

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Quand le métabolisme rencontre la virulence chez *Brucella abortus*

identification des acides aminés prélevés en cours d'infection de macrophages et mise en évidence du lien entre le système PTS et le métabolisme bactérien

Barbier, Thibault

*Award date:*  
2010

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX**

**NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Quand le métabolisme rencontre la virulence chez  
*Brucella abortus* :  
identification des acides aminés prélevés en cours d'infection de  
macrophages et mise en évidence du lien entre le système PTS et le  
métabolisme bactérien.**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade académique de**

**Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Thibault Barbier

Janvier 2010

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Quand le métabolisme rencontre la virulence chez *Brucella abortus* :  
identification des acides aminés prélevés en cours d'infection de macrophages  
et mise en évidence du lien entre le système PTS et le métabolisme bactérien.**

BARBIER Thibault

Résumé:

Au cours du processus d'infection, le pathogène intracellulaire *Brucella* doit faire face à d'importantes variations environnementales. Cette bactérie semble néanmoins avoir acquis la capacité d'adapter sa physiologie, son métabolisme vis-à-vis de la cellule hôte nouvellement colonisée. Un nombre croissant d'arguments démontrent que cette adaptation métabolique est nécessaire pour la survie du pathogène et l'instauration d'une infection. Toutefois, il n'existe à ce jour que peu d'information sur le métabolisme *in vivo* de *Brucella*, ce à quoi nous nous sommes intéressés.

Au cours de ce travail, les objectifs étaient doubles. D'une part nous avons tenté d'identifier les sources carbonées, et plus particulièrement les acides aminés, prélevés par *Brucella abortus* 2308 durant l'infection de macrophages murins RAW. Pour ce faire, nous avons eu recours à des expériences de marquage isotopique. D'autre part, nous avons initié la caractérisation du lien entre le système PTS<sup>Ntr</sup>, un phosphorelais dont la fonction serait essentiellement régulatrice, et le métabolisme chez ce même pathogène.

Nous avons ainsi montré que *Brucella* semble prélever de l'aspartate, de la sérine, du glutamate et de l'alanine à la cellule hôte. Parallèlement, nos résultats indiquent l'existence d'une activité biosynthétique bactérienne d'alanine et de glutamate. L'identification des sources carbonées servant à cette synthèse fera l'objet d'un travail futur.

Au niveau du système PTS, nos résultats mettent également en évidence l'existence d'un lien entre deux protéines de ce système, les protéines EIIA<sup>Ntr</sup> et EIIA<sup>Man</sup>, et la croissance de *Brucella* sur érythritol qui lui-même, constitue une source de carbone préférentielle. De plus, les protéines EIIA<sup>Ntr</sup> et NPr semblent être liées au métabolisme du glutamate, un acide aminé situé à un carrefour entre métabolisme de l'azote et du carbone. Ces observations supportent l'hypothèse que le PTS<sup>Ntr</sup> soit un système régulateur capable de moduler le métabolisme de *Brucella*.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2010

Promoteur: J.-J. Letesson

Quand le métabolisme rencontre la virulence chez *Brucella abortus* :  
identification des acides aminés prélevés en cours d'infection de macrophages et mise en évidence du lien  
entre le système PTS et le métabolisme bactérien.

### Errata

Veillez trouver ci-dessous la liste des erreurs relevées dans ce mémoire :

Au bas de la page 9, la note de bas de page est incomplète. Veuillez trouver ci-dessous la note complète :

«<sup>1</sup> Une réaction ou une voie est dite anaplérotique lorsqu'elle permet d'alimenter une voie métabolique en métabolites. Ces voies anaplérotiques permettent par exemple le maintien de concentrations constantes des métabolites du TCA malgré leur utilisation dans des voies biosynthétiques en conditions normales (adapté de David L. Nelson, M. M. C. (2005). Lehninger: Principles of biochemistry Freeman.). »

A la figure 5, page 10, seuls les précurseurs de biomasse les plus « classiquement » considérés ont été illustrés par souci de clarté. Sachez toutefois que le succinyl-coA ainsi que le sédoheptulose-7-phosphate, qui sont respectivement à la base de la synthèse d'hèmes et du LPS, sont également des précurseurs de biomasse.

Au tableau 1, page 12, la peptidoglycan transglycolase est une protéine impliquée dans le métabolisme de la membrane et non dans métabolisme des protéines membranaires.

