodontales regroupent l'ensemble des états inflammatoires localisés au niveau du parodonte et pouvant dans certains cas conduire à la destruction permanente des tissus de soutien de la dent (6). Les maladies parodontales sont divisées en deux grandes classes, soient les gingivites et les parodontites (2). Les gingivites représentent un état

inflammatoire réversible qui n'affecte que le parodonte superficiel, c'est-à-dire la gencive. Elles représentent néanmoins l'affection parodontale la plus répandue dans la population. Plusieurs signes cliniques peuvent signaler la présence d'une gingivite : un changement de couleur ou de texture de la gencive, une présence de saignements lors du brossage des dents, et une sensibilité gingivale. Les parodontites affectent, en plus du parodonte superficiel, les tissus parodontaux profonds qui sont responsables du support des dents. Elles se caractérisent par une perte osseuse et la formation d'une poche parodontale. Les différentes formes de parodontites ont été définies selon l'âge des sujets atteints, soient la parodontite prépubertaire, juvénile, à progression rapide et chronique de l'adulte. De plus, certaines parodontites sont associées à des maladies systémiques comme le syndrome d'immunodéficience acquise (6).

1.1.2 Étiologie des maladies parodontales

Au dix-septième siècle, van Leeuwenhoek parlait de l'importance « d'animacules vivants » dans l'étiologie de l'inflammation des gencives (7). Aujourd'hui, il est clair que les maladies parodontales ont une origine bactérienne.

La composante bactérienne de la plaque dentaire sous-gingivale est considérée comme l'agent initiateur des maladies parodontales (6, 8). Cette plaque dentaire est constituée entre autres de bactéries et d'une matrice extracellulaire composée de polysaccharides et de glycoprotéines. Initialement, la plaque dentaire est formée en grande partie par des bactéries à Gram-positif, qui peuvent par la suite être remplacées par des bactéries à Gram-négatif (9). C'est à ce stade que la plaque représente un potentiel destructeur à l'origine des maladies parodontales. Le sillon gingival sain évolue alors pour former une poche parodontale dont la profondeur peut atteindre 10 mm. La colonisation bactérienne du sillon gingival devient de plus en plus importante et complexe avec la progression de la maladie parodontale. Dans les cas les plus graves, une perte de la ou des dents concernées survient en absence de traitements.

La cavité buccale représente un écosystème comprenant plus de 300 espèces bactériennes différentes (10, 11). Ces bactéries constituent une flore commensale qui entretient des relations stables avec l'hôte, sans conséquences pathologiques. Lors de l'apparition d'une maladie parodontale, il y a déséquilibre de l'écosystème bactérien initial. Une ou des populations bactériennes spécifiques deviennent alors prédominantes au site de l'infection. Plusieurs facteurs peuvent induire un déséquilibre dans la flore buccale entre autre une diminution des défenses locales de l'hôte, un affaissement général du système immunitaire, de même qu'une augmentation d'un apport nutritionnel exogène favorisant une espèce pathogène au sein de l'écosystème (12).

L'invasion bactérienne au site de l'infection provoque une réponse inflammatoire locale de la part du système immunitaire. Cette inflammation mène à l'accumulation de macrophages, lymphocytes et autres cellules de l'immunité qui protègent le corps humain contre l'infection. Ces cellules inflammatoires contiennent des enzymes lytiques normalement vouées à la destruction du matériel phagocyté. Cependant, ces enzymes peuvent également participer à la destruction des tissus gingivaux s'ils sont larguées par les cellules de l'immunité lors de l'accomplissement de leurs fonctions ou lorsqu'elles sont détruites (13, 14).

1.1.3 Bactériologie des maladies parodontales

Les gingivites sont des infections polymicrobiennes, sans bactérie spécifique associée. L'initiation d'une inflammation gingivale est liée à une augmentation de la masse bactérienne, principalement des bactéries anaérobies facultatives et strictes à Gram-négatif. Certains facteurs peuvent modifier la nature et/ou la progression du processus inflammatoire. Ces facteurs sont la prise de certains médicaments et la présence de troubles hormonaux ou de maladies systémiques chez le sujet atteint. Toutes les gingivites ne sont pas obligatoirement suivies de parodontites, mais toutes les parodontites ont été précédées par une gingivite d'où l'importance de traiter ces infections (6).

Contrairement à la gingivite, des espèces bactériennes spécifiques ont pu être associées aux différentes formes de parodontites. Ce sont des bactéries anaérobies strictes à Gram-négatif incluant *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum* et *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *P. gingivalis* a été associé à la parodontite chronique de l'adulte, et *A. actinomycetemcomitans* à la parodontite juvénile localisée (15, 16, 17, 18, 19).

1.1.4 Facteurs bactériens de virulence

Les facteurs de virulence des bactéries parodontopathogènes incluent : ceux qui favorisent la colonisation de l'espace sous-gingival, ceux qui permettent la croissance, ceux qui permettent de résister au système de défense de l'hôte et ceux qui participent à la lyse tissulaire (6, 7).

Pour coloniser l'espace sous-gingival, la bactérie pathogène doit s'attacher aux tissus du parodonte ou à d'autres microorganismes dans le but de résister à l'action mécanique produite par l'écoulement du fluide crévicaire et de la salive. Des structures comme les fimbriae, la capsule et les adhésines participent à cet attachement. Le site colonisé par la bactérie doit présenter les conditions physico-chimiques (pH, température, potentiel d'oxydo-réduction) adéquates et les ressources nutritives nécessaires à la croissance bactérienne. En outre, la bactérie pathogène doit résister à l'antagonisme et la compétition provenant des autres bactéries présentes au même site (7, 20, 21, 22).

Les bactéries parodontopathogènes disposent de moyens leur permettant de déjouer le système de défense de l'hôte. Par exemple, certaines bactéries possèdent une capsule polysaccharidique qui les protège de la phagocytose exercée par les cellules immunitaires (6). D'autres bactéries, comme *P. gingivalis*, utilisent leurs enzymes protéolytiques pour détruire des protéines (facteurs du complément, immunoglobulines) du système immunitaire de l'hôte (6).

Les bactéries parodontopathogènes peuvent entraîner une destruction tissulaire au site de l'infection de façon directe ou indirecte. Directement, ces bactéries libèrent des enzymes, protéases ou protéinases, qui s'attaquent aux protéines constitutives du parodonte (collagène, fibronectine, etc.) (6). Indirectement, ces bactéries peuvent induire la libération d'enzymes lytiques (métalloprotéinases matricielles) chez les cellules de l'hôte (6).

1.2 *Porphyromonas gingivalis*

1.2.1 Caractéristiques générales

Des changements taxinomiques importants sont survenus dans l'histoire de la classification des bactéries anaérobies à Gram-négatif ayant la forme de bâtonnets, spécialement pour le genre *Bacteroides*. Celui-ci était divisé en deux, comprenant les espèces produisant des colonies à coloration noire et celles incapables de produire cette pigmentation (23). En 1990, Shah et coll. (24) ont introduit deux nouveaux genres bactériens, soit *Porphyromonas* et *Prevotella*, ce qui allait démunir le genre *Bacteroides* de la plupart des ces espèces pigmentées. Les espèces asaccharolytiques font partie du genre *Porphyromonas*, alors que celles capables de fermentation sont regroupées dans le genre *Prevotella* (25).

Le genre *Porphyromonas* comprend trois espèces d'origine humaine, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Porphyromonas endodontalis* et *P. gingivalis* (23), de même que quelques autres espèces d'origine animale (26, 27). Les cellules types de *P. gingivalis* consistent en de petits bâtonnets non motiles de 0,5 µm de diamètre par 1 à 2 µm de longueur. Cependant, les cellules peuvent être pléiomorphiques et présenter diverses formes allant du coque au bâtonnet. La culture de cette bactérie doit être effectuée dans un environnement anaérobie. Lorsque la croissance est effectuée sur un milieu gélosé contenant du sang, les colonies deviennent noires en fonction du temps, par accumulation de protohème et de protoporphyrine au niveau des membranes. La présence d'hémine et de vitamine K est essentielle pour la croissance de ce microorganisme (28).

1.2.2 Potentiel pathogène

P. gingivalis possède des facteurs de virulence lui permettant de coloniser les sites parodontaux, de neutraliser les défenses de l'hôte et de détruire les tissus parodontaux. Ces facteurs incluent notamment l'adhérence aux surfaces buccales et aux autres bactéries, la production de facteurs toxiques, ainsi que les capacités protéolytiques (29).

P. gingivalis possède des adhésines (pili, hémagglutine) qui participent à la colonisation des sites gingivaux en favorisant l'adhérence aux cellules épithéliales ou à d'autres bactéries (30). Une fois adhérent au site gingival, *P. gingivalis* libère des facteurs toxiques (acide propionique, acide butyrique, ammoniac et certains produits sulfurés) et des protéases de diverses spécificités qui participent à la destruction du parodonte (30). De plus, les lipopolysaccharides (LPS) présents chez cette bactérie favorisent la destruction des tissus parodontaux via des mécanismes indirects. Ainsi, le LPS stimule la production de facteurs de l'hôte (interleukine 1, prostaglandine E) considérés comme importants dans le processus de destruction du parodonte médié par la réponse immunitaire. Enfin, *P. gingivalis* interfère avec les mécanismes de défense de l'hôte, principalement en évitant la phagocytose (grâce à la présence d'une capsule) et en détruisant des protéines du système immunitaire telles les immunoglobulines et celles du système du complément (16, 30).

P. gingivalis est reconnu comme étant une bactérie hautement protéolytique, d'ailleurs un grand nombre de protéases ont été purifiées chez ce microorganisme et les gènes de plusieurs d'entre elles ont été isolés (31, 32, 33). Ces protéases sont considérées essentielles pour sa croissance et sa survie. Elles lui procurent une importante source de nutriments incluant des courts peptides et des acides aminés. Elles interagissent avec les mécanismes de défense de l'hôte par exemple en clivant des immunoglobulines et des éléments du système du complément comme le C3 et le C5. Elles participent également à la destruction des tissus parodontaux de l'hôte en clivant des protéines structurales comme le collagène et la fibronectine (34, 35, 36).

1.3 Protéases

1.3.1 Classification des protéases

Les protéases sont des enzymes qui ont la capacité de cliver des liens peptidiques. Elles sont divisées en deux grandes classes, les exopeptidases et les endopeptidases. Les exopeptidases clivent les acides aminés à partir de l'extrémité de la chaîne polypeptidique, alors que les endopeptidases clivent des liens peptidiques situés à l'intérieur de la chaîne polypeptidique (37). Les exopeptidases sont sous-divisées selon le nombre et le type d'acides aminés clivés et la grandeur de la chaîne polypeptidique restante.

Les protéases sont regroupées en quatre types selon leur mécanisme catalytique, soient sérine, métallo, aspartique et cystéine. Les protéases sont assignées à un type particulier en évaluant leur sensibilité à une gamme d'inhibiteurs spécifiques de protéases (37).

1.3.2 Protéases chez *P. gingivalis*

1.3.2.1 Localisation et type d'activité enzymatique

Plusieurs fractions de *P. gingivalis* incluant les cellules entières, le surnageant de culture, la membrane externe et les vésicules extracellulaires possèdent des activités protéolytiques. Cependant, la majorité de l'activité protéolytique chez ce microorganisme est associée aux cellules (29).

La caractérisation de plusieurs protéases purifiées chez *P. gingivalis* a suggéré la présence de trois types d'activité enzymatique soit : les activités Arg- et Lys-gingipaines, l'activité glycylopropyl protéase et l'activité collagénase (29).

1.3.2.2 Activités Arg-gingipaine et Lys-gingipaine

Les cystéine-protéases de *P. gingivalis*, également appelées gingipaines, sont responsables d'environ 85% de son activité protéolytique totale (34). Une activité pseudo-trypsine, qui consiste en la capacité de cliver différents substrats après les acides aminés arginine et lysine, leur avait été initialement attribuée (29). Cependant, il est maintenant reconnu que ce sont des cystéine-protéases différentes qui coupent après l'acide aminé arginine d'une part et l'acide aminé lysine d'autre part. Les gingipaines ont alors été réparties en deux catégories selon leur mode d'action sur les substrats, soit Arg-gingipaine et Lys-gingipaine. Les produits de deux gènes possèdent l'activité Arg-gingipaine, alors que l'activité Lys-gingipaine est le résultat du produit d'un seul gène (36, 38).

À ce jour, plusieurs gènes de l'Arg-gingipaine 1 de différentes souches de *P. gingivalis* ont été clonés et séquencés. Ces gènes incluent : *rgp-1* (*P. gingivalis* HG66) (33), *agp* (381) (39), *prpR1* (W50) (40) et *prtH* (W83) (41). Quoiqu'il existe quelques différences au niveau de leur taille et de leur séquence nucléotidique, il a été établi que tous ces gènes représentent le même gène avec quelques variations entre les souches (38, 42).

La purification des enzymes responsables de l'activité Arg-gingipaine a démontré la présence de trois formes appelées ArgI, ArgIA et ArgIB. ArgI est un hétérodimère avec une chaîne α et une chaîne β liées de façon non covalente. L'activité protéolytique est associée à la composante α . Les deux composantes ont cependant des poids moléculaires similaires soient d'environ 50 kilodaltons (kDa) et conséquemment migrent en une seule bande sur un gel de polyacrylamide. ArgIA représente la chaîne α libre alors que ArgIB est une modification post-traductionnelle de la composante α . Cette dernière forme migre en une bande diffuse entre 70 et 90 kDa (40, 43, 44). Ensemble, ArgI, ArgIA et ArgIB sont responsables en grande partie de l'activité Arg-gingipaine.

Selon Curtis et coll. (38), ArgI, ArgIA et ArgIB seraient les produits du gène 1 de l'Arg-gingipaine. Par contre, en absence d'expression de ce gène 1, le gène 2 de l'Arg-gingipaine

produirait d'autres formes enzymatiques soient ArgIIA et ArgIIB. Ces deux nouvelles formes apparaissent presque identiques à ArgIA et ArgIB en regard de leur activité et de leur structure, excepté pour deux acides aminés.

La purification de l'enzyme responsable de l'activité Lys-gingipaine a montré une protéase de 51 kDa constituée d'une chaîne polypeptidique (45).

1.3.2.3 Souches mutantes déficientes pour les activités Arg-gingipaine et Lys-gingipaine

Des mutants spontanés ont été sélectionnés par Chandad et coll. (46) quant à leur absence d'activité d'héماغglutination. Ces mutants de la souche ATCC 33277 ont été nommés M1, M2 et M3. Les activités Arg-gingipaine et d'héماغglutination de ces mutants ont été évaluées. Les cellules des mutants M1 et M2 ne possèdent peu ou pas d'activité Arg-gingipaine et d'héماغglutination; tandis que les cellules de M3 présentent une activité Arg-gingipaine similaire à celle de 33277 et une activité d'héماغglutination inférieure d'environ la moitié à celle de la souche parentale. Cette équipe de chercheurs a donc suggéré l'existence d'une relation entre l'activité Arg-gingipaine et l'activité d'héماغglutination (46).

Des mutants déficients au niveau de certains gènes responsables des activités gingipaines ont été construits par différentes équipes de chercheurs. Nakayama et coll. (47) ont produit trois différents mutants de la souche 33277 en utilisant un système impliquant un plasmide suicide pour interrompre des gènes précis. Le mutant KDP110 a été interrompu sur le gène de l'Arg-gingipaine 1, le mutant KDP111, sur le gène de l'Arg-gingipaine 2 et le mutant KDP112, sur les gènes de l'Arg-gingipaine 1 et 2. L'équipe de Kuramitsu (31, 42) a quant à elle, construit deux mutants de la souche 381. Le mutant G102 a été interrompu sur le gène de l'Arg-gingipaine 1 et le mutant MT10, sur le gène de l'Arg-gingipaine 2. Enfin, des mutants de la souche W50 ont été produits par Curtis et coll. (40, 48) W501 est déficient sur le gène de l'Arg-gingipaine 1 et W50D7, sur le gène de l'Arg-gingipaine 2.

1.4 Inhibiteurs de protéases

1.4.1 Définition

Les protéases agissent sur leurs substrats en se liant à une séquence spécifique d'acides aminés. Les inhibiteurs de protéases empêchent ainsi la liaison spécifique entre le centre actif d'une protéase et une séquence en acides aminés présente sur le substrat (37). De ce fait, l'action des enzymes envers leurs substrats est inhibée partiellement ou totalement. Il existe une variété d'inhibiteurs d'exopeptidases et d'endopeptidases tant réversibles qu'irréversibles (49).

1.4.2 Origine

Un grand nombre d'inhibiteurs de protéases ont été isolés tant chez les mammifères, que chez les plantes et les microorganismes. Au niveau du plasma sanguin, les inhibiteurs sont des macromolécules impliquées dans le contrôle d'une variété de fonctions cellulaires comme l'inflammation et la coagulation sanguine (50).

Les microorganismes qui synthétisent des protéases requièrent normalement des inhibiteurs de protéases afin de se protéger des effets de leurs propres protéases (51). Ainsi, plusieurs inhibiteurs de protéases ont été mis en évidence dans des surnageants de culture de différents microorganismes. Ces inhibiteurs sont généralement des peptides possédant un faible poids moléculaire (< 1000 daltons (Da)), quoique certains peuvent ressembler à ceux d'origine animale ou végétale, donc d'un poids moléculaire supérieur à 5000 Da. Des inhibiteurs de protéases ont été isolés et purifiés, entre autres chez *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Erwinia chrysanthemi* (52, 53, 54).

1.4.3 Effet des inhibiteurs de protéases

1.4.3.1 Pathologies humaines

Les protéases et les inhibiteurs de protéases sont considérés comme étant d'importants facteurs dans la physiopathologie de nombreuses maladies humaines (55). À l'état sain, l'activité de plusieurs protéases extracellulaires est contrôlée par la présence d'inhibiteurs de protéases spécifiques. Une déficience au niveau de ces inhibiteurs naturels entraîne généralement une pathologie. Par exemple, une déficience en α_2 -antiplasmine est associée à l'hémorragie, tandis qu'une déficience en α_1 -antiplasmine est associée aux bronchites chroniques (55).

Les inhibiteurs de protéases constituent de plus en plus des agents potentiels pour la prévention et le traitement de plusieurs pathologies humaines. Puisque les protéases reconnaissent et clivent une séquence particulière en acides aminés, il est parfois possible d'inhiber les protéases participant à une pathologie précise tout en n'affectant pas l'activité des autres protéases (37). Les inhibiteurs utilisés chez l'humain doivent cependant être non toxiques et stables dans les fluides biologiques (37).

Certains inhibiteurs de protéases constituent actuellement des agents thérapeutiques utilisés lors de maladies dégénératives. L' α_1 -antitrypsine est administré lors de désordres tels l'emphysème et la fibrose kystique (55). D'autres inhibiteurs de protéases sont utilisés pour le traitement du cancer, de l'arthrite et du syndrome d'immunodéficience acquise (55, 56, 57).

1.4.3.2 Croissance microbienne

Certains microorganismes produisent des protéases qui sont essentielles à un stade de leur cycle de vie. L'addition d'inhibiteurs de protéases peut donc affecter la croissance de ces microorganismes *in vitro*.

Une cystéine-protéase, la cruzipaine, est impliquée à tous les stades du cycle vital de *Trypanosoma cruzi*, le parasite responsable de la maladie de Chagas (58). Les trois différents inhibiteurs de cystéine-protéases testés ont pu pénétrer le parasite et inhiber l'action de la cruzipaine, ce qui a résulté en une diminution de l'infection dans un modèle cellulaire (59).

Les protéases extracellulaires produites par *Serratia marcescens* et *Pseudomonas aeruginosa* apparaissent importantes dans la pathogenèse de ces deux espèces bactériennes (60). La croissance de souches produisant des protéases s'effectue plus rapidement que celle de souches n'en produisant pas (60). De plus, la croissance de ces deux bactéries est inhibée en présence d'un inhibiteur plasmatique de protéases, l'ovomacroglobuline du poulet (60, 61).

Quelques inhibiteurs de protéases ont déjà démontré un effet sur la croissance de *P. gingivalis*. La bestatine et l'iodoacétamide, un inhibiteur de métallo-protéases et de cystéine-protéases respectivement, ont produit les plus fortes inhibitions de la croissance de *P. gingivalis* (62). D'autres inhibiteurs de protéases, incluant la leupeptine, l'acide *p*-chloromercuriphénylsulphonique et le 1-10 phénanthroline, ont également inhibé la croissance de *P. gingivalis* (62). Une autre étude a montré qu'un inhibiteur de cystéine-protéases, la cystatine S produite chez le rat, inhibe la croissance de *P. gingivalis* (63).

1.5 Fer

1.5.1 Importance du fer dans le métabolisme

Le fer est le métal de transition le plus abondamment retrouvé chez les organismes vivants (64). D'ailleurs, il est un élément essentiel à la croissance de la majorité des cellules microbiennes procaryotes ou eucaryotes, c'est-à-dire chez les bactéries, protozoaires et champignons (65). La seule exception concerne les bactéries lactiques, qui remplacent le fer par du cobalt ou du manganèse (64, 66).

Une concentration en fer de 0,4 à 4 μM est nécessaire pour plusieurs activités biologiques des cellules bactériennes (67, 68). Il agit comme cofacteur pour différentes enzymes, incluant : la ribonucléotide réductase (69), l'ARN polymérase III (70, 71), quelques hydroxylases et dioxygénases (72, 73) et certaines enzymes impliquées dans le métabolisme de l'oxygène (74). De plus, le fer est essentiel pour l'action de cytochromes, hydrogénases, ferridoxines et succinate déshydrogénases impliqués dans la chaîne de transport des électrons (75, 76). En plus d'être essentiel à la multiplication bactérienne, le fer régule la synthèse de plusieurs toxines bactériennes (77). La quantité de toxines produites, par exemple, par *Corynebacterium diphtheria*, *Clostridium tetani*, *P. aeruginosa* et *Vibrio cholerae*, devient maximale lorsque la quantité de fer disponible pour la croissance bactérienne est suffisante, mais non excessive (78, 79, 80, 81, 82, 83).

Chez les vertébrés, le fer est essentiel au transport de l'oxygène aux nombreuses cellules de l'organisme via l'hémoglobine et la myoglobine. Il agit également comme cofacteur pour des métallo-flavoprotéines et d'autres enzymes et participe au transport des électrons. Ainsi l'activité de nombreuses cellules de l'organisme, incluant les neutrophiles, les lymphocytes B et T, les cellules NK, est dépendante de la présence de cet élément (84, 85).

1.5.2 Disponibilité du fer chez l'hôte

Le sang, les tissus et les fluides biologiques des mammifères contiennent des concentrations en fer suffisantes pour subvenir aux besoins du métabolisme des cellules (64, 86). Cependant, à cause de la faible solubilité du fer ferrique et la toxicité associée à ce métal, les organismes supérieurs ont développé des mécanismes leur permettant d'abaisser la concentration de fer libre jusqu'à 10^{-18}M , donc en-dessous de celle requise pour la croissance bactérienne.

Dans le corps humain, la majorité du fer est séquestrée à l'intérieur des cellules. Il est complexé à des protéines comme l'hémoglobine, la myoglobine, la ferritine, la catalase et le cytochrome c (87, 88). L'hémoglobine est la forme la plus abondante (64).

À l'extérieur des cellules humaines, le fer est complexé à des glycoprotéines. La transferrine lie le fer dans le sang, la lymphe, le sérum et les fluides extracellulaires, alors que la lactoferrine le lie dans les sécrétions provenant des muqueuses (89, 90).

Lors d'une infection bactérienne, l'hôte possède quelques mécanismes qui lui permettent de maintenir les concentrations en fer libre à un niveau minime. Par exemple, lorsque les érythrocytes sont lysés, de l'hémoglobine est libérée dans la circulation sanguine. Une protéine, l'haptoglobine, lie alors rapidement l'hémoglobine libre et ce complexe, haptoglobine-hémoglobine, est ensuite éliminé de la circulation par les cellules du système réticulo-endothélial. Lorsque l'haptoglobine est saturée, d'autres protéines prennent la relève. L'hémopexine et l'albumine lient alors l'hème, produit de l'oxydation et de la dissociation de l'hémoglobine, les complexes ainsi formés sont ensuite éliminés de la circulation sanguine. De plus, lors d'une infection, il se produit une augmentation de la synthèse de ferritine au foie et un relargage de lactoferrine au niveau des neutrophiles (64).