A la page 56, dans le tableau décrivant la composition de la base minérale du milieu défini, veuillez lire 0,025 g de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et non de N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

---

# TABLE DES MATIERES

---

<b>Introduction</b>	<b>2</b>
<b>I. BRUCELLA : UNE BACTÉRIE QUI VALAIT 600 MILLIONS DE DOLLARS.....</b>	<b>3</b>
<b>II. LA PATHOGENÈSE DE BRUCELLA : IDENTIFICATION D’UN NOUVEL ACTEUR DÉTERMINANT DANS LA PATHOGENÈSE.....</b>	<b>4</b>
1. UN PATHOGENÈ ATYPIQUE AVEC PEU DE FACTEURS CLASSIQUES DE VIRULENCE.....	4
A. <i>Brucella</i> est capable de moduler la réponse immunitaire .....	4
B. L’internalisation dans la cellule hôte .....	5
C. Evasion vers le réticulum endoplasmique.....	6
2. LE MÉTABOLISME, UN NOUVEAU DÉTERMINANT MAJEUR DE VIRULENCE .....	7
<b>III. LE MÉTABOLISME DE BRUCELLA.....</b>	<b>9</b>
1. CONTRIBUTIONS DES ÉTUDES BIOCHIMIQUES ET DES SÉQUENCES GÉNOMIQUES.....	9
A. Une phosphofructokinase absente .....	10
B. Les cycles de Krebs et du glyoxylate sont complets.....	11
C. Une néoglucogenèse également complète.....	11
D. Particularités métaboliques de <i>Brucella</i> .....	11
2. PREMIÈRES INDICATIONS SUR LE MÉTABOLISME EN COURS D’INFECTION .....	12
A. Les enzymes métaboliques essentielles à la virulence.....	12
B. Le protéome de <i>Brucella</i> en cours d’infection révèle une adaptation métabolique progressive et majeure .....	14
3. MODÈLE PROPOSÉ D’ADAPTATION PHYSIOLOGIQUE EN COURS D’INFECTION .....	16
<b>IV. LE MARQUAGE ISOTOPIQUE ET LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE, DES OUTILS POUR INVESTIGUER LE MÉTABOLISME DE PATHOGENÈS <i>IN VIVO</i> .....</b>	<b>17</b>
1. LE PRINCIPE DU MARQUAGE.....	17
2. IDENTIFICATION DES ACIDES AMINÉS PRÉLEVÉS OU SYNTHÉTISÉS <i>DE NOVO</i> PAR <i>LISTERIA</i> EN COURS D’INFECTION .....	17
A. Infection de macrophages prémarqués.....	17
B. Marquage isotopique en cours d’infection .....	18
3. IDENTIFICATION DES SOURCES DE CARBONES DISPONIBLES EN COURS D’INFECTION.....	18
<b>V. LE SYSTÈME PTS, UN RÉGULATEUR MÉTABOLIQUE .....</b>	<b>19</b>
1. LES COMPOSANTS ET FONCTIONS DE CE SYSTÈME .....	19
2. LA RÉPRESSION CATABOLIQUE CARBONÉE (RCC) CHEZ <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	20
3. LA RCC CHEZ LES BACTÉRIES GRAM POSITIVES (AVEC UN FAIBLE CONTENU EN GC) .....	21
4. LE SYSTÈME PTS CHEZ <i>BRUCELLA</i> .....	22
A. Un système hybride.....	22
B. ...aux fonctions méconnues .....	23
<b>Objectifs du mémoire</b>	<b>26</b>
<b>Résultats</b>	<b>27</b>
<b>I. MISE AU POINT DU PROTOCOLE .....</b>	<b>28</b>
1. RÉCOLTE D’UNE MASSE SÈCHE 100 FOIS TROP FAIBLE .....	28
2. HELA, RAW OU J774 ? QUE LE PLUS FAIBLE GAGNE ! .....	30
3. UN PROTOCOLE DIRECTEMENT ADAPTÉ À <i>B. ABORTUS</i> 2308.....	30
<b>II. DONNÉES PRÉLIMINAIRES SUR LE MÉTABOLISME DES CELLULES RAW ET DE <i>B. ABORTUS</i> 2308 ..</b>	<b>31</b>
1. LES MACROPHAGES MURINS RAW SYNTHÉTISENT DE L’ALANINE, DE LA SÉRINE, DE LA GLYCINE, DE L’ASPARTATE ET DU GLUTAMATE <i>DE NOVO</i> .....	32