1.5.3 Transferrine, protéine liant le fer

La transferrine est une glycoprotéine synthétisée au niveau du foie. Cette protéine possède deux sites de fixation pour le fer ferrique, un à l'extrémité C-terminale et l'autre à l'extrémité N-terminale de sa chaîne polypeptidique. La transferrine lie les deux atomes de fer en association avec un anion, habituellement du bicarbonate. Lorsque la transferrine lie le fer, elle est appelée holo-transferrine; tandis que l'apo-transferrine représente la protéine sans fer associé. Les deux sites de fixation pour le fer sont similaires, mais non identiques (89, 91). D'ailleurs, certaines études indiquent que la constante d'association pour le fer est différente pour les deux sites (90). De plus, les sites diffèrent dans leur capacité à retenir le fer via les autres chélateurs. La constante d'association entre la transferrine et le fer est de l'ordre d'environ $10^{24} M^{-1}$, par contre la transferrine est partiellement saturée dans les fluides biologiques.

La transferrine est composée de 630 acides aminés, dont 23 sont des arginines et 56 des lysines (92). Son poids moléculaire se situe entre 76 et 81 kDa. La composition en hydrate

de carbone de cette protéine atteint 5,7%. Les sucres liés à la transferrine sont le mannose, le galactose, le glucosamine et le fucose (92).

L'absorption, le transport et l'échange de fer dans les tissus sont les principaux rôles physiologiques de la transferrine. De plus, en liant le fer essentiel à la croissance bactérienne, la transferrine crée des conditions bactériostatiques pour certains pathogènes.

1.6 Mécanismes d'acquisition du fer

Puisque le fer est essentiel à la croissance bactérienne et qu'il est très peu disponible *in vivo*, les bactéries pathogènes ont développé des mécanismes leur permettant d'acquérir cet élément nutritif.

1.6.1 Acquisition du fer intracellulaire

Quelques bactéries pathogènes, incluant celles appartenant aux genres *Listeria*, *Yersinia*, *Salmonella* et *Shigella*, possèdent la capacité d'entrer à l'intérieur des cellules de l'hôte (93, 94, 95, 96). Dans le cytoplasme, ces bactéries peuvent alors obtenir le fer à partir de l'hème ou de la ferritine (97).

Certains microorganismes pathogènes peuvent utiliser le fer lié à l'hème ou l'hémoglobine présent en traces dans le sérum, due à la lyse des érythrocytes (98). La lyse de ces cellules peut se produire spontanément lors de certaines pathologies, comme la malaria et l'anémie. En outre, des toxines bactériennes peuvent causer la lyse des érythrocytes, par exemple l' α -hémolysine produite par *E. coli* (99).

La capacité des bactéries à acquérir le fer de l'hème ou de l'hémoglobine diffère si ces sources sont liées ou non à d'autres protéines (l'haptoglobine pour l'hémoglobine et l'hémopexine ou l'albumine pour l'hème). En effet, *E. coli* est incapable d'utiliser le complexe haptoglobine-hémoglobine comme source de fer (100), par contre *Haemophilus*

influenzae peut acquérir le fer de l'hème ou l'hémoglobine, sous une forme liée ou non aux protéines de l'hôte (101).

1.6.2 Acquisition du fer extracellulaire

À l'extérieur des cellules de l'hôte, le fer est majoritairement complexé à la transferrine ou la lactoferrine. Ces deux protéines présentent une homologie de 49,8% au niveau de leur séquence en acides aminés (89).

1.6.2.1 Liaison de la transferrine ou la lactoferrine

Depuis 1980, une quinzaine d'espèces bactériennes différentes ont été reconnues capables de lier la transferrine (77). Les cellules bactériennes possèdent alors un récepteur spécifique pour la transferrine. Chez l'humain, le récepteur pour la transferrine humaine est constitué de deux protéines de 93 kDa liées par un pont disulfure (64). *Neisseria meningitidis*, *H. influenzae* et *Bordetella pertussis* lient la transferrine ou la lactoferrine, via des récepteurs qui reconnaissent la transferrine-Fe³⁺ ou la lactoferrine-Fe³⁺ (101, 102, 103, 104, 105, 106). L'interaction entre le récepteur et la protéine est hautement spécifique. Cependant, la liaison de ces protéines par les cellules bactériennes n'implique pas nécessairement que le fer puisse être utilisé par les bactéries. Par exemple, les bactéries du genre *Aeromonas* peuvent lier la lactoferrine humaine ou bovine, cependant le fer utilisé pour son métabolisme provient principalement de l'hème ou s'acquiert plutôt suite à la production de sidérophores. Toutefois, lorsque la synthèse de sidérophores est supprimée, la capacité de liaison à la lactoferrine est augmentée (78, 107, 108, 109).

Le mécanisme d'acquisition du fer à partir de la transferrine ou la lactoferrine liée au microorganisme n'est pas entièrement compris. Certaines études suggèrent la participation d'une réductase associée à la surface, alors que d'autres suggèrent plutôt une baisse localisée du pH avec comme conséquence le relargage du fer qui se fixe à une molécule acceptrice (78). Chez les espèces du genre *Neisseria*, une molécule de 36 kDa pourrait lier le fer ferrique (110) (Figure 1).

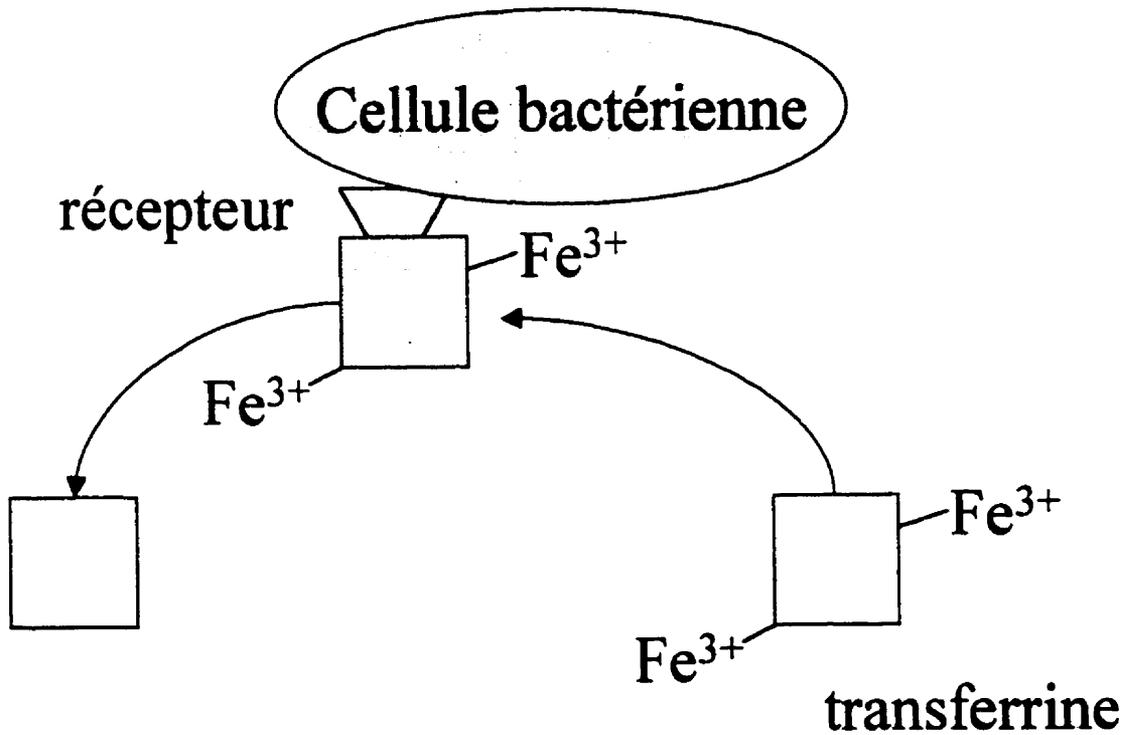


Figure 1. Mécanisme d'acquisition du fer impliquant une activité de liaison de la transferrine

1.6.2.2 Production de sidérophores

Un deuxième mécanisme d'acquisition du fer chez les microorganismes implique la production de sidérophores (Figure 2). Les sidérophores sont définis comme étant des molécules de faible poids moléculaire, entre 500 et 1000 Da, possédant une haute affinité pour le fer ferrique (66). Ces molécules sont élaborées par les bactéries ou les champignons, lorsque que ceux-ci croissent dans un environnement pauvre en fer. Le rôle du sidérophore est de capter le fer présent dans l'environnement et de le rendre accessible à la cellule microbienne (66).

Les sidérophores ont été divisés en deux classes, soient hydroxamate ou catécholates, selon le groupement chimique impliqué dans la liaison du fer (66). Cependant, quelques sidérophores qui ont été isolés sont apparus comme n'appartenant à aucune de ces deux classes (111). Les sidérophores hydroxamates sont présents chez les bactéries et champignons, alors que les sidérophores catécholates ne sont produits que par des bactéries. La synthèse de sidérophores hydroxamates est plus fréquemment associée à la virulence que celle de sidérophores catécholates (112). Ainsi, un sidérophore hydroxamate comme l'aérobactine produit par *Aerobacter aerogenes* capte plus efficacement le fer de la transferrine présente dans le sérum que le sidérophore entérobactine produit par *E. coli* et faisant partie de la classe catécholates (66, 78).

Suite à la capture par le sidérophore du fer nécessaire à la croissance bactérienne, le complexe fer-sidérophore retourne à la cellule bactérienne. Celle-ci possède à sa surface un récepteur spécifique au sidérophore. La synthèse de ces récepteurs est habituellement réprimée dans des conditions de croissance riches en fer. Le complexe fer-sidérophore peut être transporté jusqu'à la membrane cytoplasmique ou le fer peut être transféré à une molécule acceptrice. Le largage du fer à partir du sidérophore implique probablement l'action d'une réductase (78).

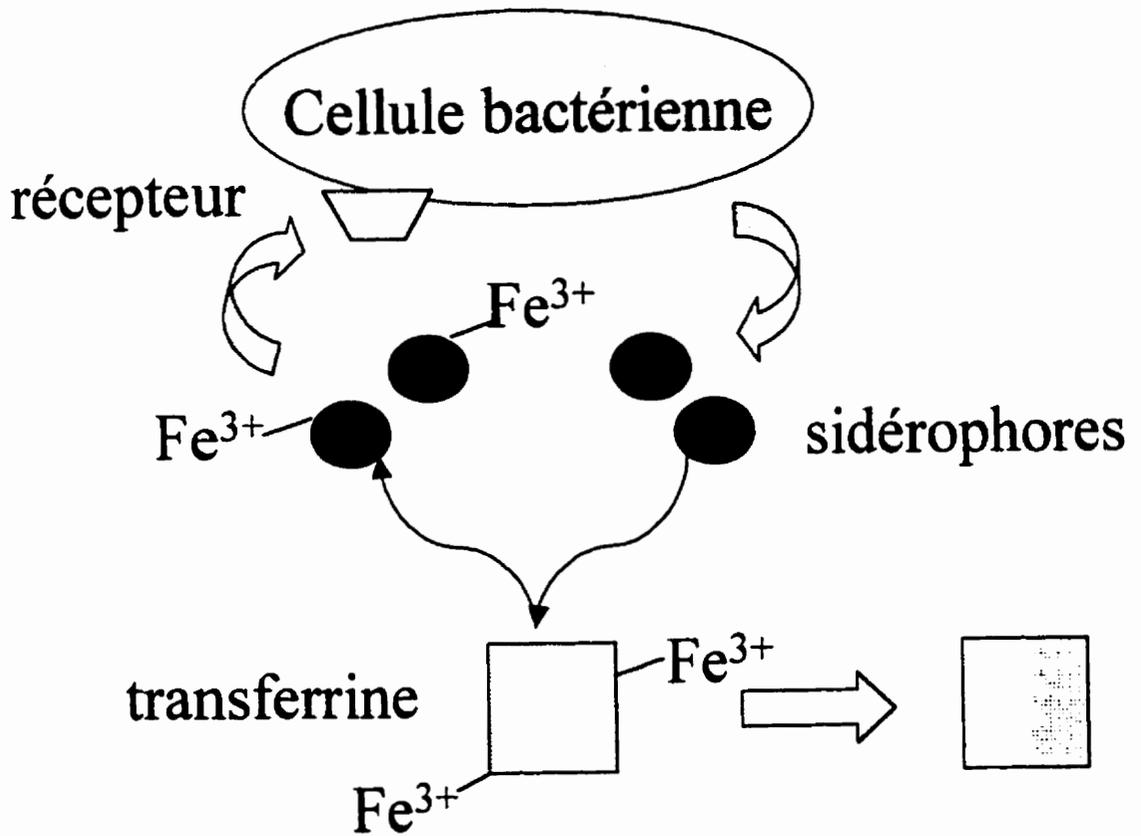


Figure 2. Mécanisme d'acquisition du fer impliquant la production de sidérophores

Chez les bactéries à Gram-négatif, le récepteur pour le sidérophore est situé au niveau de la membrane externe. D'autres protéines localisées dans le périplasme et sur la membrane cytoplasmique participent à l'entrée du fer dans la cellule bactérienne (71). C'est ce qui se produit chez plusieurs bactéries telles *E. coli*, *V. cholerae* et *P. aeruginosa* (113, 114, 115).

1.6.2.3 Activité réductase du fer ferrique

Une autre stratégie utilisée par des microorganismes pathogènes pour acquérir le fer implique la réduction du fer ferrique en fer ferreux (Figure 3). Le fer ferreux peut ensuite être assimilé par les microorganismes pour subvenir aux besoins de leur métabolisme. Ce mécanisme est présent chez une variété de pathogènes, bactéries ou champignons. La réduction du fer peut s'effectuer par l'intermédiaire d'enzymes appelées réductases ou suite à la production de substances appelées réductants qui génèrent un environnement réduit permettant le largage du fer des molécules plasmatiques.

Candida albicans et *Streptococcus mutans* libèrent des réductases dans leur environnement, tandis qu'un réductant de 9 kDa est sécrété par les cellules de *Listeria monocytogenes* (64, 116, 117).

1.6.2.4 Activité protéolytique

Plusieurs bactéries pathogènes produisent des protéases pouvant être associées à l'enveloppe cellulaire et/ou libérées dans l'environnement. Ces enzymes possèdent dans certains cas la capacité de cliver des protéines de l'hôte, notamment la transferrine ou la lactoferrine. La dégradation de ces protéines en fragments de plus faible poids moléculaire faciliterait soit le largage du fer de la transferrine, soit l'assimilation par la cellule de petits fragments auxquels du fer serait lié (Figure 4).

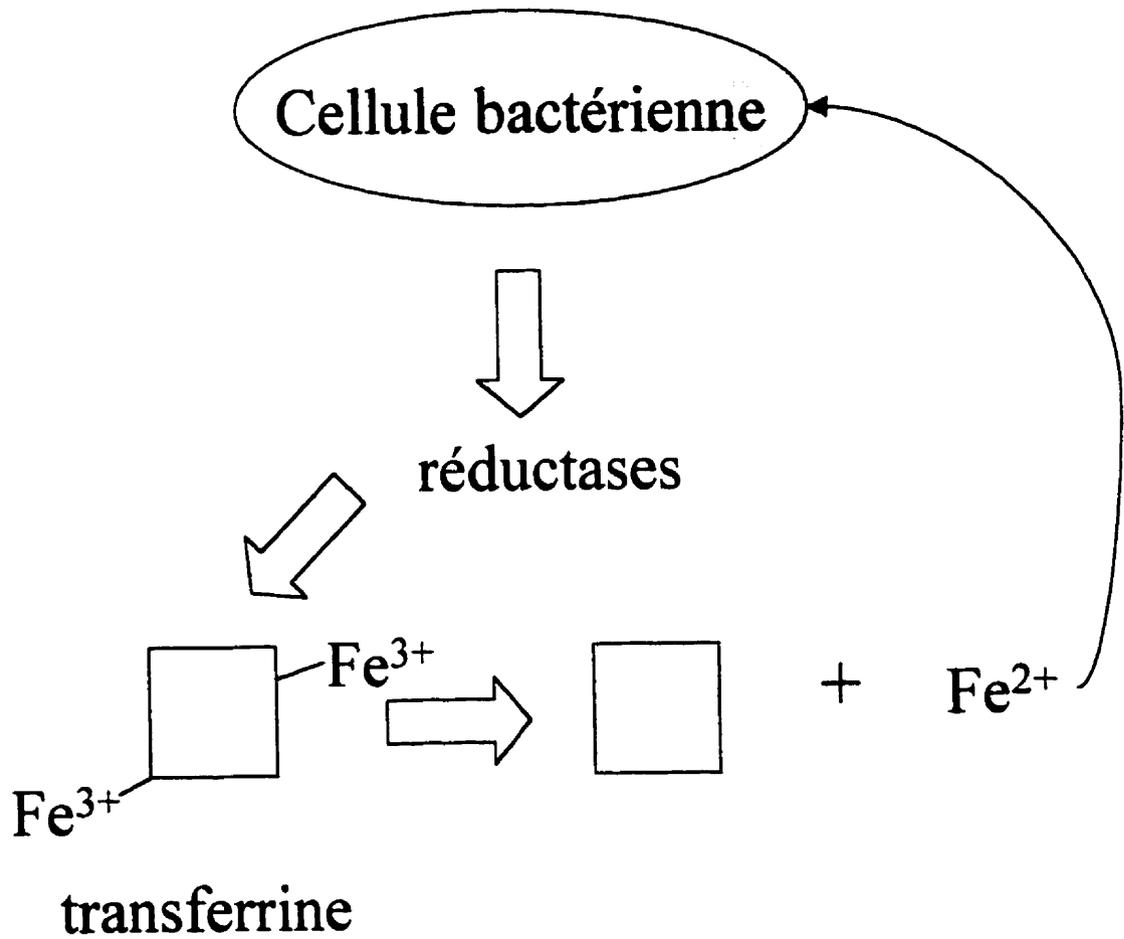


Figure 3. Mécanisme d'acquisition du fer impliquant une activité réductase

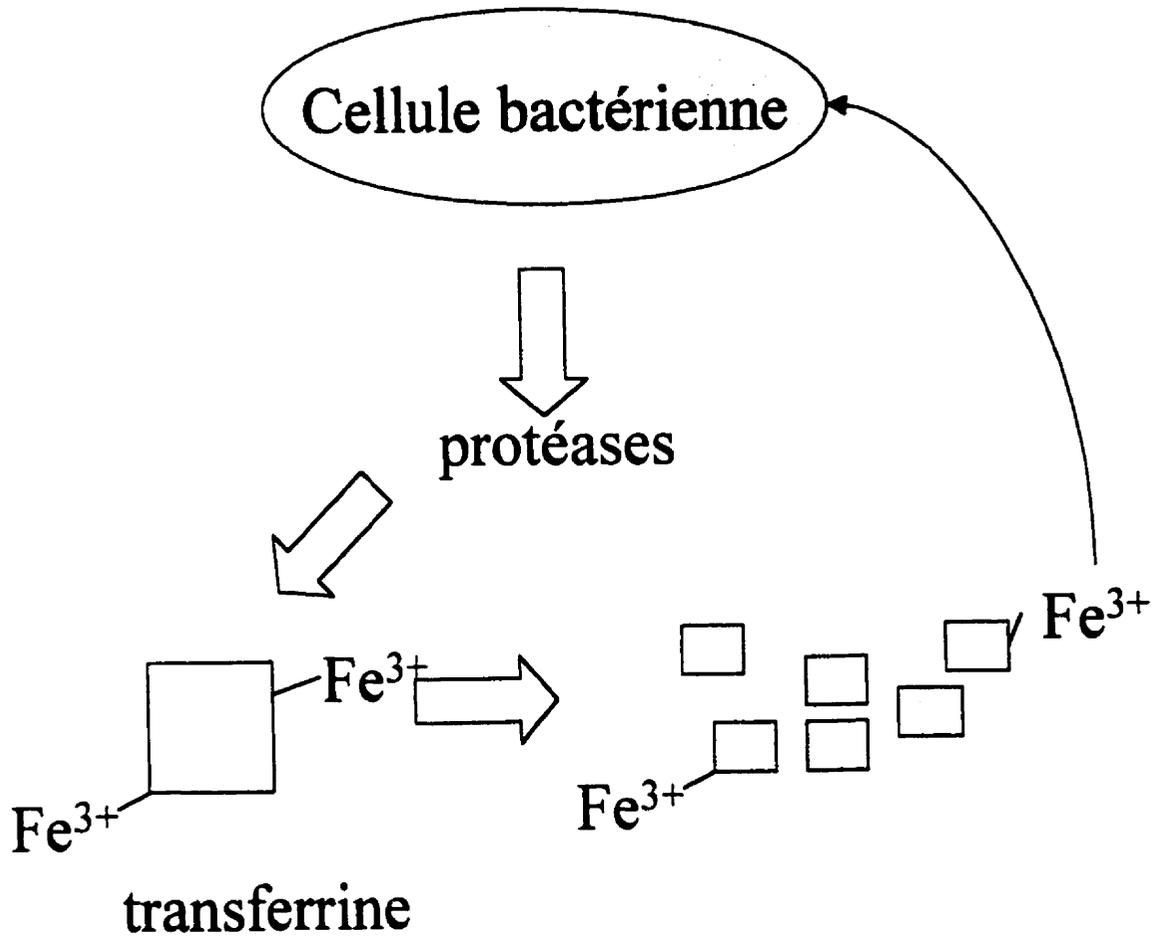


Figure 4. Mécanisme d'acquisition du fer impliquant une activité protéolytique

P. aeruginosa produit plusieurs protéases extracellulaires dont l'une d'entre elles, l'élastase, clive la transferrine en fragments de faible poids moléculaire (118). La synthèse de l'élastase est augmentée dans un environnement pauvre en fer. Chez cette bactérie, le clivage de la transferrine favorise la capture du fer par le sidérophore pyoverdine. La synthèse de protéases en concert avec celle de sidérophores permet donc à *P. aeruginosa* d'acquérir le fer durant une infection (115, 118). Ce même phénomène a été démontré chez *Vibrio vulnificus* (119).

1.6.2.5 Autres mécanismes

La transferrine et la lactoferrine ne peuvent retenir le fer, lorsque les conditions de pH deviennent acide. Dans le cas de la transferrine, l'habilité à lier le fer est considérablement diminuée dès que le pH atteint 6,5 (120). Des conditions plus acides (pH 4) sont cependant nécessaires pour le largage du fer de la lactoferrine (78). La diminution du pH suite à la croissance bactérienne peut donc constituer un autre mécanisme d'acquisition du fer. D'ailleurs, un tel mécanisme impliquant une modification de l'environnement a été démontré chez *Clostridium perfringens* (121). La croissance de cette bactérie entraîne une baisse du potentiel d'oxydo-réduction et du pH. Ces conditions permettent alors le largage du fer de la transferrine. De même, l'acquisition du fer de la transferrine chez *Streptococcus intermedius* est possible, car cette bactérie pathogène diminue rapidement le pH lors de sa croissance (122).

1.7 Acquisition du fer chez *P. gingivalis*

Quelques études ont déjà été réalisées ou sont présentement en cours concernant l'utilisation de la transferrine humaine comme source de fer chez *P. gingivalis*. En 1990, Barua et coll. (123) ont étudié les effets d'une restriction en fer chez *P. gingivalis*. Les quatre souches à l'étude se sont révélées incapables de croître dans un milieu déficient en

hémine ou protoporphyrine IX. De plus, Shah et coll. (124) ont démontré que *P. gingivalis* transporte la molécule entière d'hémine à l'intérieur de la cellule, et que par la suite le fer est extrait de l'anneau porphyrine. Selon cette étude, *P. gingivalis* requiert obligatoirement une source de porphyrine (125). Cependant, une autre étude a montré qu'en l'absence d'une source endogène de fer, la protoporphyrine IX ne supporte pas la croissance de *P. gingivalis* (126). Ceci suggère que l'atome de fer dans la molécule d'hémine est le constituant critique pour la croissance bactérienne.