2. L'ALANINE EST L'ACIDE AMINÉ MAJORITAIREMENT MARQUÉ DANS LES DEUX FRACTIONS APRÈS UN MARQUAGE EN COURS D'INFECTION.....	32
3. IDENTIFICATION DES ACIDES AMINÉS FOURNIS PAR LA CELLULE HÔTE APRÈS PRÉMARQUAGE ISOTOPIQUE.....	33
4. LA SYNTHÈSE DE NOVO CHEZ BRUCELLA.....	33
A. L'aspartate et la sérine sont fournis par la cellule hôte.....	35
Le profil de l'aspartate.....	35
Le profil de la sérine.....	36
B. Le glutamate, de premiers indices sur une synthèse de novo par Brucella.....	37
C. Brucella abortus 2308 synthétise une partie de son alanine.....	38
1. LES EFFETS TRANSCRIPTIONNELS DES DÉLÉTIONS DE PTSM, PTSO ET HPRK.....	39
2. LES PROFILS DE CROISSANCE DES DÉLÉTANTS PTS : MISE EN ÉVIDENCE D'UN LIEN ENTRE PTS ET MÉTABOLISME DE L'ÉRYTHRITOL ET DU GLUTAMATE.....	40
3. LE MILIEU INFLUENCE LA MORPHOLOGIE DE B. ABORTUS 2308 ΔEI <sup>NTR</sup> .....	42

## Discussion 44

I. LE PROTOCOLE MIS AU POINT EST FONCTIONNEL.....	45
II. PREMIÈRES INDICATIONS SUR LE MÉTABOLISME DE LA CELLULE HÔTE ET DE B. ABORTUS 2308 .	45
1. LE MÉTABOLISME DES CELLULES RAW.....	45
A. Une voie glycolytique classique et un TCA actifs en conditions non infectantes.....	45
B. EMP et TCA également en cours d'infection.....	46
C. Le métabolisme de la bactérie.....	47
III. CARACTÉRISATION DU LIEN ENTRE PTS HYBRIDE ET MÉTABOLISME DU CARBONE ET DE L'AZOTE CHEZ BRUCELLA.....	49
1. LES EFFETS TRANSCRIPTIONNELS DE LA DÉLÉTION DE PTSO, PTSM ET D'HPRK.....	49
2. LE PTS ET LE MÉTABOLISME DU CARBONE.....	49
A. Les protéines EIIA et l'assimilation de l'érythritol.....	49
B. NPr et EIIA <sup>Ntr</sup> sont liées à la croissance sur glutamate.....	50
IV. L'INFLUENCE DE LA COMPOSITION ENVIRONNEMENTALE SUR LA MORPHOLOGIE DE B. ABORTUS 2308 ΔEI <sup>NTR</sup> .....	51
V. CONCLUSIONS.....	52

## Matériel et méthodes 54

I. SOUCHES, LIGNÉES ET PLASMIDES.....	55
1. SOUCHES BACTÉRIENNES.....	55
2. PLASMIDES.....	55
3. LIGNÉES DE CELLULES EUCARYOTES.....	55
II. MILIEUX, TAMPONS ET SOLUTIONS.....	56
1. MILIEUX DE CULTURE.....	56
2. TAMPONS ET SOLUTIONS.....	56
III. TECHNIQUES RELATIVES À L'UTILISATION DE BACTÉRIES.....	57
1. TRANSFORMATION BACTÉRIENNE PAR CHOC THERMIQUE.....	57
A. Principe.....	57
B. Méthode.....	57
2. LA CONJUGAISON.....	57
A. Principe.....	57
B. Méthode.....	57
3. CONSTRUCTION DE SOUCHES MUTANTES PAR REMPLACEMENT ALLÉLIQUE.....	58
A. Principe.....	58
B. Méthode.....	58
IV. TECHNIQUES RELATIVES AUX ACIDES NUCLÉIQUES.....	58

1. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) .....	58
2. ANALYSE DE L'EXPRESSION DE GÈNES PAR REAL TIME PCR (RT PCR) .....	59
A. <i>Principe</i> .....	59
B. <i>Méthode</i> : .....	59
<b>V. MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE D'INFECTION PAR BRUCELLA, DE LYSE ET DE FRACTIONNEMENT .....</b>	<b>60</b>
1. ADAPTATION DU PROTOCOLE D'EYLERT ET AL. ....	61
2. ADAPTATION DU PROTOCOLE DE LAMONTAGNE ET AL. ....	61
<b>VI. PROCÉDURES DE MARQUAGE ISOTOPIQUE .....</b>	<b>62</b>
1. PRINCIPE .....	62
2. MÉTHODE.....	63
A. <i>Marquage des macrophages non infectés (expérience 1)</i> .....	63
B. <i>Marquage isotopique en cours d'infection (expérience 2)</i> .....	63
C. <i>Prémarquage des cellules (expérience 3)</i> .....	63
<b>VII. TECHNIQUES RELATIVES À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE (ADAPTÉ DE LA THÈSE DE C. NICOLAS)63</b>	
1. TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS POUR ANALYSE GC/MS.....	63
2. L'ANALYSE DU MARQUAGE ISOTOPIQUE DES ACIDES AMINÉS PROTÉINOGENIQUES PAR GC/MS.....	64
A. <i>Principe général</i> .....	64
B. <i>Caractéristiques techniques générales des analyses GC/MS</i> .....	65
C. <i>Traitement des résultats</i> .....	65
<b>VIII. TEST DE CROISSANCE .....</b>	<b>66</b>
1. PRINCIPE .....	66
2. MÉTHODE.....	66
<b>IX. TECHNIQUES RELATIVES À LA MICROSCOPIE.....</b>	<b>66</b>
1. EVALUATION DE L'EFFICACITÉ D'INFECTION DE CELLULES HELA PAR <i>B. MELITENSIS 16M MCHERRY</i> .....	66
2. TEST DE VIABILITÉ LIVE/DEAD.....	66
3. OBSERVATIONS DE <i>B. ABORTUS 2308</i> .....	66

<b>Bibliographie</b>	<b>67</b>
----------------------	-----------

<b>Annexe</b>	<b>74</b>
---------------	-----------

---

## Liste des abréviations courantes

---

βGC	β1,2 glucane cyclique
ACOA	acétyl-CoA
AKG	alpha-cétoglutarate
Btp1	<i>Brucella</i> -Tir-protein 1
cAMP	AMP cyclique
cDNA	ADN complémentaire
CFU	Colony Forming Unit
DHAP	dihydroxyacétone phosphate
DO	Densité Optique
E4P	érythrose-4-phosphate
ED	voie d'Entner-Doudoroff
EI	Enzyme I
EII	Enzyme II
EMP	voie d'Emden-Meyerhof-Parnas
F6P	fructose-6-phosphate
G6P	glucose-6-phosphate
GAP	glycéraldéhyde 3-phosphate
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GC/MS	spectrométrie de masse couplée à de la chromatographie en phase gazeuse
GLC	glucose
HPr	heat-stable, histidine-phosphorylatable protein
HprK/P	HPr kinase/phosphatase
IFN-γ	Interféron -γ
IOAA	Indice d'origine d'un acide aminé
LPS	Lipopolysaccharide
MOI	Modality of Infection
OAA	oxaloacétate
OMP	Outer Membrane Protein
PC	Phosphatidylcholine
PEP	phosphoénol pyruvate
PP	voie des pentoses phosphate
PRD	PTS Regulatory Domain
PTS	phosphoénolpyruvate : carbohydate phosphotransferase
R5P	ribose-5-phosphate
RCC	répression catabolique carbonée
RPM	Rotation par minute
SP41	Surface Protein (41 kDa)
TCA	cycle des acides tricarboxyliques
TLR	Toll-like Receptor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α
VEM	Valeurs d'excédent de marquage
WT	Wild Type

---

# Avant propos

---

Les maladies infectieuses constituent une menace grandissante vis-à-vis de la sécurité sanitaire mondiale. En effet, un nombre croissant d'organismes responsables d'infections chez l'homme développe des mécanismes de résistance contre les thérapies existantes. C'est le cas notamment du bien connu *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline (MRSA) (Goering, Shawar et al. 2008) ainsi que des entérobactéries produisant des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu telles que *Klebsiella pneumoniae* ou encore *Escherichia coli*. Ces dernières sont dès lors devenues résistantes aux antibiotiques avec noyau  $\beta$ -lactame (Hawkey and Jones 2009). L'émergence de ces mécanismes de résistance est en outre plus rapide que le développement de nouvelles antibiothérapies (Levy and Marshall 2004). C'est pourquoi, afin d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques, il devient nécessaire d'acquérir une meilleure compréhension des pathogénèses bactériennes.