L'addition d'un chélateur de fer au milieu de culture, soit le Desferal (chélateur d'ions ferriques; Fe^{3+}) ou le dipyridyl (chélateur d'ions ferreux; Fe^{2+}), affecte à différents niveaux la croissance de *P. gingivalis*. Le fer chélaté devient ainsi inaccessible pour les bactéries, puisque celles-ci ne possèdent pas de récepteur pour les sidérophores. Le Desferal à 12,5 μM produit une diminution de la croissance de 15% (123). L'augmentation de la concentration en Desferal dans le milieu ne produit aucune suppression additionnelle de la croissance bactérienne. Le dipyridyl à 200 μM produit une diminution de 75% de la croissance (123). Cependant, plus la concentration en dipyridyl est élevée dans le milieu de culture, plus la croissance est affectée pour être complètement inhibée à 300 μM et plus. L'inhibition produite par le dipyridyl peut être renversée par l'ajout d'ions ferreux, mais non ferriques au milieu (123). *P. gingivalis* semble donc capable d'utiliser uniquement les ions ferreux comme source de fer. Des résultats contradictoires ont été publiés concernant l'utilisation de sources inorganiques de fer pour la croissance de *P. gingivalis*, puisqu'une étude a démontré que les ions ferreux et ferriques peuvent supporter la croissance bactérienne (125).

Bramanti et coll. (125) ont étudié les effets de sources variées de fer sur la croissance de *P. gingivalis* W50. Des équivalents de l'hémine, comme l'hémoglobine, la myoglobine, l'albumine sérique saturée en hémine, la lactoperoxidase et le cytochrome *c* peuvent être utilisés comme source de fer par ce microorganisme (125). L'haptoglobine-hémoglobine et l'hémopexine-hémine supportent également la croissance de cette bactérie (125). Ceci suggère que *P. gingivalis* peut cliver ces protéines de l'hôte pour en acquérir le fer.

Des études non publiées ont été réalisées au laboratoire de D. Grenier sur la capacité de croissance de souches virulentes et non virulentes (dans un modèle animal) de *P. gingivalis* dans du sérum de cheval. L'utilisation de sérum implique normalement un effet bactéricide et bactériostatique sur la croissance bactérienne. L'effet bactéricide résulte de l'activité du complément, tandis que l'effet bactériostatique est du à la présence de protéines complexant le fer, comme la transferrine. *P. gingivalis* a déjà été reconnu comme résistant à l'activité bactéricide du sérum (126). Le sérum de cheval s'est avéré capable de supporter la croissance des souches virulentes, mais non celle des souches non virulentes. Cependant, un ajout d'hémine au sérum a permis la croissance des souches non virulentes. Ceci suggère que les souches non virulentes ne sont pas capables de combler leurs besoins en fer à partir des protéines du sérum et que la capacité d'acquisition du fer pourrait être un facteur clé pour la virulence de la bactérie.

La croissance de *P. gingivalis* dans un milieu contenant seulement la transferrine comme source de fer a déjà été brièvement étudiée (125, 127). L'apo-transferrine, forme non chargée en fer, ne supporte pas sa croissance, alors que la protéine chargée en fer, holo-transferrine, permet une croissance bactérienne. La croissance est donc dépendante de la concentration et du degré de saturation en fer de la transferrine.

1.8 Objectifs du projet

Le mécanisme par lequel *P. gingivalis* acquiert le fer de la transferrine n'est pas parfaitement clair. Tazaki et coll. (128) ont rapporté une activité de liaison spécifique et réversible de la transferrine à *P. gingivalis*. Une corrélation entre le degré de liaison à la transferrine et le temps de génération cellulaire a d'ailleurs pu être démontrée (128). Cette équipe de chercheurs suggère que la liaison de la transferrine à la surface des bactéries pourrait constituer une première étape dans l'acquisition du fer de l'hôte par ce microorganisme.

Les objectifs de la présente étude sont : premièrement, de confirmer que la transferrine représente une source de fer pour *P. gingivalis*, deuxièmement, de vérifier la présence ou non de mécanismes d'acquisition du fer déjà connus, et finalement, de démontrer l'importance des protéases de ce microorganisme dans l'acquisition du fer à partir de la transferrine humaine.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel

Les produits chimiques utilisés provenaient de chez Sigma Chemical Co. (St-Louis, Missouri), sauf lorsque spécifié.

2.2 Souches bactériennes et conditions de culture

Différentes souches de *P. gingivalis* ont été utilisées au cours de cette étude. Les tableaux 1 et 2 présentent les caractéristiques propres à chacune.

Tableau 1. Caractéristiques des souches sauvages de *P. gingivalis* utilisées au cours de l'étude

Souche	Provenance	Virulence dans un modèle animal ^a
33277	ATCC ^b	Non
381	Dr J. Slots ^c	Non
49417	ATCC	Oui
W50	Dr J. Slots	Oui
W83	Dr J. Slots	Oui

a. capacité à induire une infection lorsque les cellules sont injectées (sous-cutanées) dans la région de l'aîne chez le cochon d'Inde (129)

b. American Type Culture Collection

c. University of South California, Los Angeles, Californie

Tableau 2. Caractéristiques des mutants de *P. gingivalis* utilisés au cours de l'étude

Souche	Souche parentale	Type de mutation	Réf.
M1	33277	Spontanée	46
M2	33277	Spontanée	46
M3	33277	Spontanée	46
KDP112	33277	Dirigée sur les gènes de l'Arg-gingipaine 1 et 2	47
G102	381	Dirigée sur le gène de l'Arg-gingipaine 2	31
MT10	381	Dirigée sur le gène de l'Arg-gingipaine 1	42
49417NP	49417	Spontanée	Np ^a
W501	W50	Dirigée sur le gène de l'Arg-gingipaine 1	40
W50D7	W50	Dirigée sur le gène de l'Arg-gingipaine 2	48
V2296	W83	Dirigée sur le gène d'une protéase de 97 kDa	41
W83PM	W83	Dirigée sur le gène d'une protéase de 80 kDa	130

a. Non publié (isolat du laboratoire)

Le milieu THB (Todd Hewitt Broth; BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Maryland) additionné de vitamine K (1 µg/ml) et d'hémine (10 µg/ml) a été utilisé pour le maintien des différentes souches. Pour la culture sur milieu solide, le milieu THB a été supplémenté d'agar (15 g/l) et de sang humain (25 ml/l). Certaines souches mutées ont nécessité l'incorporation d'antibiotiques au milieu de culture afin d'assurer la conservation de la mutation. Pour les mutants W501 et W50D7, 5 µg/ml de clindamycine ont été ajoutés au milieu de culture. Les mutants G102 et MT10 ont nécessité l'ajout de 5 µg/ml d'érythromycine au milieu de culture, et le mutant KDP112, l'ajout de tétracycline à raison de 1 µg/ml de milieu de culture.

Les cultures bactériennes ont été incubées en anaérobiose (N₂/CO₂/H₂; 80/10/10) à 37 °C. Le transfert des différentes souches en milieu frais a été effectué aux deux jours pour les croissances en milieu liquide et hebdomadairement pour les croissances sur milieu solide.

2.3 Études de croissance des différentes souches de *P. gingivalis*

2.3.1 Milieu *Mycoplasma*

La croissance de *P. gingivalis* a été évaluée dans le milieu *Mycoplasma* Broth Base (MBB; BBL Microbiology Systems) additionné de vitamine K (1 µg/ml) et des divers composés énumérés plus bas.

La capacité des différentes souches à utiliser la transferrine comme source de fer a d'abord été testée. La croissance bactérienne a été évaluée dans le milieu MBB sans supplément et additionné d'hémine (10 µg/ml) ou de transferrine (1 mg/ml) comme source de fer. Le milieu MBB sans supplément constituait le milieu-contrôle négatif, alors que le milieu MBB additionné d'hémine représentait le milieu-contrôle positif. Les trois milieux ont été ensemencés à l'aide d'un inoculum de 1% (v/v) provenant d'une croissance de 24 h de chacune des souches à l'étude dans le milieu THB liquide. Les différentes cultures bactériennes ainsi obtenues ont ensuite été transférées à chaque intervalle de 24 h dans leur

milieu respectif en utilisant un inoculum de 1%. C'est l'arrêt de croissance dans le milieu MBB sans source de fer qui permettait de déterminer que les cellules bactériennes avaient épuisé leur réserve de fer. Une source de fer était considérée comme supportant la croissance de *P. gingivalis* lorsque la croissance se poursuivait pour au moins deux transferts suivant l'arrêt de croissance dans le milieu MBB sans source de fer.

Les cinétiques de croissance des souches parentales et des mutants de *P. gingivalis* dans le milieu MBB additionné de transferrine ont été comparées. Un inoculum de 2% provenant d'une croissance dans le milieu MBB sans source de fer, afin d'épuiser les réserves de fer des cellules, a été utilisé. Les croissances ont été suivies par mesure de la densité optique (D.O.) à 660 nm (Spectronic 20, Bausch & Lomb) à chaque intervalle de 12 h.

Enfin, la capacité des mutants spontanés M1 et M2 (déficients pour les activités Arg- et Lys-gingipaines) à croître dans le milieu MBB additionné de transferrine et d'une source de protéases a été évaluée. Pour ce faire, la trypsine pancréatique a été incorporée au milieu de culture à deux concentrations différentes soient 5 et 25 µg/ml.

2.3.2 Sérum humain

La capacité des différentes souches à croître dans du sérum humain (ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, Californie) a été évaluée. Pour les souches W50, W501 et W50D7, le sérum a été dilué 1:5 (dans l'eau distillée), alors que pour la souche 33277 et son mutant KDP112, le sérum a été dilué 1:10 (dans l'eau distillée). Un inoculum de 6% provenant d'une croissance de 24 h en milieu THB a été utilisé pour l'ensemencement. La D.O. des cultures bactériennes a été mesurée à 660 nm après 36 h de croissance.

Afin de supporter les résultats obtenus par mesure de la densité optique, le nombre d'unités formatrices de colonies (UFC) a été évalué par étalement sur gélose sang. La croissance des souches 33277 et KDP112 s'est effectuée dans le sérum humain, et après 36 h, des dilutions

d'une aliquote de ces cultures ont été préparées et étalées sur gélose sang. Le nombre d'UFC a ensuite été déterminé après une semaine d'incubation en anaérobiose à 37°C.

La croissance de la souche 33277 a également été évaluée dans le sérum humain inactivé. L'inactivation du sérum a été réalisée par passage de ce dernier à 56°C pendant 30 minutes.

Finalement, l'effet de l'ajout d'une source de fer au sérum humain sur la croissance de la souche 33277 a été étudié. L'hémine (10 µg/ml) ou le FeCl₃ (150 µM) ont donc été ajoutés au sérum humain, et la D.O. à 660 nm a été mesurée après 48 h de croissance.

2.4 Mise en évidence de mécanismes d'acquisition du fer

2.4.1 Activité de liaison de la transferrine aux cellules bactériennes

L'activité de liaison de la transferrine humaine aux cellules bactériennes fut mise en évidence grâce à la méthode de Schryvers (131). Les cellules de *P. gingivalis* 33277, *Prevotella nigrescens* ATCC 33563 (témoin positif) et *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 29522 (témoin négatif) ont été récoltées par centrifugation à 8000 g pendant 10 minutes (Centrifuge 5415C, Eppendorf) suite à une croissance de 24 h dans le milieu MBB, et resuspendues dans le tampon PBS contenant 50 mM PO₄ et 150 mM NaCl à pH 7,2. La D.O. à 660 nm des suspensions cellulaires a été ajustée à 2.

Des aliquotes de 5 µl des différentes suspensions cellulaires ont été déposées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario). La membrane a été laissée à l'air libre jusqu'à ce qu'elle soit sèche, puis immergée dans le tampon TBS (20 mM Tris-HCl et 500 mM NaCl; pH 7,5) contenant 3% de gélatine afin de bloquer les sites non occupés par les cellules bactériennes. La membrane a ensuite été incubée pendant 2 h dans le tampon TBS contenant 1,5% gélatine et 1 µg/ml de transferrine humaine conjuguée à la peroxidase de raifort (HRP-Tf; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pennsylvanie). Quatre lavages de 15 minutes ont ensuite été effectués à l'aide du tampon

TTBS, tampon TBS contenant 0,05% de Tween-20 (Bio-Rad Laboratories), afin d'éliminer la transferrine liée non spécifiquement à la membrane.

La révélation s'est effectuée en plaçant la membrane dans une solution contenant le substrat pour la peroxidase. La solution de développement était constituée d'une première solution contenant 30 mg de HRP color development (Bio-Rad Laboratories) dissout dans 10 ml de méthanol froid et d'une deuxième solution comportant 30 μ l de peroxyde d'hydrogène à 30% mélangé à 50 ml de tampon TBS. Les deux solutions précédentes ont été mélangées au dernier instant. Un résultat positif se traduisait par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où les cellules avaient été préalablement déposées.

2.4.2 Production de sidérophores

La méthode de Lindsay et Riley (132) fut utilisée pour la détection de sidérophores. Cette méthode permet de détecter les sidérophores par leur capacité à capter le fer d'un chélateur relativement faible, soit le Chrome Azurol S (CAS). La capture du fer lié au CAS par le sidérophore se traduit par un changement de coloration du bleu au rose quantifiable par mesure de l'absorbance à 650 nm.

Le milieu de culture utilisé a d'abord été traité au Chelex-100 afin d'éliminer toute trace de fer. Pour ce faire, 30 g de Chelex-100 ont été ajoutés à un litre de milieu de culture et le mélange a été agité pendant deux heures. Après agitation, le milieu de culture a été récolté par décantation. L'utilisation de ce milieu a requis un lavage de la verrerie au chlorure d'hydrogène 6 N.

Le surnageant de culture de *P. gingivalis* 33277 a été récolté par centrifugation après 24 h de croissance dans le milieu MBB traité au Chelex-100. Il a par la suite été incubé en présence d'un volume égal de la solution CAS. Un sidérophore commercial, le ferrichrome (0,33 mg/ml), a servi de témoin positif.

Une électrophorèse en présence d'urée (voir section 2.9.2) a également permis d'évaluer la production de sidérophores par *P. gingivalis*. Tout d'abord, les cellules et le surnageant de culture de *P. gingivalis* 33277 ont été récoltés par centrifugation suite à une croissance de 24 h dans le milieu MBB sans source de fer. Les cellules ont été resuspendues à une D.O. de 0,5 à 660 nm dans le tampon Tris 50 mM à pH 7,2. La suspension cellulaire ou le surnageant de culture ont été incubé pendant 15 minutes à 37°C en présence de volumes égaux de holo-transferrine (2 mg/ml) et d'un inhibiteur de cystéine-protéases, l'iodoacetamide (10 mM). L'essai contenant la suspension cellulaire a par la suite été centrifugé afin d'éliminer les cellules bactériennes. Enfin, le surnageant de ce dernier essai de même que celui de l'essai incluant le surnageant de culture ont été soumis à une électrophorèse en présence d'urée. Une quantité de 7,5 µg de protéine a été déposée dans chaque puits. Ce type d'électrophorèse permet de différencier, par leur distance de migration, la transferrine chargée en fer ou non chargée.

2.4.3 Activité réductase du fer ferrique

La méthode mise au point par Morrissey et coll. (116) et légèrement modifiée fut utilisée pour détecter l'activité réductase du fer ferrique. L'activité réductase fut testée chez les cellules et dans le surnageant de culture de *P. gingivalis* 33277 en conditions d'incubation aérobies et anaérobies.

En aérobie, les cellules et le surnageant de culture ont été récoltés par centrifugation d'une culture bactérienne de 24 h en milieu MBB sans source de fer. Les cellules ont été resuspendues à une D.O. à 660 nm de 1,25 dans du tampon 50 mM citrate de sodium contenant 5% glucose à pH 6,5. À cette suspension cellulaire, 1 mM de FeCl₃ et 1 mM d'acide bathophénanthroline disulfonique (BPS) ont été ajoutés. L'essai a été incubé à 30°C pendant 10 minutes. Les cellules ont ensuite été éliminées par centrifugation et l'absorbance du surnageant du mélange réactionnel a été mesurée à 520 nm à l'aide du spectrophotomètre (Spectronic 601, Miton Roy). L'activité des cellules de *Candida albicans* Cal 4, obtenues après une croissance de 24 h en milieu YEPD (1% extrait de

levure, 2% bactopeptone, 2% glucose), a servi de témoin positif. Le surnageant de culture de *P. gingivalis* obtenu par centrifugation a été oxygéné par barbotage à l'aide d'air comprimé pendant une heure, afin d'éliminer les conditions anaérobies. Par la suite, une quantité égale de tampon citrate de sodium, de FeCl_3 1 mM et de BPS 1 mM ont été ajoutés au surnageant de culture. L'essai a été incubé à 30°C pendant 10 minutes, puis l'absorbance à 520 nm a été mesurée.

Afin d'évaluer l'impact des conditions anaérobies sur la détection de l'activité réductase, les mêmes essais qu'en conditions aérobie ont été réalisés avec quelques modifications. Dès leur récolte, les cellules ont été resuspendues dans le tampon citrate de sodium préalablement réduit par une incubation de 24 h dans la chambre anaérobie. De plus, le surnageant de culture a été testé immédiatement après sa sortie des conditions d'anaérobiose.

Une analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'urée (voir section 2.9.2) de la transferrine incubée en présence des cellules ou du surnageant de culture de *P. gingivalis* a également permis de détecter la présence d'activité réductase (même essai qu'à la section 2.4.2).

2.4.4 Activité protéolytique

Ce mécanisme d'acquisition du fer implique l'action de protéases sur des protéines plasmatiques, telles la transferrine. La capacité de *P. gingivalis* à dégrader la transferrine humaine a donc été vérifiée de deux façons, suite à une croissance en présence de la protéine, de même que par une incubation *in vitro* des cellules et de la protéine.

2.4.4.1 Dégradation de la transferrine suite à une croissance bactérienne

Les surnageants de culture des différentes souches de *P. gingivalis* ont été récoltés par centrifugation après 11 ou 24 h de croissance dans le milieu MBB additionné de

transferrine. Par la suite, ils ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE, voir section 2.9.1). Une quantité de 1 µg de protéine a été déposée dans chaque puits.

2.4.4.2 Dégradation de la transferrine *in vitro*

Les cellules des différentes souches de *P. gingivalis* ont d'abord été récoltées par centrifugation de cultures de 24 h de croissance dans le milieu MBB additionné d'hémine, puis resuspendues dans le tampon PBS à une D.O. à 660 nm de 0,5. Par la suite, les suspensions cellulaires ont été incubées en présence de transferrine (0,33 mg/ml) et d'un agent réducteur, le dithiothréitol (DTT; 3,3 mM). Ces essais ainsi réalisés furent incubés à 37°C pendant différentes périodes de temps, soient 2, 4 et 6 h. Les surnageants de ces essais ont ensuite été recueillis par centrifugation et analysés par électrophorèse SDS-PAGE (voir section 2.9.1). Une quantité de 3,3 µg de protéine a été déposée dans chaque puits.

2.5 Activités Arg- et Lys-gingipaines

Les deux principales activités protéolytiques chez *P. gingivalis*, soit Arg-gingipaine et Lys-gingipaine, ont été déterminées chez les différentes souches. Pour ce faire, les cellules et les surnageants de culture ont été testés quant à leur capacité à hydrolyser le N α -Benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) et le N α -Benzoyl-DL-lysine-*p*-nitroanilide (BLPNA), substrats de Arg- et de Lys-gingipaine respectivement.

Les surnageants de culture furent obtenus par centrifugation d'une culture de 24 h dans le milieu MBB additionné d'hémine. Ils ont par la suite, été incubés en présence de 1 mM BAPNA ou 1 mM BLPNA, pour l'évaluation de l'activité Arg- ou Lys-gingipaine respectivement, et 1 mM DTT. Le BAPNA et le BLPNA ont été dissous dans du diméthyl sulfoxyde 10% (DMSO), et le DTT, dans du tampon PBS. Les essais ont été incubés à 37°C pendant 4,5 h. L'intensité de l'hydrolyse de ces deux substrats chromogéniques a pu être

évaluée grâce à la mesure de l'absorbance à 405 nm. En effet, lorsque ces deux substrats sont hydrolysés, le *p*-nitroaniline, un composé de couleur jaune, est largué.

Les cellules des différentes souches ont été récoltées par centrifugation d'une culture de 24 h dans le milieu MBB additionné d'hémine. Elles ont été resuspendues dans le tampon PBS et ajustées à la D.O. désirée à 660 nm. Pour la mesure de l'activité Arg-gingipaine, les cellules à une D.O. de 0,5 ont été incubées en présence de volumes égaux de BAPNA 0,5 mM et de DTT 5 mM ; tandis que pour l'évaluation de l'activité Lys-gingipaine, les cellules à D.O. de 1 ont été incubées en présence de volumes égaux de BLPNA 0,5 mM et de DTT 5 mM. Les différents essais ont été incubés à 37°C pendant 3 h. L'absorbance à 405 nm a été mesurée sur les surnageants de ces essais recueillis après centrifugation.

2.6 Détection de fragments de transferrine s'attachant aux cellules

Afin de déterminer si une liaison de fragments de transferrine aux cellules de *P. gingivalis* 33277 survient suite à la dégradation de cette protéine, une analyse par western immunoempreinte a été effectuée.

Tout d'abord, les cellules ont été récoltées par centrifugation d'une culture de 24 h dans le milieu MBB sans source de fer et resuspendues à une D.O. de 2 à 660 nm dans le tampon PBS. Des quantités égales de cette suspension cellulaire, de DTT 10 mM et de transferrine (1 mg/ml) ont été mélangées, et le mélange réactionnel a été incubé à 37°C pendant 6 h. Par la suite, les cellules ont été récoltées par centrifugation et resuspendues dans du tampon de solubilisation (voir section 2.9.1).

Les cellules et le surnageant de cet essai ont été soumis à une électrophorèse SDS-PAGE (voir section 2.9.1). Ensuite, les protéines présentes dans le gel de polyacrylamide ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. Le transfert électrophorétique s'est effectué à 100 volts pendant 1 h.

La membrane a ensuite été immergée pendant 1 h dans le tampon TBS contenant 3% de gélatine, afin de bloquer les sites non occupés. Puis, la membrane a été transférée pour une période de 2 h dans le tampon TTBS contenant 2 µg/ml d'un anticorps de chèvre dirigé contre la transferrine humaine et conjugué à la peroxidase (ICN Biomedicals inc., Aurora, Ohio). Deux lavages successifs de 15 minutes dans le tampon TTBS ont été effectués avant de placer la membrane de nitrocellulose en présence du substrat pour la peroxidase pour permettre le développement de la coloration. La technique utilisée pour la révélation fut la même que celle de la section 2.4.1.

2.7 Effet de l'ajout d'inhibiteurs sur la croissance et la dégradation de différents substrats

2.7.1 Inhibiteurs de glycosidases

L'effet de différents inhibiteurs de glycosidases sur la dégradation de la transferrine par *P. gingivalis* 33277 a été évalué. Tout d'abord, les cellules bactériennes ont été récoltées par centrifugation d'une culture de 24 h dans le milieu MBB additionné d'hémine et resuspendues à une D.O. à 660 nm de 0,5 dans le tampon PBS. Dix µl de cette suspension cellulaire ont été incubés en présence de 5 µl de DTT 20 mM, de 5 µl de transferrine 1 mg/ml et de 10 µl d'un inhibiteur de glycosidases. Le tableau 3 présente les inhibiteurs et les concentrations utilisés lors des essais. Les différents essais furent incubés pendant 6 h à 37°C. Par la suite, les surnageants de ces essais furent analysés par électrophorèse SDS-PAGE (voir section 2.9.1).