De nombreuses études s'y sont d'ores et déjà attelées et ont largement contribué à élargir nos connaissances, notamment sur les facteurs de virulence. En parallèle de cet aspect de la pathogénèse, très peu d'intérêt a été porté au métabolisme. Il s'agit pourtant de l'un des fondements même de l'instauration d'une infection. En effet, quel besoin est plus fondamental pour une bactérie que celui de pouvoir disposer des nutriments nécessaires à sa survie, à sa croissance ? Ainsi, le métabolisme d'un pathogène constitue une nouvelle cible thérapeutique potentielle qui devra toutefois être plus amplement caractérisée au préalable.

---

# Introduction

---

# Introduction

## I. *Brucella* : une bactérie qui valait 600 millions de dollars

Avec 500 000 nouveaux cas recensés chaque année, la brucellose est la zoonose (*i.e* maladie transmissible entre l'homme et des espèces animales) la plus répandue de par le monde (Fig. 1) (Corbel 1997; Pappas, Papadimitriou et al. 2006). Cette pathologie est causée par des cocco-bacilles Gram négatifs appartenant à la classe des alpha-protéobactéries et au genre *Brucella*. Actuellement, 9 espèces ont été recensées, chacune ayant une spécificité d'hôte bien précise (International Committee on Systematics of Prokaryotes) (Moreno, Cloeckaert et al. 2002). Deux des espèces les plus importantes sont *Brucella abortus*, responsable de la brucellose bovine et *B. melitensis*, responsable de la brucellose ovine et caprine. Toutes deux sont également capables d'infecter l'homme qui est un hôte accidentel et constitue un cul de sac épidémiologique (Corbel 1997).

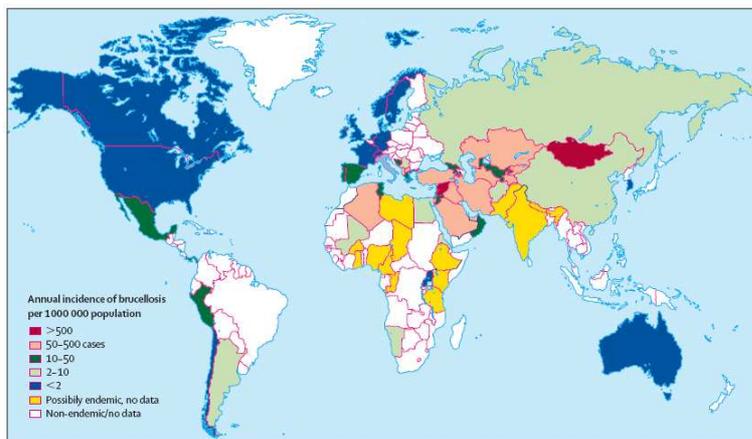


Figure 1. Taux d'incidence annuel des cas de brucellose recensés dans le monde (nombre de cas/10<sup>6</sup> individus). Les cas de brucellose humaine se localisent essentiellement dans les pays en voies de développement. Le nord de l'Afrique et le Moyen-Orient sont en particulier touchés (incidence moyenne de 50 à 500, en rose). Un taux record de 600 cas/10<sup>6</sup> individus est détecté en Mongolie. Quant à la faible incidence de pays tels que les Etats Unis, l'Australie et de nombreux pays d'Europe, elle s'explique par l'efficacité des politiques sanitaires onéreuses qui ont été mises en place (Pappas, Papadimitriou et al. 2006).

La contamination se fait classiquement après ingestion ou contact avec du matériel contaminé comme le lait, que ce soit chez l'homme ou l'animal. Une fois l'hôte envahi, le pathogène intracellulaire qu'est *Brucella* est capable d'infecter divers types cellulaires telles que des cellules épithéliales. Toutefois, ce pathogène semble présenter un tropisme préférentiel pour les cellules phagocytaires (Moreno 2006; Gorvel 2008). Les manifestations principales de la brucellose animale sont l'avortement des femelles et la stérilité des mâles ; d'où un impact économique important de la maladie (Moreno 2006). Quant à la forme humaine de la pathologie, les symptômes sont variables avec fréquemment des fièvres ondulantes, malaises, gonflement des ganglions lymphatiques (lymphadénopathie) ainsi que de l'hépatosplénomégalie. La maladie peut également s'aggraver et provoquer de l'arthrite, des épидидymites voire même des endocardites, des spondylodiscites ou encore aboutir à des formes neurologiques qui sont potentiellement létales (Moreno 2006; Mantur, Amarnath et al. 2007; Gorvel 2008).