2.7.2 Inhibiteurs de protéases

2.7.2.1 Dégradation de différents substrats

L'effet de différents inhibiteurs de protéases fut testé sur la dégradation de la transferrine par *P. gingivalis* 33277, ainsi que sur les activités Arg- et Lys-gingipaines de cette même

Tableau 3. Inhibiteurs de glycosidases utilisés

Inhibiteur	Glycosidases cibles	Concentration testée
Acétamide	Glucosaminidases	100 mM
Acide dehydro-2deoxy-N-acetyl-neuraminique	Neuraminidases	50 mM
N-acetyl-D-glucosamine	Glucosaminidases	100 mM
Acide N-acetyl-neuraminique	Neuraminidases	100 mM

souche. Différentes concentrations d'inhibiteurs ont donc été ajoutés aux essais déjà établis. Le tableau 4 présente les inhibiteurs et les concentrations testés.

Pour déterminer l'effet des inhibiteurs sur la dégradation de la transferrine, les mêmes essais qu'à la section 2.7.1 furent utilisés. Pour l'évaluation de l'effet des inhibiteurs sur l'activité Arg-gingipaine, l'essai fut composé de : 100 μ l de cellules (D.O.= 0,5 à 660 nm), de 25 μ l de DTT 60 mM, de 75 μ l de BAPNA 2 mM et de 100 μ l d'inhibiteur. Pour l'activité Lys-gingipaine, le même essai que précédemment fut utilisé en utilisant une suspension cellulaire à une D.O. de 1 à 660 nm. L'absorbance des surnageants de tous les essais fut mesurée à 405 nm.

2.7.2.2 Croissance en présence de transferrine

L'effet de différents inhibiteurs de cystéine-protéases fut évalué sur la croissance de *P. gingivalis* 33277 et KDP112 en présence de transferrine comme source de fer. Pour ce faire, les inhibiteurs testés soient TLCK, FPRCK, leupeptin et antipain ont été ajoutés à raison de 200 μ g/ml au milieu MBB additionné de transferrine ou d'hémine comme source de fer. Le milieu MBB sans supplément a servi de témoin négatif, tandis que celui additionné d'hémine a servi de témoin positif. Les différents milieux ont étéensemencés avec un inoculum de 2% provenant d'un deuxième transfert en milieu MBB sans supplément, afin d'épuiser les réserves de fer des cellules bactériennes. Les résultats ont été notés suite à une incubation de 48 h.

2.8 Effet de l'ajout de sérum sur les activités protéolytiques

2.8.1 Activités Arg- et Lys-gingipaines

L'impact de la présence du sérum humain sur l'hydrolyse du BAPNA et du BLPNA par les cellules de différentes souches de *P. gingivalis* a été évalué. Les souches testées furent 33277, KDP112, W50, W501 et W50D7.

Tableau 4. Inhibiteurs de protéases utilisés

Inhibiteur	Protéases cibles	Concentration testée
4-(2-aminoethyl)-benzene sulfonyl fluoride (AEBSF)	Sérine	10 mM
Ac-Arg-CH ₂ Cl ^a	Cystéine	8 mM
Antipain	Cystéine	10 mM
Bestatin	Métallo	0,16 mM
Cystatin	Cystéine	0,0001 mM
Diisopropyl fluorophosphate (DFP)	Sérine	10 mM
D-Phe-Pro-Arg chloromethyl ketone (FPRCK)	Cystéine	1 mM
E-64 ^b	Cystéine	1 mM
Éthylenediaminetetra-acetic acid (EDTA)	Métallo	10 mM
Iodoacétamide	Cystéine	10 mM
Leupeptin	Cystéine	1 mM
<i>N</i> - α - <i>p</i> -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK)	Cystéine	8 mM
<i>p</i> -chloromercuriphenylsulfonic acid (PCMP)	Cystéine	8 mM
Pepstatin	Aspartique	0,18 mM

a. Biosyn Diagnostics, Belfast Northern, Ireland

b. Bachem California Inc., Torrance, California

Les essais furent les mêmes qu'à la section 2.5 en incluant toutefois une certaine quantité de sérum humain (45 μ l pour un essai comportant un volume total de 150 μ l).

2.8.2 Dégradation de la transferrine

La dégradation par *P. gingivalis* 33277 de la transferrine présente dans le sérum humain a été évaluée. Tout d'abord, les cellules ont été récoltées par centrifugation d'une culture de 24 h dans le milieu MBB sans source de fer, et resuspendues à une D.O. à 660 nm de 1 dans le tampon PBS. Des quantités égales de cette suspension cellulaire, de sérum humain dilué (1 :2) et de DTT 10 mM ont été incubés à 37°C pour des périodes de 2, 4 et 6 h. Les surnageants de ces essais ont ensuite été analysés par électrophorèse SDS-PAGE (voir section 2.9.1), suivi d'un western immunoempreinte. Une quantité de protéine de 0,5 μ g a été déposée dans chaque puits. Un anticorps anti-transferrine a permis la visualisation de la transferrine sur la membrane de nitrocellulose (voir section 2.6).

2.9 Électrophorèses

2.9.1 En présence de dodécyl sulfate de sodium

Toutes les électrophorèses ont été effectuées sur des gels de polyacrylamide de dimension 8 x 5 cm et 0,75 cm d'épaisseur avec le Mini-Protean de Bio-Rad Laboratories. La méthode utilisée fut celle décrite par Laemmli (133). Les gels de résolution étaient constitués de 10% de polyacrylamide et les gels d'empilement, de 4%. Les migrations se sont déroulées à un voltage constant de 200 volts pendant environ 45 minutes.

Le tampon de solubilisation a été préparé comme suit : 2 ml d'une solution de dodécyl sulfate de sodium (SDS) 10%, 2 ml de glycérol, 1,25 ml de tampon 0,5 M Tris pH 6,8, 1 ml d'une solution de bleu de bromophénol 0,05%, 0,5 ml de β -mercaptoéthanol et 3,25 ml d'eau distillée.

2.9.2 En présence d'urée

Pour vérifier le niveau de saturation en fer de la transferrine, une électrophorèse en conditions non dénaturantes sur gel de polyacrylamide en présence d'urée 6 M a été effectuée selon la méthode de Wolz (115) avec cependant quelques modifications.

Le gel de résolution a été préparé comme suit : 4,5 g d'urée, 625 μ l de TBE 20X (tris 2 M, acide borique 0,2 M, EDTA 0,032 M; pH 8,4) et 2,7 ml d'une solution d'acrylamide 2,6% C-30% T (Bio-Rad Laboratories) ont été mélangés. Le volume a été ajusté à 12,5 ml avec de l'eau distillée. Ce gel a été polymérisé avec 63 μ l d'une solution d'ammonium persulfate 10% (Bio-Rad Laboratories) et 7 μ l de Temed (Bio-Rad Laboratories). Le gel d'empilement a été constitué de : 1,3 ml de la solution d'acrylamide 2,6% C-30% T, 1,3 ml de TBE 20X, 6,1 ml d'eau distillée, 22 μ l de la solution d'ammonium persulfate 10% et 4,5 μ l de Temed. Les différents échantillons à analyser ont été déposés sur gel en présence d'un tampon d'équilibration composé de 1 g de glycérol, 400 μ l d'une solution de bleu de bromophénol 0,5% et 4,8 ml de TBE 20X.

L'électrophorèse a utilisé le TBE 1X comme tampon de migration à 100 volts (voltage constant) et s'est effectuée pendant 3,5 h.

2.9.3 Marqueurs de poids moléculaire et coloration des gels

Le tableau 5 présente la composition du mélange de marqueurs de poids moléculaire utilisés (Bio-Rad Laboratories). La visualisation des protéines sur gels a été effectuée par coloration au bleu de Coomassie.

Tableau 5. Composition du mélange de marqueurs de poids moléculaire

Protéine	Poids moléculaire (kDa)
Myosin	203
β -galactosidase	118
Bovine serum albumin	86
Ovalbumin	51,6
Carbonic anhydrase	34,1
Soybean trypsin inhibitor	29
Lysosyme	19,2
Aprotinin	7,5

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Utilisation de la transferrine comme source de fer par *P. gingivalis*

La croissance de différentes souches de *P. gingivalis* a été évaluée dans le milieu MBB additionné de transferrine humaine comme seule source de fer. Le témoin négatif était constitué du milieu MBB sans source de fer, et le témoin positif, du même milieu additionné d'hémine comme source de fer. Le tableau 6 résume les résultats obtenus. Toutes les souches de *P. gingivalis*, reconnues comme infectieuses ou non dans un modèle animal, se sont avérées capables d'utiliser la transferrine comme source de fer. Le milieu MBB sans source de fer n'a pu permettre la croissance de *P. gingivalis*, tandis que le milieu MBB supplémenté d'hémine a permis la croissance de toutes les souches.

Tableau 6. Croissance de différentes souches de *P. gingivalis* dans le milieu MBB supplémenté ou non d'une source de fer

Souche ^a	Supplément au milieu		
	Aucun	Transferrine	Hémine
33277	- ^b	+ ^c	+
381	-	+	+
49417	-	+	+
W50	-	+	+
W83	-	+	+

a. pathogénicité des souches indiquée au tableau 1

b. arrêt de croissance suivant 1 à 4 transferts

c. croissance pour au moins deux transferts additionnels suivant l'arrêt de croissance dans le milieu sans source de fer

3.2 Mise en évidence du mécanisme d'acquisition du fer chez *P. gingivalis* 33277

Pour être en mesure d'utiliser la transferrine comme source de fer, *P. gingivalis* doit posséder au moins un mécanisme d'acquisition du fer. Les principaux mécanismes connus à ce jour ont donc été étudiés en utilisant une culture de *P. gingivalis* dans le milieu MBB sans source de fer, lequel permet la croissance pour environ deux transferts.

3.2.1 Activité de liaison de la transferrine aux cellules bactériennes

La méthode antérieurement décrite par Schryvers (131) fut utilisée pour la mise en évidence d'une activité de liaison de la transferrine chez *P. gingivalis* 33277. *Prevotella nigrescens* ATCC 33563 a servi de témoin positif, tandis que *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 29522, de témoin négatif. La figure 5 montre les résultats obtenus. Les cellules de *P. gingivalis* n'ont démontré aucune activité de liaison de la transferrine, tout comme celles de *A. actinomycetemcomitans*. Au contraire, les cellules de *P. nigrescens* se sont avérées capables de lier la transferrine.

3.2.2 Production de sidérophores

La méthode de Lindsay et Riley (132) fut utilisée pour détecter la production de sidérophores par *P. gingivalis*. Cet essai est basé sur la capacité des sidérophores à capter le fer d'un chélateur relativement faible, soit le Chrome Azurol S (CAS). La capture du fer lié au CAS par le sidérophore se traduit par un changement de coloration. Les résultats obtenus ont montré une absence de sidérophore dans le surnageant de culture de *P. gingivalis* 33277, tandis que le ferrichrome a démontré une importante activité sidérophore (données non montrées).

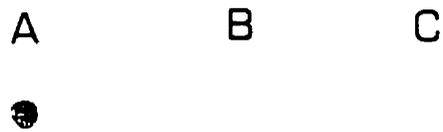


Figure 5. Activité de liaison de la transferrine chez trois espèces bactériennes. A. *P. nigrescens*; B. *A. actinomycetemcomitans*; C. *P. gingivalis*

3.2.3 Activité réductase du fer ferrique

La présence d'une activité réductase fut déterminée en utilisant la méthode décrite par Morrissey (116) qui est basée sur une augmentation de l'absorbance à 520 nm suite à la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} . Les cellules et le surnageant de culture de *P. gingivalis* 33277 obtenus après croissance dans le milieu MBB ont été testés dans des conditions aérobies et anaérobies. Les cellules de *C. albicans* Cal 4 ont servi de témoin positif. Le tableau 7 présente les résultats obtenus. Ceux-ci démontrent que sous des conditions aérobies, les cellules et le surnageant de culture de *P. gingivalis* ne possédaient pas d'activité réductase du fer ferrique. Au contraire, les cellules de *C. albicans* ont réduit le Fe^{3+} en Fe^{2+} . Lorsque l'essai fut réalisé en conditions d'anaérobiose, le surnageant de culture de *P. gingivalis*, mais non les cellules bactériennes, a entraîné une réduction du fer ferrique en fer ferreux.

3.2.4 Capture du fer de la transferrine

Dans le but de confirmer l'absence, chez *P. gingivalis*, d'une activité réductase du fer ferrique et d'une production de sidérophores, une seconde méthode a été utilisée. Ainsi, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'urée a été réalisée, après avoir incubé les cellules ou le surnageant de culture de *P. gingivalis* 33277 en présence d'holo-transferrine (protéine chargée en fer). Ce type d'électrophorèse permet de différencier la transferrine selon que la protéine est chargée en fer ou non. Les résultats, présentés à la figure 6, ont démontré que ni les cellules ni le surnageant de culture de *P. gingivalis* 33277 ne captaient le fer de la transferrine suite à une incubation *in vitro*. Ces observations confirment donc l'absence d'une activité réductase et d'une production de sidérophores chez ce microorganisme.

3.2.5 Activité protéolytique

Pour mettre en évidence la contribution possible des protéases de *P. gingivalis* dans l'acquisition du fer de la transferrine, la capacité des cellules à dégrader cette protéine plasmatique a été évaluée. Les cellules bactériennes ont été incubées en présence de

Tableau 7. Activité réductase du fer ferrique chez *P. gingivalis* en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose

Fraction bactérienne	Absorbance à 520 nm (essai 1/essai 2)	
	Aérobiose	Anaérobiose
Cellules de <i>P. gingivalis</i> 33277	0,057/0,076	0,042/0,055
Surnageant de <i>P. gingivalis</i> 33277	0,083/0,040	0,375/0,366
Cellules de <i>C. albicans</i> Cal 4	0,163/0,214	ND ^a

a. non déterminé



Figure 6. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'urée de la holo-transferrine incubée en présence des cellules ou du surnageant de *P. gingivalis* 33277. A. Témoin d'apo-transferrine (forme sans fer); B. Témoin d'holo-transferrine (forme chargée en fer); C. Holo-transferrine incubée en présence des cellules; D. Holo-transferrine incubée en présence du surnageant de culture

tranferrine pendant différentes périodes de temps, puis la dégradation de la transferrine a été évaluée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. La figure 7 illustre clairement que *P. gingivalis* 33277 a dégradé la transferrine avec production de fragments de plus faible poids moléculaire, en fonction du temps d'incubation. Le poids moléculaire des principaux fragments obtenus est estimé à 44, 50 et 53 kDa.

3.3 Analyse comparative d'activités protéolytiques et de croissance chez différentes souches parentales et mutées de *P. gingivalis*

3.3.1 Activité Arg-gingipaine et Lys-gingipaine

Les deux principales activités protéolytiques de *P. gingivalis* soient Arg- et Lys-gingipaines ont été mesurées chez les différentes souches à l'étude. Pour ce faire, les cellules et les surnageants de culture ont été testés quant à leur capacité à hydrolyser le Bapna et le Blpna, substrats synthétiques de l'Arg- et de la Lys-gingipaine respectivement. L'intensité de la dégradation de ces deux substrats chromogéniques a pu être évaluée grâce à une mesure de l'absorbance à 405 nm. En effet, lorsque ces deux substrats sont hydrolysés, le *p*-nitroaniline, un composé de couleur jaune, est produit.

Les tableaux 8 et 9 résument les résultats obtenus. Une valeur arbitraire de 100 a été assignée pour les activités Arg- et Lys-gingipaines mesurées chez chacune des souches parentales. Les activités des mutants ont été établies en fonction de leur souche parentale respective. En général, les cellules ont démontré une plus grande activité protéolytique que les surnageants de culture ($A_{405\text{nm}} = 0,692$ pour les cellules de la souche 33277 et $A_{405\text{nm}} = 0,179$ pour le surnageant de culture de 33277). Les cellules entières ont donc été principalement utilisées au cours de l'étude.

Pour les surnageants de culture, celui du mutant spontané M3 a démontré une activité Arg-gingipaine supérieure à sa souche parentale 33277, tandis que celui du mutant dirigé KDP112 a révélé une activité Lys-gingipaine supérieure à celle de la souche parentale

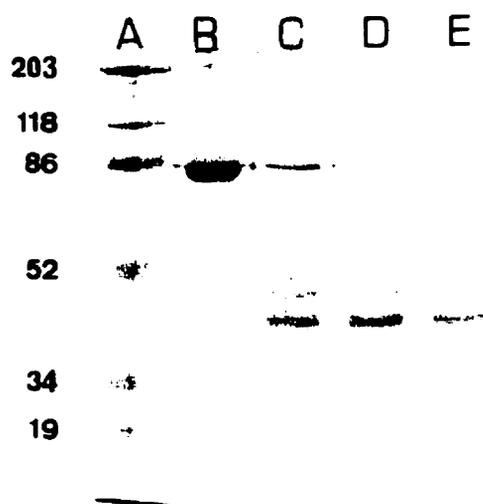


Figure 7. Analyse par SDS-PAGE de la dégradation de la transferrine par *P. gingivalis* 33277. A. Marqueurs de poids moléculaires en kDa; B. Contrôle transferrine; C. Incubation de 2 h des cellules avec la transferrine; D. Incubation de 4 h des cellules avec la transferrine; E. Incubation de 6 h des cellules avec la transferrine

Tableau 8. Activité Arg-gingipaine et Lys-gingipaine des surnageants de culture des différentes souches parentales et mutées de *P. gingivalis*

Souche	% Activité (essai 1/essai 2)	
	Arg-gingipaine ^a	Lys-gingipaine ^b
33277	100 (A_{405nm} = 0,179)	100 (A_{405nm} = 0,042)
M1	30/40	80/80
M2	90/70	80/60
M3	500/400	40/ND
KDP112	20/30	540/560
381	100 (A_{405nm} = 0,163)	100 (A_{405nm} = 0,075)
G102	50/30	0/20
MT10	40/20	0/0
49417	100 (A_{405nm} = 0,442)	100 (A_{405nm} = 0,042)
49417NP	20/20	70/ND
W50	100 (A_{405nm} = 0,135)	100 (A_{405nm} = 0,059)
W501	60/60	80/80
W50D7	60/60	90/110
W83	100 (A_{405nm} = 0,237)	100 (A_{405nm} = 0,169)
V2296	60/ND	30/50
W83PM	70/ND	30/60

a. déterminé par mesure (A_{405nm}) de l'hydrolyse du substrat BAPNA

b. déterminé par mesure (A_{405nm}) de l'hydrolyse du substrat BLPNA

Tableau 9. Activités Arg-gingipaine et Lys-gingipaine des cellules des différentes souches parentales et mutées de *P. gingivalis*

Souche	% Activité (essai 1/essai 2)	
	Arg-gingipaine ^a	Lys-gingipaine ^b
33277	100 (A_{405nm} = 0,692)	100 (A_{405nm} = 0,575)
M1	10/10	10/10
M2	30/40	0/10
M3	100/110	0/0
KDP112	0/0	80/90
381	100 (A_{405nm} = 0,866)	100 (A_{405nm} = 0,856)
G102	100/100	0/0
MT10	100/100	100/90
49417	100 (A_{405nm} = 0,445)	100 (A_{405nm} = 0,210)
49417NP	20/30	20/10
W50	100 (A_{405nm} = 0,711)	100 (A_{405nm} = 0,718)
W501	100/130	110/110
W50D7	20/30	110/120
W83	100 (A_{405nm} = 0,157)	100 (A_{405nm} = 0,660)
V2296	60/ND	80/70
W83PM	80/80	110/120

a. déterminé par mesure (A_{405nm}) de l'hydrolyse du substrat BAPNA

b. déterminé par mesure (A_{405nm}) de l'hydrolyse du substrat BLPNA

33277. Les surnageants de culture des mutants G102 et MT10, quant à eux, ne possédaient aucune activité Lys-gingipaine. En ce qui à trait aux autres mutants, leurs surnageants de culture présentaient des pourcentages d'activités Arg- et Lys-gingipaine inférieurs à leur souche parentale respective.

Les cellules des mutants spontanés M1, M2 et 49417NP n'ont démontré qu'un très faible niveau d'activités Arg- et Lys-gingipaines. Les mutants dirigés KDP112 et G102, quant à eux, ne possédaient plus l'activité Arg-gingipaine et Lys-gingipaine, respectivement. Les cellules du mutant spontané M3 ont démontré un niveau d'activité Arg-gingipaine similaire à celui de la souche 33277, alors que leur niveau d'activité Lys-gingipaine s'est avéré nul. Le mutant W50D7 a démontré un faible taux d'activité Arg-gingipaine. En ce qui a trait aux autres mutants, les niveaux d'activités Arg- et Lys-gingipaines de leurs cellules se sont avérés comparables, parfois légèrement inférieurs ou supérieurs, à ceux de leur souche parentale.

3.3.2 Croissance en présence de transferrine comme source de fer

La croissance des différentes souches mutées de *P. gingivalis* a été vérifiée dans le milieu MBB additionné de transferrine comme seule source de fer. Le témoin négatif était constitué du milieu MBB sans source de fer, et le témoin positif, du même milieu additionné d'hémine comme source de fer. Les résultats, présentés au tableau 10, montrent que tous les mutants ont pu utiliser la transferrine comme source de fer, à l'exception des mutants spontanés M1, M2 et 49417NP.

3.3.3 Dégradation de la transferrine

La capacité des cellules entières des différentes souches parentales et mutées de *P. gingivalis* à dégrader la transferrine a été évaluée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Lorsqu'incubées en présence de la transferrine, toutes les souches testées se sont avérées capables de dégrader la protéine, exception faite des mutants spontanés M1, M2 et 49417NP (Tableau 11). Les profils de dégradation de la transferrine ont cependant

Tableau 10. Croissance de différentes souches parentales et mutées de *P. gingivalis* dans le milieu MBB supplémenté ou non d'une source de fer

Souche	Supplément au milieu		
	Aucun	Transferrine	Hémine
33277	- ^a	+ ^b	+
M1	-	-	+
M2	-	-	+
M3	-	+	+
KDP112	-	+	+
381	-	+	+
G102	-	+	+
MT10	-	+	+
49417	-	+	+
49417NP	-	-	+
W50	-	+	+
W501	-	+	+
W50D7	-	+	+
W83	-	+	+
V2296	-	+	+
W83PM	-	+	+

a. arrêt de croissance suivant 1 à 4 transferts

b. croissance pour au moins deux transferts additionnels suivant l'arrêt de croissance dans le milieu sans source de fer

Tableau 11. Dégradation de la transferrine par les cellules des différentes souches de *P. gingivalis*

Souche	Dégradation de la transferrine ^a
33277	+ ^b
M1	- ^c
M2	-
M3	+
KDP112	+
381	+
G102	+
MT10	+
49417	+
49417NP	-
W50	+
W501	+
W50D7	+
W83	+
W83PM	+
V2296	+

a. déterminé par analyse SDS-PAGE de la transferrine incubée en présence des cellules entières

démontré des différences au niveau des fragments générés entre les différentes souches parentales de *P. gingivalis*, de même qu'entre une souche parentale et ses mutants (données non montrées).

Afin d'établir un lien entre la capacité à croître en présence de transferrine comme source de fer et la dégradation de celle-ci, les surnageants de culture obtenus suite à une première croissance des différentes souches dans le milieu MBB additionné de transferrine ont été analysés par SDS-PAGE. Les figures 8, 9, 10 et 11 illustrent les résultats obtenus.

Les résultats démontrent clairement que toutes les souches sauvages de *P. gingivalis* dégradent la transferrine lors de la croissance. Les quelques différences obtenues entre le profil de dégradation de la transferrine par la souche 33277 aux figures 8 et 10 sont dues au fait que les surnageants n'ont pas été récoltés exactement au même stade de la croissance. Les mutants M1 et M2 n'ont pas été en mesure de dégrader la transferrine significativement, de même que le mutant 49417NP qui n'a entraîné qu'une dégradation partielle de la protéine. Toutes les autres souches mutantes ont dégradé la transferrine et généré différents fragments.