Afin de contrôler la pathologie humaine, des politiques de surveillance des animaux qui constituent le réservoir naturel de la brucellose ont été mises en place. Ces mesures ont permis de contrôler la maladie dans de nombreux pays développés et ce à grands frais. En effet, il a été estimé que la politique sanitaire menée aux USA durant les années 1990 a nécessité l'investissement de près de 150 millions de dollars US par an. Ce coût reste néanmoins inférieur aux pertes générées par la maladie, cantonnée à présent dans les pays en voie de développement, avec près de 600 millions de dollars US de pertes annuelles uniquement pour l'Amérique Latine (Boschioli, Foulongne et al. 2001). Ainsi, de par sa

distribution étendue, au vu de la morbidité importante qu'elle provoque et de son impact économique, la brucellose est une pathologie dont l'étude est de premier intérêt avec la perspective qu'un jour, grâce à une meilleure compréhension de sa pathogénèse, il soit possible de la contrôler à moindre coût.

## II. La pathogénèse de *Brucella* : identification d'un nouvel acteur déterminant dans la pathogénèse

### 1. Un pathogène atypique avec peu de facteurs classiques de virulence

*Brucella* est capable d'infecter et de se multiplier au sein de cellules immunitaires qui sont pourtant spécialisées dans l'élimination des pathogènes. Pour y parvenir, cette bactérie a acquis des mécanismes lui permettant de pénétrer et de persister dans la cellule hôte en évitant une réponse microbicide délétère trop importante. Ces mécanismes reposent sur des facteurs de virulence qui, de par leur caractère essentiel dans la pathogénèse, ont largement été investigués.

Ces études ont révélé que, contrairement à la plupart des bactéries pathogènes, *Brucella* dispose d'un nombre restreint de facteurs de virulence classiques. En effet, *Brucella* ne semble pas posséder d'exotoxine, de cytolysine, de fimbrie, de lipopolysaccharide (LPS) endotoxique, de capsule ou encore d'exoenzyme (Letesson, Lestrade et al. 2002; Moreno 2006). Quant aux quelques facteurs identifiés, ils ne sont autres que les acteurs moléculaires impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire (Billard, Dornand et al. 2007), dans le processus d'invasion de la cellule hôte (Moreno 2006), dans la survie de la bactérie une fois internalisée (Guzman-Verri, Chaves-Olarte et al. 2001) et les facteurs permettant à *Brucella* de rejoindre sa niche de réplication (Pizarro-Cerda, Meresse et al. 1998). Les différents facteurs majeurs qui ont été identifiés sont décrits brièvement ci-dessous

#### A. *Brucella* est capable de moduler la réponse immunitaire

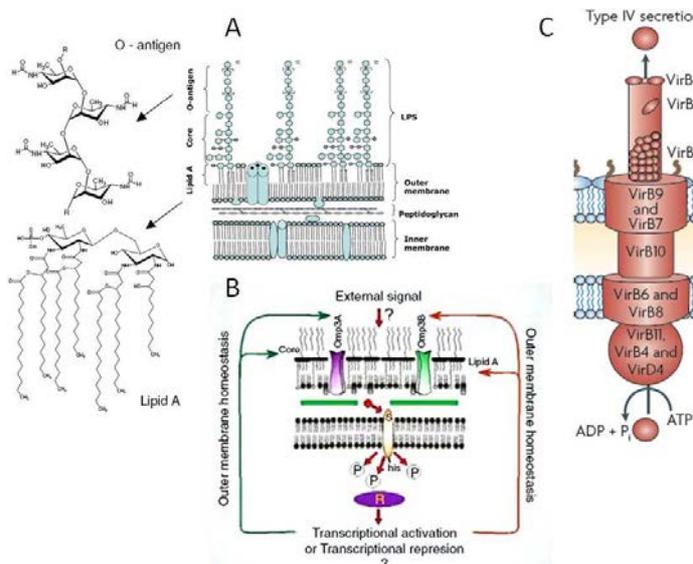
Qu'il soit intra ou extracellulaire, un pathogène doit généralement pour établir une infection, être capable de faire face au système immunitaire de son hôte. Dans le cas de *Brucella*, il est intéressant de noter que, comme il l'a déjà été signalé, la bactérie se cache du système immunitaire au sein même de ce système (Letesson, Lestrade et al. 2002).

Pour y parvenir, *Brucella* dispose, au niveau de sa membrane externe, d'un lipopolysaccharide (LPS) atypique qui présente une structure et des propriétés inhabituelles en comparaison avec le LPS d'entérobactéries (Fig. 2A). Au niveau de sa structure, le LPS se compose de trois domaines : le lipide A, le core et la chaîne O. Le LPS de *Brucella* a pour particularité de disposer, entre autres, d'une longue chaîne O et d'un lipide A qui est composé d'acides gras à longues chaînes (Rasool, Freer et al. 1992; Cardoso, Macedo et al. 2006; Tumorhuu, Koide et al. 2006).