3.4 Analyse détaillée de la dégradation et de l'utilisation de la transferrine par *P. gingivalis*

3.4.1 Détermination de l'effet du niveau de saturation en fer de la transferrine sur sa susceptibilité à la dégradation protéolytique

Dans le but de vérifier si le niveau de saturation en fer de la transferrine modifie sa susceptibilité vis-à-vis *P. gingivalis* 33277, une comparaison de la dégradation de l'apo-transferrine (forme non chargée en fer) à celle de l'holo-transferrine (forme chargée en fer) a été effectuée. Les analyses par SDS-PAGE et Western immunoempreinte n'ont révélé aucune différence notable entre les deux types de transferrine (données non montrées).

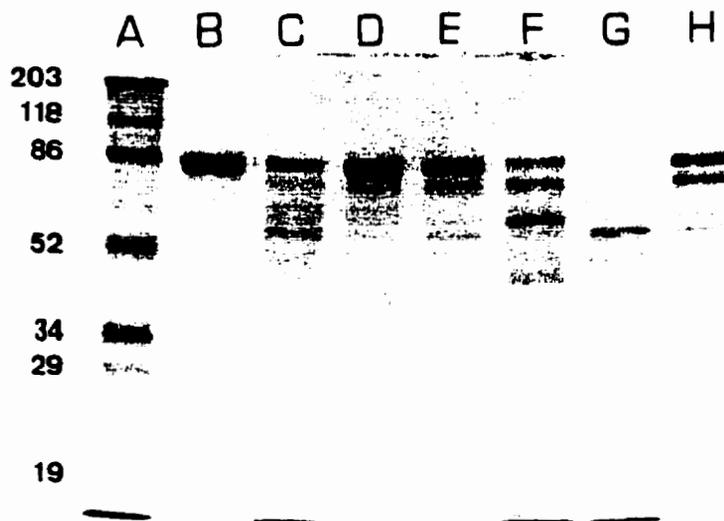


Figure 8. Analyse SDS-PAGE des surnageants de culture de *P. gingivalis* 33277 et 49417 et de leurs mutants spontanés suite à une croissance (24 h) dans le milieu MBB additionné de transferrine. A. Marqueurs de poids moléculaire en kDa; B. Milieu MBB additionné de transferrine non ensemencé; C. 33277; D. M1; E. M2; F. M3; G. 49417; H. 49417NP

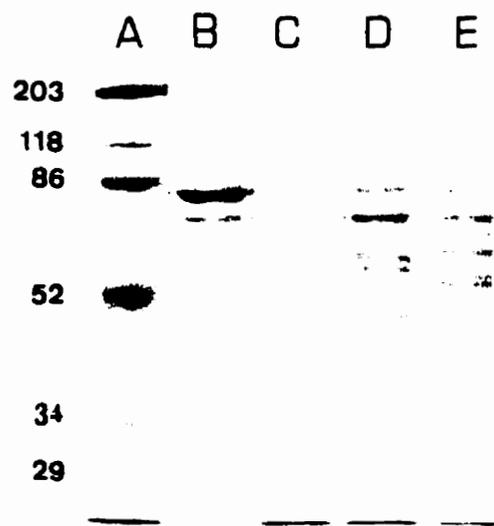


Figure 9. Analyse SDS-PAGE des surnageants de culture de *P. gingivalis* 381 et de ses mutants dirigés suite à une croissance (11 h) dans le milieu MBB additionné de transferrine. A. Marqueurs de poids moléculaire en kDa; B. Milieu MBB additionné de transferrine non ensemencé; C. 381; D. G102; E. MT10

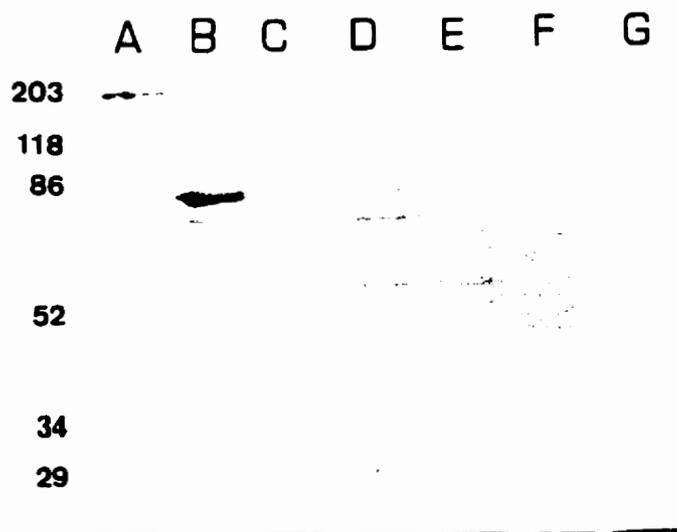


Figure 10. Analyse SDS-PAGE des surnageants de culture de *P. gingivalis* W83 et 33277 et de leurs mutants dirigés suite à une croissance (11 h) dans le milieu MBB additionné de transferrine. A. Marqueurs de poids moléculaire en kDa; B. Milieu MBB additionné de transferrine nonensemencé; C. W83; D. W83PM; E. V2296; F. 33277; G. KDP112

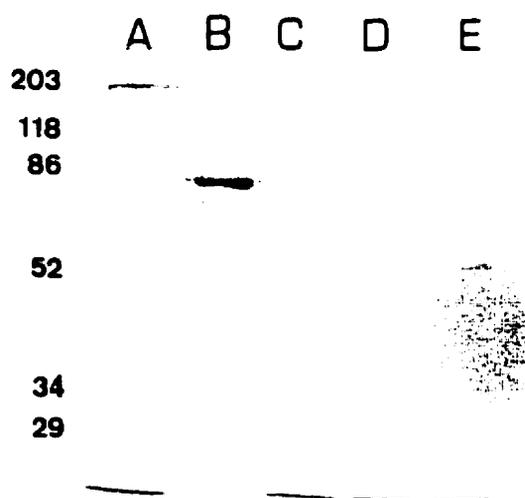


Figure 11. Analyse SDS-PAGE des surnageants de culture de *P. gingivalis* W50 et de ses mutants dirigés suite à une croissance (11 h) dans le milieu MBB additionné de transferrine. A. Marqueurs de poids moléculaire en kDa; B. Milieu MBB additionné de transferrine non ensemencé; C. W50; D. W50D7; E. W501

3.4.2 Détection de fragments de transferrine s'attachant aux cellules

Afin de mettre en évidence une liaison possible de fragments de transferrine aux cellules de *P. gingivalis* 33277, suite à la dégradation de la protéine, une analyse par western immunoempreinte a été effectuée. Les cellules ont d'abord été incubées en présence de transferrine, puis récoltées par centrifugation. Les cellules et le surnageant de l'essai ont été analysés par SDS-PAGE suivi d'une détection des fragments de transferrine par utilisation d'un anticorps anti-transferrine. Selon les résultats présentés à la figure 12, les cellules de *P. gingivalis* ne semblent pas lier de fragments de transferrine suivant la dégradation de la protéine.

3.4.3 Détermination de l'effet d'inhibiteurs de glycosidases sur la dégradation de la transferrine

Dans le but de vérifier si les activités glycosidases de *P. gingivalis* 33277 participent à la dégradation de la transferrine en hydrolysant les sucres pour rendre la protéine susceptible à l'action des protéases, les cellules bactériennes ont été incubées en présence de transferrine et de divers inhibiteurs de glycosidases. La dégradation de la transferrine a par la suite été évaluée par analyse SDS-PAGE. Les résultats résumés au tableau 12 montrent qu'aucun des inhibiteurs de glycosidases testés n'a inhibé la dégradation de la transferrine par *P. gingivalis* 33277.

3.4.4 Détermination de l'effet d'inhibiteurs de protéases sur la dégradation de différents substrats par *P. gingivalis* 33277

3.4.4.1 Activité Arg-gingipaine et Lys-gingipaine

L'effet de différents inhibiteurs de protéases sur la dégradation des substrats synthétiques, Bapna et Blpna, a été évalué afin de connaître leurs effets sur les activités Arg- et Lys-gingipaines. Le tableau 13 résume les résultats obtenus. L'hydrolyse du Bapna et du Blpna a pu être inhibée à différents degrés par certains inhibiteurs. Le TLCK, l'Ac-Arg-CH₂Cl, le

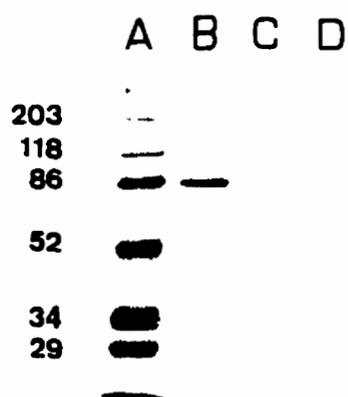


Figure 12. Analyse par SDS-PAGE et Western immunoempreinte des fragments de transferrine se liant aux cellules de *P. gingivalis* 33277 A. Marqueurs de poids moléculaire en kDa; B. Témoin de transferrine; C. Cellules récoltées suite à l'incubation avec la transferrine; D. Surnageant de l'essai suite à l'incubation des cellules avec la transferrine

Tableau 12. Effet de différents inhibiteurs de glycosidases sur la dégradation de la transferrine par *P. gingivalis* 33277

Inhibiteur	Dégradation de la transferrine ^a
Aucun	+
Acétamide	+
Acide dehydro-2deoxy-N-acetyl- neuraminique	+
N-acetyl-D-glucosamine	+
Acide N-acetyl-neuraminique	+

a. déterminé par analyse SDS-PAGE

Tableau 13. Effet de différents inhibiteurs de protéases sur les activités Arg- et Lys- gingipaines de *P. gingivalis* 33277

Inhibiteur	% Activité (essai 1/essai 2)	
	Arg-gingipaine ^a	Lys-gingipaine ^b
Aucun	100/100	100/100
EDTA	40/ND ^c	100/100
AEBSF	90/100	100/90
DFP	90/100	70/70
Pepstatin	100/ND	90/ND
PCMP	100/100	70/50
TLCK	10/20	0/0
Iodoacetamide	80/90	30/20
Leupeptin	0/30	80/100
Ac-Arg-CH ₂ Cl	0/30	40/30
Bestatin	100/100	100/100
FPRCK	20/ND	40/ND
E-64	100/80	80/100
Antipain	0/20	30/30
Cystatin	30/ND	70/80

a. déterminé par mesure (A_{405nm}) de l'hydrolyse du substrat BAPNA

b. déterminé par mesure (A_{405nm}) de l'hydrolyse du substrat BLPNA

c. non déterminé

FPRCK et l'antipain ont inhibé fortement les activités Arg- et Lys-gingipaines de *P. gingivalis*. La leupeptin, le EDTA et la cystatin ont produit une forte inhibition de l'activité Arg-gingipaine, mais n'ont eu que peu d'effet sur l'activité Lys-gingipaine. Enfin, l'ioacétamide a inhibé fortement l'activité Lys-gingipaine et n'a eu aucun effet sur l'activité Arg-gingipaine.

3.4.4.2 Dégradation de la transferrine

Afin de connaître l'importance relative et la contribution des activités Arg- et Lys-gingipaines de *P. gingivalis* lors de la dégradation de la transferrine; différents inhibiteurs de protéases ont été ajoutés aux essais réactionnels.

Suite à une incubation de 6 heures à 37°C, certains inhibiteurs de protéases ont inhibé à différents degrés la dégradation de la transferrine par *P. gingivalis* (figure 13). Les inhibitions les plus fortes ont été obtenues avec le TLCK et l'iodoacétamide, alors que des inhibitions partielles ont été obtenues avec l'Ac-Arg-CH₂Cl, l'antipain, l'AEBSF et le FPRCK.

Une inhibition de la dégradation de la transferrine par *P. gingivalis* a donc été obtenue en utilisant des inhibiteurs de cystéine-protéases tel que le TLCK. Toutefois une légère dégradation de la protéine était quand même observée en présence de cette classe d'inhibiteur. Pour déterminer si une protéase appartenant à l'une des trois autres classes pouvait être responsable de cette faible dégradation de la transferrine, le TLCK a été combiné à un inhibiteur de chacune des trois classes et testé dans l'essai. Les résultats présentés à la figure 14 démontrent que seul le DFP, un inhibiteur de sérine-protéases, semblait avoir un effet inhibiteur additif sur la dégradation de la transferrine lorsque combiné au TLCK. Pour confirmer les résultats obtenus précédemment, l'essai fut répété en utilisant un autre inhibiteur de sérine-protéases, l'AEBSF. Les résultats obtenus ont été comparables à ceux du DFP (données non montrées).

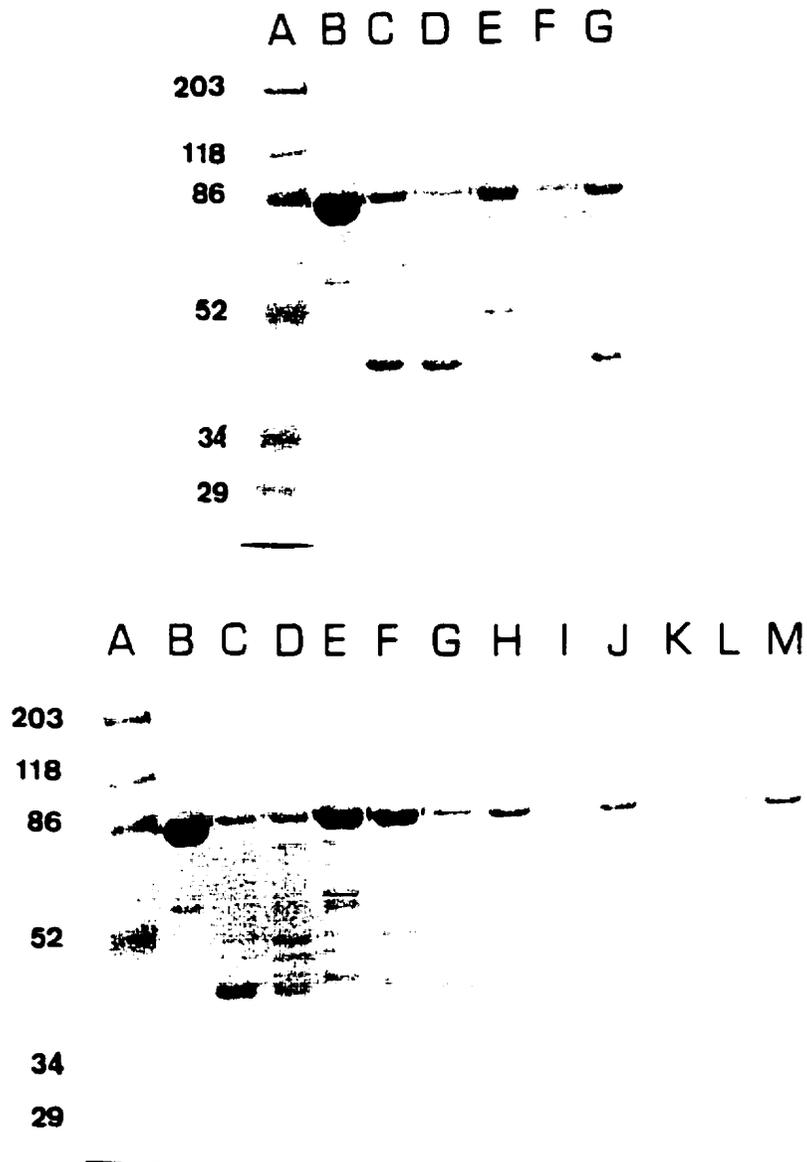


Figure 13. Effet d'inhibiteurs de protéases sur la dégradation de la transferrine par *P. gingivalis* 33277. **GEL A.** A. Marqueurs de poids moléculaire en kDa; B. Transferrine; C. Aucun inhibiteur; D. EDTA; E. AEBSF; F. DFP; G. Pepstatin **GEL B.** A. Marqueurs de poids moléculaire en kDa; B. Transferrine; C. Aucun inhibiteur; D. PCMP; E. TLCK; F. Iodoacetamide; G. Leupeptin; H. Ac-Arg-CH₂Cl; I. E64; J. Antipain; K. Cystatin; L. Bestatin; M. FPRCK

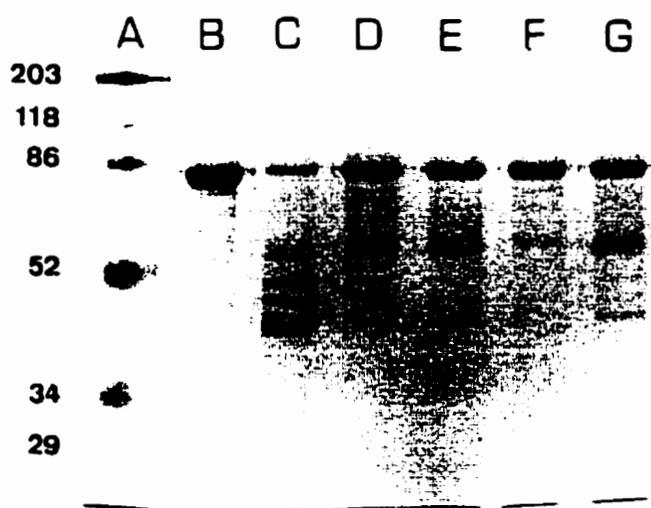


Figure 14. Effet de différentes combinaisons d'inhibiteurs de protéases sur la dégradation de la transferrine par *P. gingivalis* 33277. A. Marqueurs de poids moléculaire en kDa; B. Transferrine; C. Aucun inhibiteur; D. TLCK; E. TLCK+EDTA; F. TLCK+DFP; G. TLCK+Pepstatin

3.4.5 Effet d'inhibiteurs de protéases sur la croissance de *P. gingivalis* en présence de transferrine comme source de fer

L'effet de différents inhibiteurs de protéases sur la croissance de *P. gingivalis* 33277 et KDP112 en présence de transferrine comme seule source de fer a été évalué. Pour ce faire, des inhibiteurs de cystéine-protéases ont été ajoutés à raison de 200 µg/mL au milieu MBB additionné de transferrine ou d'hémine comme source de fer. Le milieu MBB sans supplément a servi de témoin négatif tandis que celui additionné d'hémine, de témoin positif. Les résultats présentés au tableau 14 démontrent que l'incorporation de ces inhibiteurs de protéases au milieu MBB additionné d'hémine n'a produit aucune inhibition de la croissance de *P. gingivalis*. La croissance de cette bactérie a cependant été fortement inhibée lorsque le TLCK ou la leupeptin étaient présents dans le milieu MBB additionné de transferrine.

3.4.6 Détermination de l'effet de l'ajout de protéases sur la capacité des souches M1 et M2 à croître en présence de transferrine

Dans le but de vérifier si l'incapacité des mutants spontanés M1 et M2 à croître en présence de transferrine comme source de fer résultait de leur incapacité à dégrader cette protéine, une source de protéases, la trypsine, a été ajoutée au milieu de culture. Les résultats obtenus ont montré que l'ajout de cette protéase ne pouvait permettre la croissance des souches M1 et M2 dans le milieu MBB additionné de transferrine. L'action de la trypsine sur la transferrine a alors été vérifiée par analyse SDS-PAGE. Cette expérience, illustrée à la figure 15, a montré que la transferrine était dégradée par la trypsine, mais que les principaux fragments générés (28 et 57 kDa) n'étaient pas les mêmes que ceux (44, 50 et 53 kDa) produits par *P. gingivalis*.

Tableau 14. Effet de différents inhibiteurs de protéases sur la croissance de *P. gingivalis* 33277 et KDP112

Inhibiteur ^a	Croissance		
	MBB seul	MBB+Transferrine	MBB+Hémine
Aucun	- ^b	+ ^c	+
TLCK	-	-	+
Leupeptin	-	-	+
FPRCK	-	+	+
Antipain	-	+	+

a. additionné au milieu de culture à raison de 200 µg/ml

b. arrêt de croissance suivant 1 à 4 transferts

c. croissance pour au moins deux transferts additionnels suivant l'arrêt de croissance dans le milieu sans source de fer

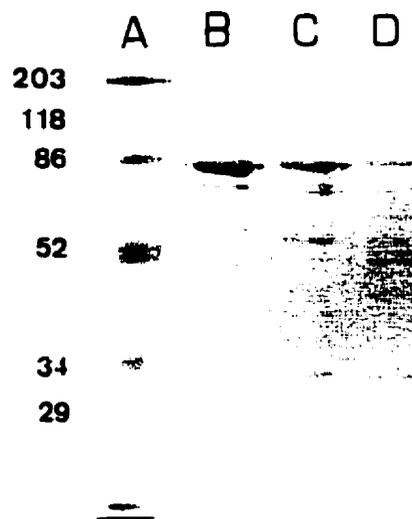


Figure 15. Dégradation de la transferrine présente dans le milieu de culture MBB par la trypsine. A. Marqueurs de poids moléculaire en kDa, B. Milieu MBB additionné de transferrine; C. Milieu MBB additionné de transferrine et de trypsine (5 $\mu\text{g/ml}$); D. Milieu MBB additionné de transferrine et de trypsine (25 $\mu\text{g/ml}$)

3.4.7 Comparaison des croissances des souches parentales et mutées de *P. gingivalis* en présence de transferrine comme source de fer

Les croissances de *P. gingivalis* 33277 et du mutant KDP112 ont été comparées dans le milieu MBB additionné de transferrine, afin de vérifier la contribution de l'activité Arg-gingipaine dans l'acquisition du fer de la transferrine durant la croissance. De même, les croissances de la souche 381 et du mutant G102 ont été comparées, afin de vérifier, cette fois, la contribution de l'activité Lys-gingipaine dans l'acquisition du fer de la transferrine. Le tableau 15 présente les densités optiques finales obtenues pour les différentes croissances. Peu de différences entre les croissances des souches parentales et mutées dans le milieu MBB additionné d'hémine ont été observées. Pour les croissances dans le milieu MBB additionné de transferrine, les souches 381 et G102 se sont comportées d'une façon comparable.

Par contre, les croissances des souches 33277 et KDP112 ont présenté des différences significatives. Les résultats de ces croissances, présentés à la figure 16, montrent que les deux souches pouvaient croître dans le milieu MBB additionné de transferrine. Toutefois, la souche mutante atteignait une densité optique beaucoup moins élevée que la souche parentale (0,47 par rapport à 0,85). De plus, le temps de latence de la souche 33277 s'est avéré plus court que celui du mutant KDP112, de même que le temps de génération (3 h par rapport à 8 h).

3.5 Évaluation du sérum humain comme milieu de culture pour *P. gingivalis* et de son effet sur l'activité protéolytique

3.5.1 Croissance dans le sérum humain actif et inactif

La capacité de différentes souches de *P. gingivalis*, pathogène (W50) ou non (33277) dans un modèle animal, à croître dans du sérum humain dilué (1:5 pour W50 et 1:10 pour 33277) a été évaluée dans le but de se rapprocher du contexte *in vivo*.

Tableau 15. Croissance de différentes souches de *P. gingivalis* dans le milieu MBB additionné de diverses sources de fer

Souche	Densité optique finale (essai 1/essai 2)	
	Hémine	Transferrine
33277	0.95/0.95	0.85/0.85
KDP112	0.88/0.90	0.44/0.47
381	0.78/0.83	0.54/0.59
G102	0.75/0.78	0.52/0.47
MT10	0.68/0.67	0.47/0.48

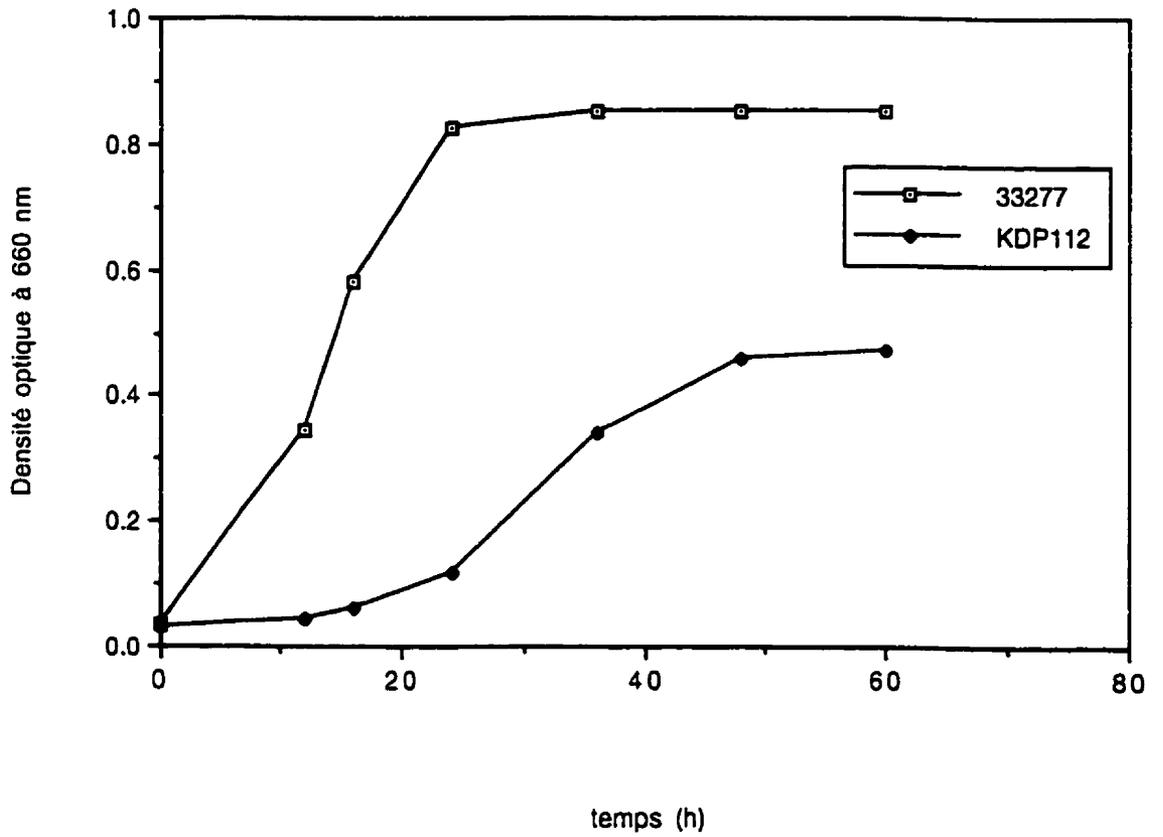


Figure 16. Croissance de *P. gingivalis* 33277 et KDP112 dans le milieu MBB additionné de transferrine

Les résultats du tableau 16 montrent clairement que la souche pathogène (W50) a atteint une densité optique finale dans le sérum beaucoup plus élevée que la souche non pathogène (33277). De plus, il existe une différence de croissance significative (densité optique finale) entre la souche mutante KDP112 et sa souche parentale 33277. Cette différence a également été vérifiée en évaluant le nombre d'unités formatrices de colonies (UFC) sur une gélose-sang après croissance des deux souches dans le sérum. Les résultats obtenus montrent que le nombre d'UFC pour la souche 33277 ($5,6 \times 10^8$) est supérieur à celui de la souche KDP112 (7×10^7) après 36 h de croissance. De plus, le nombre d'UFC obtenu pour le mutant KDP112 après 36 h de croissance est sensiblement le même que celui obtenu au temps 0.

Dans le but de vérifier si la faible croissance de *P. gingivalis* 33277, comparativement à la souche W50, dans le sérum humain était due à la sensibilité de cette souche à l'effet bactéricide du sérum, la croissance dans du sérum actif et inactivé à la chaleur a été comparée. La souche 33277 ne semblait pas sensible à l'effet bactéricide du sérum, puisque le sérum inactivé ou non a donné sensiblement les mêmes résultats (données non montrées).

3.5.2 Dégradation de différents substrats en présence de sérum humain

3.5.2.1 Activité Arg-gingipaine et Lys-gingipaine

Afin d'évaluer s'il existe un lien entre la capacité à croître dans le sérum humain et le niveau d'activités protéolytiques des souches bactériennes en présence de sérum, l'impact du sérum humain sur l'hydrolyse du Bapna et du Blpna par *P. gingivalis* a été évalué. La souche W50, pathogène dans un modèle animal, ainsi que la souche non pathogène 33277 ont été testées. Les mutants de ces souches ont également été inclus dans les essais.

Comme le montre le tableau 17, l'hydrolyse du Blpna, donc l'activité Lys-gingipaine, a été affectée en présence de sérum humain pour les deux souches. Par contre, les souches pathogène et non pathogène se comportent différemment en ce qui a trait à l'hydrolyse du

Tableau 16. Croissance de différentes souches de *P. gingivalis* dans du sérum humain

Souche	Densité optique à 660 nm (culture de 36 h)
W50	0,90
W501	0,95
W50D7	0,90
33277	0,21
KDP112	0,01

Tableau 17. Comparaison des activités Arg- et Lys-gingipaines de *P. gingivalis* en présence ou non de sérum humain

Souche	Arg-gingipaine ^a (essai 1/essai 2)		Lys-gingipaine ^b (essai 1/essai 2)	
	Sans sérum	Avec sérum	Sans sérum	Avec sérum
33277	0,547/0,532	0,419/0,388	0,519/0,534	0,188/0,181
KDP112	0,020/0,021	0,048/0,107	0,063/0,120	0,049/0,116
W50	0,260/0,101	0,407/0,168	0,233/0,518	0,139/0,219
W501	0,122/0,443	0,211/0,475	0,531/0,531	0,340/0,263
W50D7	0,035/0,040	0,040/0,060	0,217/0,140	0,107/0,097

a. déterminé par mesure (A_{405nm}) de l'hydrolyse du substrat BAPNA

b. déterminé par mesure (A_{405nm}) de l'hydrolyse du substrat BLPNA

Bapna en présence de sérum. L'activité Arg-gingipaine de la souche pathogène s'est avérée favorisée, alors que celle de la souche non pathogène était plutôt diminuée.

3.5.2.2 Dégradation de la transferrine

La dégradation par *P. gingivalis* 33277 de la transferrine présente dans le sérum humain a été évaluée. Les cellules bactériennes ont été incubées en présence du sérum, puis un SDS-PAGE suivi d'un western immunoempreinte ont été réalisés. Un anticorps anti-transferrine a permis la visualisation de la transferrine et de ses fragments sur la membrane de nitrocellulose. Les résultats illustrés à la figure 17 montrent que *P. gingivalis* était capable de dégrader la transferrine présente dans le sérum humain.

3.5.3 Effet des conditions de croissance de *P. gingivalis* sur la dégradation de différents substrats

Dans le but d'évaluer si les conditions de croissance influencent les activités protéolytiques de *P. gingivalis* 33277, l'hydrolyse des deux substrats chromogéniques, Bapna (activité Arg-gingipaine) et Blpna (activité Lys-gingipaine), par les cellules et le surnageant de culture a été comparée après croissance dans le sérum humain et dans le milieu MBB additionné d'hémine.

Les résultats présentés au tableau 18 montrent qu'il existe certaines différences entre le niveau d'activité Arg- et Lys-gingipaines des cellules et surnageants de culture après croissance dans le sérum ou le milieu MBB. Le surnageant de culture provenant d'une croissance dans le sérum possédait plus d'activité Arg-gingipaine que celui provenant du milieu MBB. D'autre part, les cellules provenant d'une croissance dans le sérum possédaient plus d'activité Lys-gingipaine que celles cultivées dans le milieu MBB.

La capacité de dégradation de la transferrine par des cellules de *P. gingivalis* 33277 ayant été cultivées dans le sérum et dans le milieu MBB additionné d'hémine a été comparée. Les

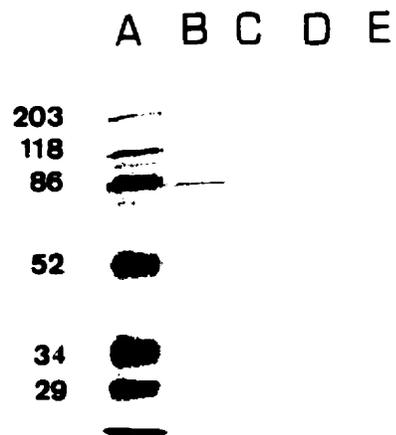


Figure 17. Analyse SDS-PAGE et western immunoempreinte de la dégradation de la transferrine présente dans le sérum humain par *P. gingivalis* 33277 en fonction du temps d'incubation. A. Marqueurs de poids moléculaire en kDa; B. Sérum; C. Incubation de 2 heures; D. Incubation de 4 heures; E. Incubation de 6 heures

Tableau 18. Activité Arg- et Lys-gingipaines des cellules et du surnageant de culture de *P. gingivalis* 33277 selon différentes conditions de croissance

Fraction	Conditions de croissance	Activité Arg-gingipaine ^a (essai 1/essai 2)	Activité Lys-gingipaine ^b (essai 1/essai 2)
Surnageant	Sérum	0,570/0,646	0,174/0,181
	Milieu MBB + hémine	0,296/0,447	0,108/0,190
Cellules	Sérum	0,528/0,518	0,900/0,941
	Milieu MBB + hémine	0,551/0,547	0,768/0,557

a. déterminé par mesure (A_{405nm}) de l'hydrolyse du substrat BAPNA

b. déterminé par mesure (A_{405nm}) de l'hydrolyse du substrat BLPNA

résultats obtenus ont montré qu'il n'y avait pas de différences notables entre les deux dégradations (données non montrées).

3.5.4 Croissance dans le sérum humain supplémenté de différentes sources de fer

Dans le but de déterminer si l'incapacité du sérum humain à supporter la croissance de *P. gingivalis* 33277 était due à l'incapacité de cette bactérie à combler efficacement ses besoins en fer, différentes sources de fer ont été ajoutées au sérum. Les résultats de ces croissances, présentés au tableau 19, révèlent que le sérum humain permettait une meilleure croissance de *P. gingivalis* 33277 lorsqu'il était supplémenté en hémine ou FeCl₃. Les différentes densités optiques atteintes par la souche 33277 dans le sérum humain présentées aux tableaux 16 et 19 sont probablement dues à certains facteurs physiques influençant la croissance comme la température et la présence d'oxygène dans la chambre anaérobie.

3.6 Analyse comparative de l'activité protéolytique de cultures obtenues suite à des conditions de croissance riches et pauvres en fer

Dans le but de vérifier si les conditions en fer lors de la croissance influencent les activités protéolytiques de *P. gingivalis*, différents essais ont été effectués. Les cellules et les surnageants de culture ont été récoltés après croissance dans le milieu MBB sans supplément et additionné de différentes sources de fer, soient l'hémine ou la transferrine. Dans un premier temps, l'hydrolyse du Bapna et du BIpna par les cellules et les surnageants de culture provenant des trois différents milieux a été testée.

Comme montré au tableau 20, les conditions de croissance ont influencé les activités protéolytiques Arg- et Lys-gingipaine de *P. gingivalis* 33277. Les cellules ayant été cultivées en présence de transferrine ou dans un milieu déficient en fer semblaient posséder deux fois plus d'activité que les cellules cultivées dans le milieu contenant de l'hémine. Au contraire, l'activité Arg-gingipaine s'est révélée être environ deux fois plus forte lorsque le surnageant provenait de la croissance dans le milieu MBB additionné d'hémine

Tableau 19. Croissance de *P. gingivalis* 33277 dans le sérum humain sans supplément ou additionné de différentes sources de fer

Supplément au sérum	Densité optique à 660 nm suite à une croissance de 48 h (essai 1/essai 2)
Aucun	0,00/0,00
Hémine	0,45/0,36
FeCl ₃	0,80/0,90

Tableau 20. Comparaison des activités Arg- et Lys-gingipaines des cellules et surnageants de *P. gingivalis* 33277 provenant de différents milieux de culture

Fraction	Supplément au milieu MBB	Arg-gingipaine ^a (essai 1/essai 2)	Lys-gingipaine ^b (essai 1/essai 2)
Cellules	Aucun	1,084/0,867	0,356/0,398
	Hémine	0,549/0,489	0,387/0,356
	Transferrine	1,163/0,949	0,702/0,679
Surnageant	Aucun	0,266/0,272	0,070/0,117
	Hémine	0,719/0,669	0,127/0,216
	Transferrine	0,273/0,291	0,106/0,106

a. déterminé par mesure ($A_{405\text{nm}}$) de l'hydrolyse du substrat BAPNA

b. déterminé par mesure ($A_{405\text{nm}}$) de l'hydrolyse du substrat BLPNA

comparativement aux deux autres milieux. L'activité Lys-gingipaine des cellules ayant été cultivées en présence de transferrine s'est révélée être environ deux fois plus forte que celle des cellules cultivées dans les deux autres milieux.

Dans un deuxième temps, les cellules provenant de ces trois conditions de culture différentes ont été incubées en présence de transferrine et la dégradation de celle-ci a été vérifiée par analyse SDS-PAGE. Les profils de dégradation obtenus ont montré qu'il n'y avait pas de différence observable (données non montrées).

CHAPITRE IV

DISCUSSION

P. gingivalis a été particulièrement associé à la parodontite chronique de l'adulte, une réaction inflammatoire en réponse à une surcroissance bactérienne qui mène à une destruction des tissus de soutien de la dent. Pour être en mesure de se multiplier au site de l'infection, cette bactérie requiert entre autre une source de fer. Le fer n'est cependant pas présent sous une forme libre dans les fluides biologiques comme le fluide créviculaire, se trouvant plutôt complexé à des protéines de l'hôte telles la transferrine. *P. gingivalis* doit donc posséder un mécanisme lui permettant d'acquérir le fer de la transferrine. L'objectif de mon projet de maîtrise était de démontrer le rôle des protéases de *P. gingivalis* dans l'acquisition du fer de la transferrine humaine.

Dans un premier temps, la croissance de *P. gingivalis* a été évaluée dans un milieu de culture contenant la transferrine humaine comme seule source de fer. Le milieu MBB a été choisi pour ces expériences, car il contient une quantité de fer insuffisante pour supporter la croissance à long terme de *P. gingivalis*. Cinq souches de *P. gingivalis* (33277, 381, 49417,

W50 et W83) ont été utilisées, afin de démontrer une certaine reproductibilité au sein de l'espèce. Les résultats obtenus ont d'ailleurs été comparables pour les cinq souches. Le milieu MBB seul, c'est-à-dire sans source de fer, n'a pu supporter la croissance à long terme des différentes souches. Par contre, lorsqu'une source de fer était ajoutée au milieu de culture soit l'hémine ou la transferrine, la croissance des différentes souches était possible pour plusieurs transferts successifs. Ces résultats démontrent qu'un apport en fer est essentiel pour la croissance de *P. gingivalis* et que l'hémine, qui est une source de fer classiquement utilisée dans les milieux de culture, ou la transferrine peuvent être utilisés par ce microorganisme pour combler ses besoins en fer. D'ailleurs, d'autres chercheurs (125, 127, 134) ont déjà démontré que *P. gingivalis* peut utiliser la transferrine humaine comme source de fer.

Le mécanisme par lequel *P. gingivalis* acquiert le fer de la transferrine demeure cependant incompris. C'est pourquoi, dans un deuxième temps, les quatre mécanismes connus d'acquisition du fer de la transferrine (activité de liaison de la transferrine, production de sidérophores, activité réductase du fer ferrique et activité protéolytique) ont été étudiés chez *P. gingivalis* 33277, qui a été choisie comme souche type de l'espèce. Premièrement, l'activité de liaison de la transferrine par les cellules entières a été évaluée par la technique de Schryvers (131). Aucune activité de liaison de la transferrine n'a pu être détectée. Ce résultat va cependant à l'encontre de ceux obtenus par Tazaki et coll. (128) qui ont démontré, par l'utilisation de transferrine marquée à l' ^{125}I , une activité de liaison de la transferrine chez *P. gingivalis* 381, 33277 et W83. Cette activité serait selon eux spécifique et réversible et constituerait une première étape dans l'acquisition du fer de l'hôte par ce microorganisme. Cette divergence au sujet des résultats pourrait s'expliquer par des différences au niveau des techniques utilisées. L'emploi de la transferrine radioactive permet sans aucun doute d'améliorer la sensibilité de la méthode, cependant il resterait à confirmer si ce niveau d'activité de liaison contribue d'une façon significative à l'acquisition du fer de la transferrine dans des conditions physiologiques. De plus, le fait que Tazaki et coll. (128) n'aient pas inclus de contrôles positif et négatif rend difficile l'estimation du niveau réel d'activité de liaison de la transferrine.

Deuxièmement, la production de sidérophores, des molécules chélatrices de fer, a été vérifiée dans le surnageant de culture de *P. gingivalis* 33277 par un essai colorimétrique. Les résultats ont montré que le mécanisme d'acquisition du fer chez *P. gingivalis* est indépendant de la production de sidérophores. Le troisième mécanisme d'acquisition du fer de la transferrine vérifié implique une activité réductase du fer ferrique. Le fer ferrique qui est insoluble devient alors, par perte d'électrons, du fer ferreux lequel est soluble et donc assimilable par les cellules bactériennes. Lorsque l'essai a été réalisé en conditions d'aérobiose, aucune activité réductase du fer ferrique n'a pu être détectée chez les cellules et dans le surnageant de culture de *P. gingivalis* 33277. Cependant en conditions d'anaérobiose, le surnageant de culture a entraîné une réduction du fer ferrique en fer ferreux. La capacité du surnageant de culture à réduire le fer ferrique est probablement due aux conditions anaérobies qui implique un environnement réduit. Afin de confirmer l'absence d'une production de sidérophores et d'une activité réductase, une seconde méthode a été utilisée soit l'électrophorèse en présence d'urée. Ce type d'électrophorèse permet de visualiser différemment la transferrine chargée en ions ferriques ou non chargée. Après incubation des cellules bactériennes ou du surnageant de culture en présence de holo-transferrine (forme chargée en fer) et analyse par électrophorèse en présence d'urée, les résultats ont montré que le niveau de saturation en fer de la transferrine est demeuré. S'il y avait eu présence de sidérophores ou d'activité réductase, le fer présent sur la transferrine aurait été largué et les résultats auraient montré la transferrine sous sa forme apo qui est non chargée en fer. L'ensemble de ces résultats permet donc de conclure à l'absence de production de sidérophores et d'activité réductase du fer ferrique chez *P. gingivalis*.

Pour mettre en évidence la participation des protéases bactériennes dans le processus d'acquisition du fer de la transferrine, la capacité de *P. gingivalis* 33277 à dégrader la transferrine a été évaluée par analyse SDS-PAGE. Les cellules de *P. gingivalis* se sont avérées capables de dégrader la transferrine en fragments de faible poids moléculaire, lorsqu'incubées en présence de la protéine.

Il est reconnu que la majorité de l'activité protéolytique associée aux cellules de *P. gingivalis* est due à la présence de gingipaines (34). Celles-ci sont réparties en deux

catégories selon leur mode d'action sur les substrats; Arg-gingipaine pour celles qui coupent après l'acide aminé arginine, et Lys-gingipaine pour celles qui coupent après l'acide aminé lysine. La transferrine est composée de 630 acides aminés, dont 23 sont des arginines et 56 des lysines (92). Il est donc logique de suggérer que la transferrine ait été clivée après les acides aminés arginine ou lysine accessibles aux gingipaines de *P. gingivalis*. Cette capacité de *P. gingivalis* à dégrader la transferrine semble être de première importance dans l'acquisition du fer de cette protéine, étant le seul mécanisme d'acquisition du fer de la transferrine qui a pu être démontré chez ce microorganisme. La dégradation de la transferrine en fragments de faible poids moléculaire faciliterait soit le largage du fer de la transferrine, soit l'assimilation par la cellule de peptides auxquels du fer serait lié. D'autres études seront cependant nécessaires pour élucider ces dernières suppositions.

Dans le but de confirmer le rôle des protéases de *P. gingivalis* dans l'acquisition du fer de la transferrine, des mutants déficients pour certaines activités protéolytiques ont été utilisés. En premier lieu, les niveaux d'activités Arg- et Lys-gingipaines des différents mutants par rapport aux souches parentales ont été évalués grâce à l'utilisation de substrats chromogéniques. Puis, ces différentes souches ont été testées quant à leur capacité à dégrader la transferrine et à croître en présence de cette protéine comme seule source de fer.

Les mutants spontanés M1, M2 et 49417NP, déficients en activités Arg- et Lys-gingipaines, n'ont pu dégrader la transferrine suite à une incubation *in vitro*. De plus, ils n'ont dégradé que minimalement la protéine lors d'une première croissance dans un milieu sans source de fer. Ceci a pu être évalué, car la croissance de *P. gingivalis* est possible, pour un nombre limité de transferts, dans un milieu sans source additionnelle de fer grâce aux réserves d'hémine que ce microorganisme accumule au niveau de sa membrane externe lors d'une croissance préalable en milieu supplémenté en hémine. Les mutants M1, M2 et 49417NP, n'ont cependant pu croître, à long terme, dans un milieu contenant la transferrine comme seule source de fer. Ces résultats suggèrent un lien entre la possession des activités Arg- et Lys-gingipaines et la capacité des bactéries à dégrader et utiliser la transferrine comme source de fer. En outre, la dégradation de la transferrine semble essentielle pour que le microorganisme puisse utiliser le fer présent sur cette protéine. L'utilisation de mutants

spontanés déficients en activités Arg- et Lys-gingipaines a permis de suggérer ces conclusions. Toutefois, ceci devrait être confirmé par l'utilisation de mutants, construits par biologie moléculaire, spécifiquement affectés pour les gènes Arg-gingipaines 1 et 2 et Lys-gingipaine. En effet, les mutants M1 et M2 sont des mutants spontanés sélectionnés quant à leur absence d'activité d'hémagglutination. L'absence d'activités Arg- et Lys-gingipaines chez ces souches constitue donc un résultat surprenant. D'ailleurs, cette équipe de chercheurs avait rapporté que l'activité Arg-gingipaine des mutants M1 et M2 était très faible (46). Les mutations qu'ont subies ces souches sont inconnues, mais pourraient être au niveau d'un gène de régulation. Il se peut donc qu'en plus de l'absence d'activité d'hémagglutination et d'activités Arg- et Lys-gingipaines, l'expression d'autres gènes ait été modifiée et que les résultats obtenus concernant l'incapacité de ces souches à dégrader et utiliser la transferrine comme source de fer pour la croissance soit due à d'autres activités manquantes. En ce qui a trait au mutant 49417NP, il a été sélectionné au laboratoire quant à son absence de pigmentation sur une gélose contenant du sang. Les gènes mutés restent donc inconnus pour l'instant.

Ces dernières expériences ont par la suite été réalisées avec des mutants construits par biologie moléculaire et spécifiquement déficients au niveau des gènes (1 et/ou 2) responsables de l'activité Arg-gingipaine. Le mutant dirigé KDP112, interrompu sur les deux gènes responsables de l'activité Arg-gingipaine (Arg-gingipaines 1 et 2), a démontré une déficience complète en activité Arg-gingipaine et une activité Lys-gingipaine très peu affectée. D'ailleurs, l'équipe qui a construit le mutant KDP112, avait rapporté cette absence d'activité Arg-gingipaine chez ce dernier (47). Le mutant KDP112 s'est avéré capable de dégrader la transferrine et de croître en présence de cette dernière comme seule source de fer. Ces résultats suggèrent que l'activité Lys-gingipaine est suffisante pour permettre la dégradation de la transferrine, et ainsi l'utilisation du fer présent sur la protéine par *P. gingivalis* KDP112. L'effet de la protéase purifiée Lys-gingipaine sur la transferrine resterait à vérifier. L'analyse plus approfondie de la croissance des souches 33277 et KDP112 dans le milieu MBB additionné de transferrine comme source de fer a permis d'apporter quelques précisions. Le mutant KDP112, déficient en activité Arg-gingipaine, peut utiliser la transferrine comme source de fer, cependant, en comparaison avec sa souche

parentale 33277, sa phase de latence et son temps de génération dans le milieu contenant la transferrine comme source de fer sont plus longs, et la densité optique finale atteinte par la culture est moindre. Ces résultats suggèrent que l'activité Arg-gingipaine n'est pas essentielle à l'acquisition du fer de la transferrine par *P. gingivalis*, mais favorise cette dernière.