Le LPS est un motif classiquement reconnu par le système immunitaire de l'hôte, notamment par l'intermédiaire du TLR 4 (Toll Like Receptor), un récepteur de l'immunité innée (Akira, Uematsu et al. 2006). Toutefois, de par sa structure atypique, le LPS de *Brucella* présente des propriétés particulières qui confèrent à la bactérie plusieurs avantages. Tout d'abord, la longue chaîne O protège le pathogène de la lyse par le système du complément, un composant important de l'immunité innée de l'hôte (Eisenschenk, Houle et al. 1999). Il semble de plus que le LPS de *Brucella* ne présente qu'un faible pouvoir pyrogène et soit un faible inducteur de production d'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et de TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ), deux médiateurs de l'immunité essentiels pour l'élimination du

pathogène (Cardoso, Macedo et al. 2006). La production du TNF- $\alpha$  est décrite par ailleurs comme étant également réprimée par la protéine de la membrane externe 25 (OMP25, Outer Membrane Protein 25) de *Brucella* (Corbel 1997; Cardoso, Macedo et al. 2006; Barquero-Calvo, Chaves-Olarte et al. 2007; Gorvel 2008).

Enfin, il a été démontré que les cellules dendritiques, qui sont des cellules immunitaires déterminantes dans le développement d'une réponse immunitaire, ne parviennent pas à être totalement activées en cas d'infection par *Brucella*. Ce phénomène serait vraisemblablement lié aux faibles taux de TNF- $\alpha$  ainsi qu'à la protéine Btp1 (*Brucella*-Tir-protein 1) récemment décrite comme étant capable d'interférer directement avec la maturation des cellules dendritiques (Billard, Dornand et al. 2007; Salcedo, Marchesini et al. 2008). Il semble par conséquent que *Brucella* soit capable d'une part de limiter sa reconnaissance par le système immunitaire et d'autre part d'inhiber l'activation d'une réponse immunitaire limitant de la sorte une réponse délétère.



**Figure 2. Les facteurs de virulence majeurs.** Ils sont en nombre réduits chez *Brucella* avec notamment (A) le lipopolysaccharide (LPS) atypique avec une longue chaîne O ainsi qu'un lipide A composé d'acides gras à longue chaînes (Cardoso, Macedo et al. 2006), (B) le système à deux composants BvrR –BvrS (R et S sur la figure) modulant la composition de la membrane externe et permettant entre autres l'internalisation de la bactérie (Moreno 2006), (C) le système de sécrétion de type IV *VirB*, nécessaire à la bactérie pour atteindre sa niche de réplication, potentiellement via la sécrétion d'effecteurs (Fronzes, Christie et al. 2009). Reste encore à déterminer le rôle du métabolisme dans la pathogenèse.

## B. L'internalisation dans la cellule hôte

Le mécanisme d'internalisation de la bactérie reste à ce jour peu connu et semble différer entre cellule phagocytaire professionnelle ou non. Toutefois, il a été démontré qu'une protéine de surface de *Brucella*, la protéine SP41 (Surface Protéine 41 kDa), est requise pour l'adhérence et l'infection des cellules épithéliales HeLa. Le mécanisme d'adhérence semble impliquer une interaction entre SP41 et l'acide sialique à la surface des cellules (Castaneda-Roldan, Ouahrani-Bettache et al. 2006).

D'autre part, il a été mis en évidence que le LPS atypique de *Brucella* est impliqué dans le mécanisme d'entrée de la bactérie au sein de la cellule hôte. En effet, le LPS semble capable d'interagir avec des microdomaines membranaires de la cellule, les *lipid rafts*, et cette interaction s'avère être nécessaire à l'internalisation de la bactérie (Naroeni and Porte 2002).