Le mutant dirigé G102, interrompu sur le gène de l'Arg-gingipaine 2, a démontré une déficience complète en activité Lys-gingipaine et un niveau d'activité Arg-gingipaine similaire à sa souche parentale. Dans la littérature, il existe quelques confusions au sujet de ce mutant. L'équipe qui a construit ce mutant a d'abord rapporté qu'il était muté sur le gène de l'Arg-gingipaine 1 (31), puis, deux années plus tard, ils ont corrigé pour le gène de l'Arg-gingipaine 2 (42). L'exactitude des informations transmises par cette équipe mériterait vérification. Selon eux, l'activité Arg-gingipaine du mutant G102 représente environ les deux tiers de celle de la souche parentale (31). Malheureusement, ils n'ont pas évalué le niveau d'activité Lys-gingipaine chez ce mutant. L'écart au niveau de l'activité Arg-gingipaine, entre la présente étude (100% par rapport à la souche parentale) et celle réalisée par Yoneda et coll. (66% par rapport à la souche parentale) (31), est difficilement explicable, car la méthodologie employée était sensiblement la même. Une explication possible du niveau d'activité Arg-gingipaine du mutant G102 serait que l'activité Arg-gingipaine est dérivée du produit de deux gènes (Arg-gingipaine 1 et 2) et que lorsqu'un de ces gènes est défectueux, il se produirait une régulation positive au niveau de l'autre gène. Ce phénomène amènerait le niveau d'activité Arg-gingipaine du mutant à un niveau comparable à celui de la souche parentale. En ce qui a trait à l'absence d'activité Lys-gingipaine chez le mutant G102, ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que les produits du gène de l'Arg-gingipaine 1 seraient essentiels à la maturation ou l'arrangement de la protéase Lys-gingipaine. D'ailleurs, il a déjà été rapporté que les protéases Arg-gingipaines de *P. gingivalis* seraient impliquées dans l'arrangement de préprotéines bactériennes incluant la progingipaine K, une forme protéique précurseur de 75 kDa de la Lys-gingipaine (51 kDa) (45, 135, 136). Le mutant G102 s'est avéré capable de dégrader et utiliser la transferrine comme source de fer. Ces résultats suggèrent que l'activité Arg-gingipaine est suffisante pour permettre la dégradation de la transferrine, et ainsi

l'utilisation du fer présent sur la transferrine par *P. gingivalis* G102. Il serait intéressant de vérifier l'effet des protéases purifiées Arg-gingipaines envers la transferrine. Le mutant spontané M3, qui a présenté des niveaux d'activités Arg- et Lys-gingipaines similaires au mutant G102, a également été en mesure de dégrader et utiliser la transferrine comme seule source de fer, appuyant ainsi le fait que l'activité Arg-gingipaine soit suffisante.

Le mutant dirigé MT10 a démontré des niveaux d'activités Arg- et Lys-gingipaines similaires à ceux de la souche parentale 381. Ces résultats sont inattendus, puisque le gène de l'Arg-gingipaine 1 de ce mutant est défectueux. En outre, Tokuda et coll. (42) avait rapporté une diminution de 60% de l'activité Arg-gingipaine chez ce mutant. Par contre, comme prévu étant donné la présence d'activités Arg- et Lys-gingipaines, le mutant MT10 a été capable de dégrader et utiliser la transferrine comme source de fer.

Les mutants W501 et W50D7 ont été interrompus sur le gène de l'Arg-gingipaine 1 et 2, respectivement. Le niveau d'activité Lys-gingipaine de ces mutants s'est avéré similaire à celui de leur souche parentale, soit W50. Par contre, le niveau d'activité Arg-gingipaine de ces mutants s'est retrouvé diminué par rapport à la souche W50. Selon Rangarajan et coll. (38), la perte du gène Arg-gingipaine 1 entraîne une diminution de l'activité Arg-gingipaine présente dans la fraction cellulaire, mais surtout une diminution importante de celle présente dans le surnageant de culture. D'ailleurs, un niveau d'activité Arg-gingipaine très faible a été retrouvé dans le surnageant de culture du mutant W501, par contre les cellules de ce dernier ont démontré un niveau d'activité Arg-gingipaine comparable à celui de la souche W50. Cet écart peut s'expliquer par une différence au niveau de l'âge des cellules bactériennes utilisées. Selon Aduse-Opoku et coll. (48), l'inactivation du gène de l'Arg-gingipaine 2 entraîne une diminution d'environ 50% de l'activité Arg-gingipaine totale chez le mutant. Cette diminution est plus prononcée dans la fraction cellulaire que dans le surnageant de culture. Les résultats obtenus dans la présente étude sont comparables à ces derniers. L'activité Arg-gingipaine présente dans le surnageant de culture du mutant W50D7 s'est retrouvée diminuée de 40% par rapport à la souche parentale et celle associée aux cellules de 80%. Les mutants W501 et W50D7 ont été capables de dégrader et utiliser

la transferrine comme source de fer. Ces résultats vont de pair avec les niveaux d'activités Arg- et Lys-gingipaines présents chez ces souches.

Il est intéressant de noter que deux souches mutées sur le même gène, par exemple Arg-gingipaine 2, n'ont pas produit les mêmes phénotypes. En effet, le mutant G012 ne possède plus l'activité Lys-gingipaine, tandis que son homologue, le mutant W50D7, démontre un niveau semblable de cette activité par rapport à sa souche parentale. Ce phénomène demeure inexpliqué. Une possibilité avancée par Tokuda et coll. (42) est que la régulation de l'expression des protéases s'effectue différemment selon les souches bactériennes.

Le gène *priH* a été inactivé chez le mutant V2296. Ce gène code pour une protéase de 97 kDa qui se retrouve normalement sur les vésicules membranaires et qui a la capacité de dégrader la protéine C3 du complément (41). Les activités Arg- et Lys-gingipaines ont été déterminées chez cette souche. Les niveaux de ces activités détectés dans le surnageant de culture et chez les cellules entières se sont avérés diminués de 20 à 50% par rapport à la souche parentale. Fletcher et coll. (41) avait d'ailleurs rapporté que le surnageant de culture du mutant V2296 démontrait une diminution de son niveau d'activité Arg-gingipaine par rapport à la souche W83. Une explication possible concernant les niveaux d'activités protéolytiques diminués chez la souche V2296 serait que les produits du gène *priH* participent à l'expression ou la maturation des protéases Arg- et/ou Lys-gingipaines. Le mutant V2296 s'est avéré capable de dégrader et utiliser la transferrine comme source de fer. Ces résultats vont de pair avec la présence d'activités Arg- et Lys-gingipaines chez ce mutant. La perte de la protéase de 97 kDa ne semble pas nuire à l'acquisition du fer de la transferrine par ce mutant.

Le gène *tpr* a été inactivé chez le mutant W83PM. Ce gène code pour la protéase Tpr de 80 kDa qui possède la capacité d'hydrolyser le collagène. La mise en évidence des activités Arg- et Lys-gingipaines a été effectuée chez ce mutant. Les niveaux d'activités Arg- et Lys-gingipaines retrouvés chez les cellules se sont avérés similaires à ceux retrouvés chez la souche parentale W83. D'ailleurs, Park et coll. (130) avait rapporté des niveaux d'activités Arg-gingipaines équivalents pour les cellules de W83 et celles de W83PM. Comme

attendu, étant donné les niveaux d'activités Arg- et Lys-gingipaines présents chez les cellules du mutant W83PM, celui-ci a été en mesure de dégrader et utiliser la transferrine comme source de fer. La perte de la protéase de 80 kDa ne semble donc pas nuire à l'acquisition du fer de la transferrine par ce mutant.

Brièvement, l'utilisation de mutants déficients en activités protéolytiques a permis d'appuyer l'importance des protéases dans l'acquisition du fer de la transferrine par *P. gingivalis*. Ainsi, la possession d'au moins une des deux principales activités protéolytiques, soit Arg- ou Lys-gingipaine, semble indispensable pour permettre la dégradation de la transferrine en fragments de faible poids moléculaire. Cette dégradation de la protéine semble essentielle à l'acquisition du fer présent sur la transferrine par *P. gingivalis*.

La présente étude s'est poursuivie en effectuant différentes expériences permettant d'analyser plus en détail la dégradation et l'utilisation de la transferrine par la souche type choisie, soit 33277.

Le degré de saturation de la transferrine ne modifie pas la susceptibilité de la protéine à la dégradation par *P. gingivalis* 33277. Lors d'une incubation avec les cellules bactériennes, l'apo- (forme non chargée en fer) et l'holo-transferrine (forme chargée en fer) sont dégradées de façon similaire. Ceci indique que la présence des ions ferriques ne gênent pas la liaison des protéases à la transferrine.

Suite à la dégradation de la transferrine par *P. gingivalis* 33277, les fragments produits ne se lient pas aux cellules bactériennes. Ceci supporte l'absence d'activité de liaison de la transferrine chez ce microorganisme démontrée précédemment.

La transferrine est une glycoprotéine dont la composition en hydrate de carbone atteint 5,7% (92). Différents sucres sont liés à la protéine dont le mannose, le galactose, le glucosamine et le fucose (92). Dans le but de vérifier si les glycosidases participent à la dégradation de la transferrine par *P. gingivalis* 33277, l'effet de différents inhibiteurs de

glycosidases sur la dégradation de la transferrine a été étudié. Aucun des inhibiteurs testés n'a influencé la dégradation de la transferrine. Ces résultats indiquent que la présence de sucres sur la transferrine ne gêne pas la liaison des protéases à la protéine et que les glycosidases de *P. gingivalis* ne jouent pas un rôle important dans la dégradation de la transferrine.

Afin de vérifier le rôle des activités Arg- et Lys-gingipaines de *P. gingivalis* 33277 lors la dégradation de la transferrine; l'effet de différents inhibiteurs de ces protéases a été évalué sur la dégradation de la transferrine. Des inhibiteurs des quatre classes ont été testés, soient sérine, métallo, aspartique et cystéine. En général, les inhibiteurs ayant causé les plus importantes inhibitions des activités Arg- et Lys-gingipaines sont ceux qui ont produit les plus fortes inhibitions de la dégradation de la transferrine par *P. gingivalis*. L'unique inhibiteur d'aspartique-protéases testé, la pepstatin, n'a produit aucune inhibition des activités Arg- et Lys-gingipaines présentes chez *P. gingivalis* et de la dégradation de la transferrine par ce microorganisme. Les inhibiteurs de sérine-protéases testés, AEBSF et DFP, n'ont eu que très peu d'effet sur les activités protéolytiques. Par contre, l'AEBSF a semblé inhiber légèrement la dégradation de la transferrine par *P. gingivalis*. La dégradation de la transferrine et l'activité Lys-gingipaine n'ont pas été affectées par la présence dans l'essai réactionnel des inhibiteurs de métallo-protéases utilisés, bestatin et EDTA. Cependant, l'activité Arg-gingipaine s'est retrouvée diminuée environ de moitié en présence d'EDTA, et est restée inchangée en présence de bestatin. Plusieurs inhibiteurs de cystéine-protéases ont été utilisés. Tous ces inhibiteurs de cystéine-protéases ont eu des effets sur les activités Arg- et Lys-gingipaines de *P. gingivalis* 33277, à l'exception de l'E-64. La leupeptin et la cystatin ont inhibé plus particulièrement l'activité Arg-gingipaine, tandis que l'iodoacétamide a inhibé plus particulièrement l'activité Lys-gingipaine. Une inhibition de la dégradation de la transferrine produite par *P. gingivalis* a été obtenue avec plusieurs de ces inhibiteurs dont : le TLCK, l'iodoacétamide, l'Ac-Arg-CH₂Cl, l'antipaine et le FPRCK. Il était prévisible d'obtenir les plus fortes inhibitions en présence des inhibiteurs de cystéine-protéases, étant donné que la grande majorité de l'activité protéolytique présente chez *P. gingivalis* est due à l'activité de cystéine-protéases. Cependant, certains inhibiteurs de cystéine-protéases n'ont pas causé d'inhibition de la

dégradation de la transferrine. Ces observations suggèrent que la nature de la molécule, le poids moléculaire et son mode d'action peuvent déterminer l'efficacité de l'inhibiteur. Enfin, l'ensemble de ces résultats confirment l'importance des protéases, plus spécifiquement des cystéine-protéases, dans la dégradation de la transferrine par *P. gingivalis*.

L'effet de différents inhibiteurs de cystéine-protéases a été évalué sur la croissance de *P. gingivalis* en présence de transferrine comme seule source de fer. Le milieu MBB a été choisi comme milieu de culture à cause de son contenu élevé en petits peptides et faible en protéines. Sous ces conditions, les protéases de *P. gingivalis* servent en grande partie à combler les besoins en fer de la bactérie. Des inhibitions de la croissance de *P. gingivalis* en présence de transferrine ont été obtenues lorsque le TLCK ou la leupeptin était ajouté au milieu de culture. L'antipain et le FPRCK, n'ont pu empêcher la croissance de ce microorganisme. La leupeptin n'avait cependant pas été en mesure d'inhiber la dégradation de la transferrine. Une explication plausible serait que l'inhibition de la croissance était favorisée étant donné la concentration de microorganismes (présente dans l'inoculum) moins élevée que dans l'essai *in vitro*. L'antipain et le FPRCK avaient, quant à eux, inhibé la dégradation de la transferrine. Leur incapacité à inhiber la croissance peut être due à des interactions des inhibiteurs avec des constituants du milieu de culture. L'ensemble de ces résultats confirment que les cystéine-protéases de *P. gingivalis* sont impliquées dans l'acquisition du fer de la transferrine par ce microorganisme. Différentes études ont rapporté des inhibitions de la croissance de *P. gingivalis* par des inhibiteurs de cystéine-protéases comme la cystatin S (63, 137), l'iodoacétamide, le TLCK et la leupeptin (62). Ces auteurs avaient toutefois utilisé des milieux de culture riches en peptides et en fer pour réaliser leurs expériences.

L'ajout d'une source exogène de protéases, la trypsine pancréatique, n'a pas permis au mutant M1, déficient en activités Arg- et Lys-gingipaines, de croître en présence de transferrine comme source de fer, même si la transferrine présente dans le milieu de culture avait été dégradée en fragments de plus faible poids moléculaire par la trypsine. Cette inaptitude du mutant M1 à croître dans ce milieu pourrait être reliée à son incapacité à

acquérir le fer des fragments de transferrine générés par la trypsine, ceux-ci étant différents de ceux produits par *P. gingivalis*.

Afin de se rapprocher du contexte *in vivo*, différentes expériences impliquant du sérum humain ont été réalisées. La capacité de souches pathogène (W50) ou non pathogène (33277) à croître dans du sérum humain dilué s'est avérée différente. La densité optique finale atteinte par la souche pathogène est beaucoup plus élevée que celle atteinte par la souche non pathogène. Les facteurs responsables de la pathogénicité chez certaines souches de *P. gingivalis* demeurent inexplicables. Certaines études ont suggéré que l'activité collagénase (129) et les activités protéolytiques (138) peuvent constituer des déterminants importants de la pathogénicité associée à *P. gingivalis*. Il existe également une différence significative de croissance dans le sérum humain entre la souche parentale 33277 et sa souche mutante KDP112, déficiente en activité Arg-gingipaine. En effet, le mutant KDP112 s'est avéré tout-à-fait incapable de croître dans ce sérum. Ces résultats suggèrent que l'activité Arg-gingipaine permet à la souche 33277 d'acquérir certains éléments essentiels à sa croissance ou de vaincre l'effet bactéricide du sérum lié au système du complément.

La croissance de la souche 33277 dans le sérum humain inactivé à la chaleur s'est avérée similaire à celle obtenue dans le sérum actif. Ce résultat indique que la difficulté de la souche 33277 à croître dans le sérum humain n'est pas reliée à une susceptibilité possible à l'effet bactéricide du sérum. D'ailleurs, Sundqvist et Johansson (139) avaient démontré que certaines souches de *P. gingivalis* sont très résistantes à l'effet bactéricide du sérum humain. Cette caractéristique reflète bien le potentiel virulent de *P. gingivalis*.

L'activité Lys-gingipaine présente dans la fraction cellulaire de la souche pathogène W50 et de la souche non pathogène 33277 mesurée en présence de sérum humain s'est avérée réduite par rapport à celle déterminée en absence de sérum. D'autre part, les souches pathogène et non pathogène ont démontré des différences quant à leur activité Arg-gingipaine mesurée en présence de sérum. L'activité Arg-gingipaine de la souche pathogène est favorisée, tandis que celle de la souche non pathogène est plutôt diminuée.

Ces résultats suggèrent que l'activité Arg-gingipaine pourrait représenter un élément important associé à la pathogénicité. Le faible niveau d'activité Lys-gingipaine obtenu pour la souche KDP112 est probablement dû aux mauvaises conditions lors de la réalisation de ces essais. Cependant, les résultats présentés permettent quand même de porter quelques suppositions sur l'effet du sérum sur les activités Arg- et Lys-gingipaines.

Il existe certaines différences au niveau des activités Arg- et Lys-gingipaines des cellules et surnageants de culture après croissance de *P. gingivalis* 33277 dans le sérum humain ou le milieu MBB. Le surnageant de culture provenant du sérum humain possédait plus d'activité Arg-gingipaine que celui provenant du milieu MBB. D'autre part, les cellules provenant du sérum ont démontré plus d'activité Lys-gingipaine que celles provenant du milieu MBB. La dégradation de la transferrine par les cellules ayant été cultivées dans le sérum humain ou dans le milieu MBB s'est avérée similaire. L'ensemble de ces résultats démontrent que les conditions de croissance peuvent influencer les niveaux d'activités protéolytiques des cellules bactériennes et des surnageants de culture.

Le sérum humain contient diverses protéines dont celles qui lient des atomes de fer comme la transferrine et la lactoferrine. La présence de ces protéines produit des conditions bactériostatiques pour la croissance bactérienne en séquestrant le fer nécessaire au métabolisme bactérien. Aussi, la difficulté du sérum humain à supporter la croissance de *P. gingivalis* 33277 semble reliée à l'incapacité des cellules à combler leurs besoins en fer, puisque l'ajout d'hémine ou de FeCl_3 au sérum humain a grandement favorisé la croissance de 33277 dans ce milieu. Cependant, cette souche s'était avérée capable de dégrader la transferrine présente dans le sérum humain. Cette dégradation aurait dû permettre à cette souche de combler ses besoins en fer. Par contre, il est possible que la quantité de fer requise pour la croissance de la souche 33277 soit supérieure à celle requise pour la souche W50 et qu'ainsi la quantité de fer rendue disponible à partir de la transferrine soit insuffisante. La contradiction de ces résultats démontrent qu'il reste du travail à réaliser avant de connaître l'ensemble des processus menant à l'acquisition du fer à partir des peptides de transferrine générés par les cellules bactériennes.

La présente étude s'est terminée par une analyse comparative des activités protéolytiques de *P. gingivalis* 33277 après croissance dans des conditions riches et pauvres en fer. Les cellules ayant poussé en absence de fer ou en présence de transferrine ont démontré un niveau d'activité Arg-gingipaine environ deux fois supérieur à celles ayant poussé en présence d'hémine. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par U et coll. (140) qui ont démontré que l'hémine inhibait l'activité Arg-gingipaine chez *P. gingivalis* W83. En ce qui a trait à l'activité Lys-gingipaine, les cellules ayant été cultivées en présence de transferrine ont démontré un niveau environ deux fois plus fort de cette activité par rapport aux cellules cultivées en absence de fer ou en présence d'hémine. Les cellules ayant poussées dans des conditions de croissance riche ou pauvre en fer ont dégradé la transferrine de façon similaire. Ces dernières expériences mériteraient cependant d'être répétées avec des cellules récoltées au même stade de leur développement, par exemple en phase exponentielle. En effet, les cellules ayant poussé dans une condition pauvre en fer n'étaient sûrement pas au même stade que celles ayant poussé dans une condition riche en fer.

En conclusion, la transferrine représente une source de fer utilisable par *P. gingivalis*. Le mécanisme par lequel ce microorganisme acquiert le fer de la transferrine implique une activité protéolytique envers la protéine. D'ailleurs, *P. gingivalis* dégrade la transferrine en fragments de faible poids moléculaire lors d'une croissance ou d'une incubation *in vitro*. Cette dégradation de la transferrine apparaît nécessaire à l'acquisition du fer de la protéine. Enfin, la possession d'au moins une des deux principales activités protéolytiques, Arg- ou Lys-gingipaine, semble essentielle pour que *P. gingivalis* puisse dégrader et utiliser la transferrine comme source de fer.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bercy, P. 1996. Le parodonte sain et ses modifications histopathologiques, p. 13-23. Dans : Parodontologie du diagnostic à la pratique. DeBoeck Université, Paris.
2. Suzuki, J.B. et Charon, J.A. 1989. Classification actuelle des maladies parodontales. J. Parodontol. 8 : 31-51.
3. Williams, R.C. 1990. Periodontal disease. New England J. Med. 322 : 373-382.
4. Schluger, S., Yuodelis, R.A. et Page, R.C. 1977. Periodontal disease, p. 8-55. Henry Kimpton Publishers, London.
5. Mukherjee, S. 1985. The role of crevicular fluid iron in periodontal disease. J. Periodontol. 56 : 22-27.
6. Mouton, C. 1996. Bactériologie et pathogénicité des maladies parodontales, p. 37-47. Dans : Parodontologie du diagnostic à la pratique. DeBoeck Université, Paris.
7. Slots, J. et Rams, T.E. 1992. Microbiology of periodontal disease, p. 425-443. Dans : Contemporary oral microbiology and immunology. Slots, J. et Taubman, M.A. (eds). Mosby-Year Book, St-Louis, Missouri.
8. Mouton, C. et Robert, J.-C. 1994. Bactériologie bucco-dentaire, p. 134-159. Masson, Paris.
9. Listgarten, M.A. 1976. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. J. Periodontol. 47 : 1-18.

10. Moore, W.E.C., Ranney, R.R. et Holdeman, L.V. 1982. Subgingival microflora in periodontal disease : cultural studies, p. 13-26. Dans : Host parasite interactions in periodontal disease. Genco, R.J. et Mergenhagen, S.E. (eds). American Society for Microbiology, Washington DC.
11. Haffajee, A.D. et Socransky, S.S. 1994. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol.* 2000. 5 : 78-111.
12. Bercy, P. 1996. Épidémiologie et étiologie des maladies parodontales, p. 25-36. Dans : Parodontologie du diagnostic à la pratique. DeBoeck Université, Paris.
13. Eley, B.M. et Cox, S.W. 1998. Advances in periodontal diagnosis : 5. Potential inflammatory and immune markers. *Br. Dent. J.* 184 : 220-223.
14. Eley, B.M. et Cox, S.W. 1998. Advances in periodontal diagnosis : 6. Proteolytic and hydrolytic enzymes of inflammatory cell origin. *Br. Dent. J.* 184 : 268-271.
15. Tanner, A. 1991. Microbial succession in the development of periodontal disease, p.13-25. Dans : Periodontal disease : pathogens & host immune responses. Hamada, S., Holt, S.C. et McGhee, J.R. (eds). Quintessence Publishing Co, Tokyo.
16. van Steenberghe, T.J.M., van Winkelhoff, A.J. et de Graaff, J. 1991. Black pigmented anaerobic rods : classification and role in periodontal disease, p. 41-52. Dans : Periodontal disease : pathogens & host immune responses. Hamada, S., Holt, S.C. et McGhee, J.R. (eds). Quintessence Publishing Co, Tokyo.
17. Dahlen, G.G. 1993. Black pigmented Gram negative anaerobes in periodontitis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 6 : 181-192.
18. Grenier, D. et Turgeon, J. 1994. Occurrence and identity of proteolytic bacteria in adult periodontitis. *J. Periodont. Res.* 29 : 365-370.

19. Simonson, L.G., Robinson, P.J., Pranger, R.J., Cohen, M.E. et Morton, H.E. 1992. *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* as prognostic markers following periodontal treatments. *J. Periodontol.* 63 : 270-273.
20. McKee, A.S., McDermid, A.S., Baskerville, A., Dowsett, A.B., Ellwood, D.C. et Marsh, P.D. 1986. Effect of hemin on the physiology and virulence of *Porphyromonas gingivalis* W50. *Infect. Immun.* 52 : 349-355.
21. Grenier, D. et Mayrand, D. 1986. Nutritionnal relationship between oral bacteria. *Infect. Immun.* 53 : 616-620.
22. McDermid, A.S., McKee, A.S. et Marsh, P.D. 1988. Effect of environmental pH on enzyme activity and growth of *Porphyromonas gingivalis* W50. *Infect. Immun.* 56 : 1096-1100.
23. Hannele, J.-S.R. 1995. Update on the taxonomy and the clinical and laboratory characteristics of pigmented anaerobic Gram-negative rods. *Clin. Infect. Dis.* 20 : 187-191.
24. Shah, H.N. et Collins, M.D. 1989. Proposal to restrict the genus *Bacteroides* (Castellani and Chalmers) to *Bacteroides fragilis* and closely related species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39 : 85-87.
25. Shah, H.N. et Collins, M.D. 1990. *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40 : 205-208.
26. Love, D.N., Bailey, G.D., Collings, S. et Briscoe, D.A. 1992. Description of *Porphyromonas circumdentaria* sp. nov. and reassignment of *Bacteroides salivus* as *Porphyromonas salivosa* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42 : 434-438.

27. Love, D.N., Karjalainen, J., Kanervo, A., Forsblom, B., Sarkiala, E., Bailey, G.D., Wigney, D.I. et Jousimies-Somer, H. 1994. *Porphyromonas canoris* sp. nov., an asaccharolytic, black pigmented species from periodontal pockets of dogs. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44 : 204-208.
28. Tanner, A., Lai, C.-H. et Maiden, M. 1992. Characteristics of oral Gram-negative species, p. 299-341. Dans : *Contemporary oral microbiology and immunology*. Reinhardt, R.W. (ed.). Mosby-Year Book, St-Louis, Missouri.
29. Grenier, D. et Mayrand, D. 1993. Proteinases, p. 228-243. Dans : *Biology of the species Porphyromonas gingivalis*. Shah, H.N., Mayrand, D. et Genco, R.J. (eds.). CRC Press, London.
30. Mayrand, D. et Holt, S.C. 1988. Biology of asaccharolytic black pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol. Rev.* 52 : 134-152.
31. Yoneda, M. et Kuramitsu, H.K. 1996. Genetic evidence for the relationship of *Porphyromonas gingivalis* cysteine protease and hemagglutinin activities. *Oral Microbiol. Immunol.* 11 : 129-134.
32. Kuramitsu, H.K. 1994. Molecular genetic approaches for identifying virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*, p. 25-31. Dans : *Molecular pathogenesis of periodontal disease*. Genco, R.J., Hamada, S., Lehner, T., McGhee, J. et Mergenhagen, S. (eds). ASM Press, Washington DC.
33. Pavloff, N., Potempa, J., Pike, R.N., Prochazka, V., Kiefer, M.C., Travis, J. et Barr, P.J. 1995. Molecular cloning and structural characterization of the Arg-gingipain proteinase of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Biol. Chem.* 270 : 1007-1010.

34. Potempa, J., Pike, R. et Travis, J. 1997. Titration and mapping of the active site of cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* (gingipains) using peptidyl chloromethanes. *Biol. Chem.* 378 : 223-230.
35. Bhogal, P.S., Slakeski, N. et Reynolds, E.C. 1997. A cell-associated protein complex of *Porphyromonas gingivalis* W50 composed of Arg- and Lys-specific cysteine proteinases and adhesins. *Microbiology* 143 : 2485-2495.
36. Abe, N., Kadowaki, T., Okamoto, K., Nakayama, K., Ohishi, M. et Yamamoto, K. 1997. Biochemical and functional properties of Lys-specific cysteine proteinase (Lys-gingipain) as a virulence factor of *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. *J. Biochem.* 123 : 305-312.
37. Roose, J.P. et Van Noorden, C.J.F. 1995. Synthetic protease inhibitors : promising compounds to arrest pathobiologic processes. *J. Lab. Clin. Med.* 125 : 433-441.
38. Rangarajan, M., Aduse-Opoku, J., Slaney, J.M., Young, K.A. et Curtis, M.A. 1997. The *prpR1* and *prpR2* arginine-specific protease genes of *Porphyromonas gingivalis* W50 produce five biochemically distinct enzymes. *Microbiology* 23 : 955-965.
39. Okamoto, K., Misumi, Y., Kadowaki, T., Yoneda, M., Yamamoto, K. et Ikehara, Y. 1995. Structural characterization of argingipain, a novel arginine-specific cysteine protease as a major periodontal pathogenic factor from *Porphyromonas gingivalis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 316 : 917-925.
40. Aduse-Opoku, J., Muir, J., Slaney, J.M., Rangarajan, M. et Curtis, M.A. 1995. Characterization, genetic analysis, and expression of a protease antigen (PrpRI) of *Porphyromonas gingivalis* W50. *Infect. Immun.* 63 : 4744-4754.

41. Fletcher, H.M., Schenkein, H.A. et Macrina, F.L. 1994. Cloning and characterization of a new protease gene (*prtH*) from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 62 : 4279-4286.
42. Tokuda, M., Karunakaran, T., Duncan, M., Hamada, N. et Kuramitsu, H. 1998. Role of Arg-gingipain A in virulence of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 66 : 1159-1166.
43. Curtis, M.A. 1997. Analysis of the protease and adhesin domains of the PrpR1 of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodont. Res.* 32 : 133-139.
44. Curtis, M.A., Aduse-Opoku, J., Slaney, J.M., Rangarajan, M., Booth, V., Cridland, J. et Shepherd, P. 1996. Characterization of an adherence and antigenic determinant of the ArgI protease of *Porphyromonas gingivalis* which is present on multiple gene products. *Infect. Immun.* 64 : 2532-2539.
45. Okamoto, K., Kadowaki, T., Nakayama, K. et Yamamoto, K. 1996. Cloning and sequencing of the gene encoding a novel lysine-specific cysteine proteinase (Lys-gingipain) in *Porphyromonas gingivalis* : structural relationship with the arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain). *J. Biochem.* 120 : 398-406.
46. Chandad, F., Mayrand, D., Grenier, D., Hinode, D. et Mouton, C. 1996. Selection and phenotypic characterization of nonhemagglutinating mutants of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 64 : 952-958.
47. Nakayama, K., Kadowaki, T., Okamoto, K. et Yamamoto, K. 1995. Construction and characterization of arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain)-deficient mutants of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Biol. Chem.* 270 : 23619-23626.

48. Aduse-Opoku, J., Rangarajan, M., Young, K.A. et Curtis, M.A. 1998. Maturation of the arginine-specific proteases of *Porphyromonas gingivalis* W50 is dependent on a functional *prR2* protease gene. *Infect. Immun.* 66 : 1594-1600.
49. Umezawa, K., Aoyagi, T., Tanaka, W. et Takeuchi, T. 1993. Low-molecular-weight protease inhibitors of microbial origin, p. 131-139. Dans : *Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents*. Troll, W. et Kennedy, A.R. (eds). Plenum Press, New York.
50. Grenier, D. 1991. Production of trypsin and chymotrypsin inhibitors by oral bacterial isolates. *J. Periodont. Res.* 26 : 361-387.
51. Wingender, W. 1974. Proteinase inhibitors of microbial origin, a review, p. 548-599. Dans : *Proteinase inhibitors*. Springer-Verlag, Allemagne.
52. Millet, J. 1977. Characterization of a protein inhibitor of intracellular protease from *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett.* 74 : 59-61.
53. Chung, C.H., Ives, H.E., Almeda, S. et Goldberg, A.L. 1983. Purification from *Escherichia coli* of a periplasmic protein that is a potent inhibitor of pancreatic proteases. *J. Biol. Chem.* 258 : 11032-11038.
54. Létoffé, S., Delepelaire, P. et Wandersman, C. 1989. Characterization of a protein inhibitor of extracellular proteases produced by *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* 3 : 79-86.
55. DeClerck, Y.A. et Imren, S. 1994. Protease inhibitors : role and potential therapeutic use in human cancer. *Eur. J. Cancer* 30A : 2170-2180.

56. Schnebli, H.P. et Braun, N.J. 1986. Proteinase inhibitors as drugs, p.613-627. Dans : Proteinase inhibitors. A.J. Barrett et G. Salvesen (eds.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
57. Barrett A.J. 1977. Proteinase inhibitors : potential drugs?, p. 219-229. Dans : Proteinase in mammalian cells and tissues. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
58. Cazzulo, J.J. et Frasch, A.C.C. 1992. SAPA/transsialidase and cruzypain : two antigens from *Trypanosoma cruzi* contain immunodominant but enzymatically inactive domains. FASEB J. 6 : 3259-3264.
59. Franke de Cazzulo, B.M., Martinez, J., North, M.J., Coombs, G.H. et Cazzulo, J.-J. 1994. Effects of proteinase inhibitors on the growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol. Lett. 124 : 81-86.
60. Miyagawa, S.-I., Nishino, N., Kamata, R., Okamura, R.-I. et Maeda, H. 1991. Effects of protease inhibitors on growth of *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol. Pathogen. 11 : 137-141.
61. Kessler, E. et Safrin, M. 1982. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* and secretion of protease in the presence of the protease inhibitors. Metab. Pediatr. Syst. Ophthalmol. 6 : 331-336.
62. Grenier, D. 1992. Effect of protease inhibitors on *in vitro* growth of *Porphyromonas gingivalis*. Microb. Ecol. Hlth. Dis. 5 : 133-138.
63. Umemoto, T., Naito, Y., Li, M., Suzuki, I. et Namikawa, I. 1996. Growth inhibition of a human oral bacterium *Porphyromonas gingivalis* by rat cysteine proteinase inhibitor cystatin S. Lett. Appl. Microbiol. 23 : 151-153.

64. Wooldridge, K.G. et Williams, P.H. 1993. Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12 : 325-348.
65. Wilson, M.E., Vorhies, R.W., Anderson, K.A. et Britigan, B.E. 1994. Acquisition of iron from transferrin and lactoferrin by the protozoan *Leishmania chagasi*. *Infect. Immun.* 62 : 3262-3269.
66. Neilands, J.B. 1995. Siderophores : structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270 : 26723-26726.
67. Price, C.A. et Carell, E.F. 1964. Control by iron of chlorophyll formation and growth in *Euglena gracilis*. *Plant Physiol.* 39 : 862-868.
68. Weinberg, E.D. 1978. Iron and infection. *Microbiol. Rev.* 42 : 45-66.
69. Reichard, P. et Ehrenberg, A. 1983. Ribonucleotide reductase – a radical enzyme. *Science* 221 : 514-519.
70. Shoji, A. et Ozawa, E. 1985. Requirement of Fe ion for activation of RNA polymerase. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.* 61 : 494-496.
71. Shoji, A. et Ozawa, E. 1986. Necessity of transferrin for RNA synthesis in chick myotubes. *J. Cell. Physiol.* 127 : 349-356.
72. Nozaki, M. et Ishimura, Y. 1974. Oxygenases, p. 417-444. Dans : *Microbial iron metabolism : a comprehensive treatise*. Neilands, J.B. (ed.). Academic Press, New York.
73. Wrigglesworth, J.M. et Baum, H. 1980. The biochemical functions of iron, p. 29-86. Dans : *Iron in biochemistry and medicine*. Jacobs, A. et Worwood, M. (eds). Academic Press, London.

74. Halliwell, B. et Gutteridge, J.M.C. 1985. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford.
75. Neilands, J.B. 1981. Microbial iron compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 50 : 715-731.
76. Neilands, J.B. 1981. Iron absorption and transport in microorganisms. *Ann. Rev. Nutr.* 1 : 27-45.
77. Weinberg, E.D. 1995. Acquisition of iron and other nutrients *in vivo*, p. 79-93. Dans : Virulence mechanisms of bacterial pathogens. J.A. Roth, C.A. Bolin, K.A. Brodgen, F.C. Minion et M.J. Wannemuehler (eds.). American Society for Microbiology, Washington DC.
78. Weinberg, E.D. 1990. Roles of trace metals in transcriptional control of microbial secondary metabolism. *Biol. Metals* 2 : 191-196.
79. Weinberg, E.D. 1970. Biosynthesis of secondary metabolites : roles of trace metals. *Adv. Microb. Physiol.* 4 : 1-44.
80. Weinberg, E.D. 1971. Roles of iron in host-parasite interactions. *J. Infect. Dis.* 124 : 401-410.
81. Weinberg, E.D. 1972. Systemic salmonellosis : a sequela of sideremia. *Tex. Rep. Biol. Med.* 30 : 277-286.
82. Weinberg, E.D. 1974. Iron and susceptibility to infectious disease. *Science* 184 : 952-956.
83. Weinberg, E.D. 1984. Iron withholding : a defense against infection and neoplasia. *Physiol. Rev.* 64 : 65-102.

84. Brock, J.H. et Mainou-Fowler, T. 1986. Iron and immunity. Proc. Nutr. Soc. 45 : 305-315.
85. Dallman, P.R. 1986. Biochemical basis for the manifestations of iron deficiency. Ann. Rev. Nutr. 6 : 13-40.
86. Yamamoto, S., Okujo, N., Matsuura, S., Fujiwara, I., Fujita, Y. et Shinoda, S. 1994. Siderophore-mediated utilization of iron bound to transferrin by *Vibrio parahaemolyticus*. Microbiol. Immunol. 38 : 687-693.
87. Deis, A. 1983. Iron metabolism in reticuloendothelial cells. Sem. Hematol. 20 : 81-90.
88. Theil, E.C. 1987. Ferritin : structure, gene regulation and cellular function in animals, plants and microorganisms. Ann. Rev. Biochem. 56 : 289-315.
89. Otto, B.R., Verweij-van Vught, A.M.J.J. et MacLaren, D.M. 1992. Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. Crit. Rev. Microbiol. 18 : 217-233.
90. Ford, S., Cooper, R.A., Evans, R.W., Hider, R.C. et Williams, P.H. 1988. Domain preference in iron removal from human transferrin by the bacterial siderophores aerobactin and enterochelin. Eur. J. Biochem. 178 : 477-481.
91. Makey, D.G. et Seal, U.S. 1976. The detection of four molecular forms of human transferrin during the iron binding process. Biochim. Biophys. Acta 453 : 250-256.
92. Putnam, F.W. 1975. Transferrin, p.265-316. Dans : The plasma proteins structure, function, and genetic control. Putnam, F.W. (ed.). Academic Press, London.

93. Cowart, R.E. et Foster, B.G. 1985. Differential effects of iron on the growth of *Listeria monocytogenes* : minimum requirements and mechanism of acquisition. *J. Infect. Dis.* 151 : 721-730.
94. Robins-Browne, R.M., Prpic, J.K. et Stuart, S.J. 1987. *Yersinia* and iron : a study in host-parasite relationships. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 9 : 254-258.
95. Benjamin, W.H., Turnbough, C.L., Posey, B.S. et Briles, D. 1985. The ability of *Salmonella typhimurium* to produce the siderophore enterobactin is not a virulence factor in mouse typhoid. *Infect. Immun.* 50 : 392-397.
96. Lawlor, K.M., Daskaleros, P.A., Robinson, R.E. et Payne, S.M. 1987. Virulence of iron transport mutants of *Shigella flexneri* and utilization of host compounds. *Infect. Immun.* 55 : 594-599.
97. Weinberg, E.D. 1989. Cellular regulation of iron assimilation. *Quart. Rev. Biol.* 64 : 261-290.
98. Morgan, E.H. 1981. Transferrin : biochemistry, physiology and clinical significance. *Mol. Asp. Med.* 4 : 1-123.
99. Cavalieri, S.J., Bohach, G.A. et Snyder, I.S. 1984. *Escherichia coli* α -hemolysin : characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol. Rev.* 48 : 326-343.
100. Eaton, J.W., Brandt, P., Mahoney, J.R. et Lee, J.T. 1982. Haptoglobin : a natural bacteriostat. *Science* 215 : 691-693.
101. Pidcock, K.A., Wooten, J.A., Daley, B.A. et Stull, T.L. 1988. Iron acquisition by *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* 56 : 721-725.

102. Hirst, I.A. et Ellis, A.E. 1996. Utilization of transferrin and salmon serum as sources of iron by typical and atypical strains of *Aeromonas salmonicida*. *Microbiology* 142 : 1543-1550.
103. Schryvers, A.B. et Lee, B.C. 1988. Comparative analysis of the transferrin and lactoferrin binding proteins in the family *Neisseriaceae*. *Can. J. Microbiol.* 35 : 409-415.
104. Lee, B.C. et Bryan, L.E. 1989. Identification and comparative analysis of the lactoferrin and transferrin receptors among clinical isolates of gonococci. *J. Med. Microbiol.* 28 : 199-204.
105. Herrington, D.A. et Sparling, P.F. 1985. *Haemophilus influenzae* can use human transferrin as a sole source for required iron. *Infect. Immun.* 48 : 248-251.
106. Menozzi, F.D., Gantiez, C. et Loch, C. 1991. Identification and purification of transferrin- and lactoferrin-binding proteins of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.* 59 : 3982-3988.
107. Ascencio, F., Ljungh, A. et Wadstrom, T. 1992. Characteristics of lactoferrin binding by *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 42-47.
108. Chart, H. et Trust, T.J. 1983. Acquisition of iron by *Aeromonas salmonicida*. *J. Bacteriol.* 156 : 758-764.
109. Kishore, A.R., Erdei, J., Naidu, S.S., Falsen, E., Forsgren, A. et Naidu, A.S. 1991. Specific binding of lactoferrin to *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* 83 : 115-120.

110. Chen, C.-Y., Berish, S.A., Morse, S.A. et Mietzner, T.A. 1993. The ferric iron-binding protein of pathogenic *Neisseria spp.* functions as a periplasmic transport protein in iron acquisition from human transferrin. *Mol. Microbiol.* 10 : 311-318.
111. Gueniro, M.L. 1994. Microbial iron transport. *Annu. Rev. Microbiol.* 48 : 743-772.
112. Payne, S.M. 1988. Iron and virulence in the family *Enterobacteriaceae*. *Crit. Rev. Microbiol.* 16 : 81-101.
113. Neilands, J.B., Bindereif, A. et Montgomerie, J.Z. 1985. Genetic basis of iron assimilation in pathogenic *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 118 : 179-185.
114. Sigel, S.P. et Payne, S.M. 1982. Effect of iron limitation on growth, siderophore production, and expression of outer membrane proteins of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 150 : 148-154.
115. Wolz, C., Hohloch, K., Ocaktan, A., Poole, K., Evans, R.W., Rochel, N., Albrecht-Gary, A.-M., Abdallah, M.A. et Döring, G. 1994. Iron release from transferrin by pyoverdine and elastase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 62 : 4021-4027.
116. Morrissey, J.A., Williams, P.H. et Cahsmore, A.M. 1996. *Candida albicans* has a cell-associated ferric-reductase activity which is regulated in response to levels of iron and copper. *Microbiology* 142 : 485-492.
117. Evans, S.L., Arceneaux, J.E.L., Byers, B.R., Martin, M.E. et Aranha, N. 1986. Ferrous iron transport in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 168 : 1096-1099.

118. Döring, G., Pfestorf, M., Botzenhart, K. et Abdallah, M.A. 1988. Impact of proteases on iron uptake of *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdinin from transferrin and lactoferrin. *Infect. Immun.* 56 : 291-293.
119. Okujo, N., Akiyama, T., Miyoshi, S.-I., Shinoda, S. et Yamamoto, S. 1996. Involvement of vulnibactin and exocellular protease in utilization of transferrin- and lactoferrin-bound iron by *Vibrio vulnificus*. *Microbiol. Immunol.* 40 : 595-598.
120. Kishore, A.R., Erdei, J., Naidu, S.S., Falsen, E., Forsgren, A. et Naidu, A.S. 1991. Specific binding of lactoferrin to *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* 83 : 115-120.
121. Kluger, M.J. et Bullen, J.J. 1987. Clinical and physiological aspects, p. 243-282. Dans : *Iron and infection : molecular, physiological and clinical aspects*. Bullen, J.J. et Griffiths, E. (eds). Wiley, Chichester.
122. Brochu, V., Grenier, D. et Mayrand, D. 1998. Human transferrin as a source of iron for *Streptococcus intermedius*. *FEMS Microbiol. Lett.* 166 : 127-133.
123. Barua, P.K., Dyer, D.W. et Neiders, M.E. 1990. Effect of iron limitation on *Bacteroides gingivalis*. *Oral Microbiol. Immunol.* 5 : 263-268.
124. Shah, H.N., Bonnet, R., Mateen, B. et Williams, R.A.D. 1979. The porphyrin pigmentation of subspecies of *Bacteroides melaninogenicus*. *Biochem. J.* 180 : 45-50.
125. Bramanti, T.E. et Holt, S.C. 1991. Roles of porphyrins and host iron transport proteins in regulation of growth of *Porphyromonas gingivalis* W50. *J. Bacteriol.* 173 : 7330-7339.

126. Grenier, D. et Bélanger, M. 1991. Protective effect of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles against bactericidal activity of human serum. *Infect. Immun.* 59 : 3004-3008.
127. Shizukuishi, S., Tazaki, K., Inoshita, E., Kataoka, K., Hanioka, T. et Amano, A. 1995. Effect of concentration of compounds containing iron on the growth of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 131 : 313-317.
128. Tazaki, K., Inoshita, E., Amano, A., Hanioka, T., Tamagawa, H. et Shizukuishi, S. 1995. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with transferrin. *FEMS Microbiol. Lett.* 131 : 161-166.
129. Grenier, D. et Mayrand, D. 1987. Selected characteristics of pathogenic and nonpathogenic strains of *Bacteroides gingivalis*. *J. Clin. Microbiol.* 25 : 738-740.
130. Park, Y. et McBride, B.C. 1992. Characterization of the *tpr* gene product and isolation of a specific protease-deficient mutant of *Porphyromonas gingivalis* W83. *Infect. Immun.* 61 : 4139-4146.
131. Schryvers, A.B. 1989. Identification of the transferrin and lactoferrin binding proteins in *Haemophilus influenzae*. *J. Med. Microbiol.* 29 : 121-130.
132. Lindsay, J.A. et Riley, T.V. 1994. Staphylococcal iron requirements, siderophore production, and iron-regulated protein expression. *Infect. Immun.* 62 : 2309-2314.
133. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of a structural protein during the assemblage of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.
134. Inoshita, E., Iwakura, K., Amano, A., Tamagawa, H. et Shizukuishi, S. 1991. Effect of transferrin on the growth of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Dent. Res.* 70 : 1258-1261.

135. Onoe, T., Hoover, C.I., Nakayama, K., Ideka, T., Nakamura, H. et Yoshimura, F. 1995. Identification of *Porphyromonas gingivalis* prefimbrilin possessing a long leader peptide; possible involvement of trypsin-like protease in fimbriation maturation. *Microb. Pathogen.* 19 : 351-364.
136. Nakayama, K., Yoshimura, F., Kadowaki, T. et Yamamoto, K. 1996. Involvement of arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain) in fimbriation of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* 178 : 2818-2824.
137. Blankenvoorde, M.F.J., Henskens, Y.M.C., van't Hof, W., Veerman, E.C.I. et Nieuw Amerongen, A.V. 1996. Inhibition of the growth and cysteine proteinase activity of *Porphyromonas gingivalis* by human salivary cystatin S and chicken cystatin. *Biol. Chem.* 377 : 847-850.
138. van Steenberg, T.J.M. et de Graaff, J. 1986. Proteolytic activity of black-pigmented *Bacteroides* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 33 : 219-222.
139. Sundqvist, G. et Johansson, E. 1982. Bactericidal effect of pooled human serum on *Bacteroides melaninogenicus*, *Bacteroides asaccharolyticus* et *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Scand. J. Dent.* 90 : 29-36.
140. U, S., Harper, F. et Curtis, M.A. 1990. Haemin inhibits the trypsin-like enzyme activity of *Porphyromonas gingivalis* W83. *FEMS Microbiol. Lett.* 72 : 169-172.