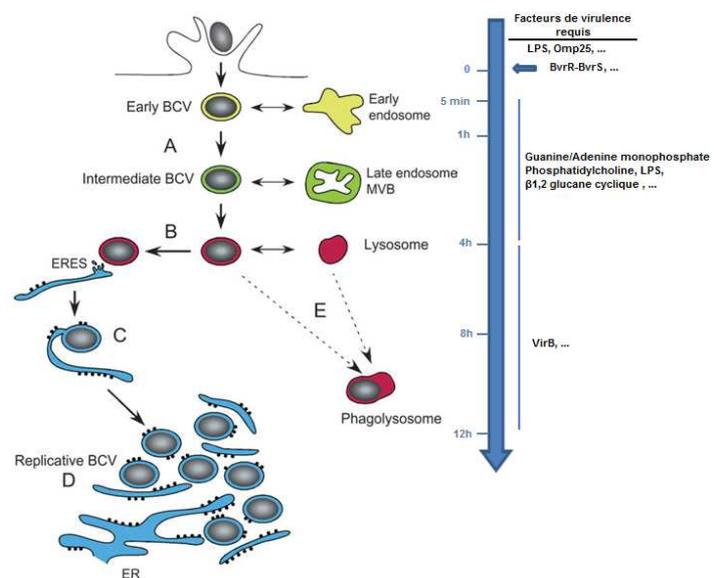
En outre, indépendamment du type cellulaire, un système régulateur à deux composants semble être essentiel à l'internalisation dans la cellule hôte : le système BvrR-BvrS (pour respectivement *Brucella* virulence related Regulatory et Sensory protein) (Fig. 2B) (Sola-Landa, Pizarro-Cerda et al. 1998). Ce type de système est classiquement composé d'un senseur membranaire (BvrS) qui suite à un stimulus va transmettre un signal à un régulateur (BvrR) qui lui-même, va moduler l'expression de certains gènes (Karniol and Vierstra 2004). Le rôle précis du système BvrR-BvrS chez *Brucella* reste encore

incomplètement compris. Il a été suggéré qu'il puisse agir en modulant la composition de la membrane externe de la bactérie qui constitue le site d'interaction entre hôte et pathogène avant internalisation. Toutefois, les signaux reconnus et le régulon restent à déterminer (Sola-Landa, Pizarro-Cerda et al. 1998; Boschioli, Foulongne et al. 2001). Par ailleurs, il est intéressant de mentionner le fait qu'il a été récemment proposé que le système BvrR-BvrS puisse aussi être impliqué dans la régulation du métabolisme de *Brucella*. Il permettrait une adaptation de la physiologie bactérienne au cours du transit vers la niche de réplication (Lamontagne, Butler et al. 2007).

### C. Evasion vers le réticulum endoplasmique

Une fois internalisé, un pathogène intracellulaire doit être capable soit d'atteindre le cytoplasme, soit de moduler le trafic intracellulaire de l'hôte pour atteindre sa niche de réplication en évitant les mécanismes de défense antimicrobiens. Ces mécanismes sont d'autant plus importants chez les cellules phagocytaires au sein desquelles il y a notamment formation du phagolysosome, un compartiment particulièrement hostile car acide et riche en hydrolases acides et peptides antimicrobiens. Ainsi, face à ces mécanismes bactéricides, *Brucella* a acquis la capacité de rediriger le trafic intracellulaire. Elle parvient dès lors à établir une niche de réplication au sein de l'hôte qui est similaire au réticulum endoplasmique rugueux dans laquelle elle peut se multiplier (Fig. 3) (Starr, Ng et al. 2008).

**Figure 3. Modèle du trafic intracellulaire de *Brucella*.** Une fois internalisée, le compartiment contenant *Brucella* communément appelé BCV (*Brucella* Containing Vacuole) va subir un processus similaire à une maturation en interagissant avec les différents compartiments du trafic intracellulaire. La BCV va ainsi séquentiellement interagir avec les endosomes précoces (jaune), les endosomes tardifs et corps multivésiculaires (vert) (A) et le compartiment lysosomal (B). Un premier contact avec le compartiment cible que constitue le réticulum endoplasmique (ER), a lieu au niveau de site ERES (Endoplasmic Reticulum Exit Sites) (C). Cette interaction permet la formation de la niche de réplication (D). La BCV peut également fusionner avec les lysosomes et former un phagolysosome bactéricide (E). Cette voie semble être majoritaire après infection de cellules phagocytaires professionnelles et ce même pour la souche WT. La formation de ce compartiment est néanmoins inhibée par la production de guanine et d'adénine monophosphate et peut être par la composition atypique de la membrane externe de *Brucella* (phosphatidylcholine, LPS). La capacité de formation d'une niche répliquative de type réticulum endoplasmique semble directement dépendre du système de sécrétion de type IV (Starr, Ng et al. 2008). Certains des facteurs de virulence requis à chaque étape du trafic pour instaurer une infection sont annotés en parallèle.



Un premier mécanisme identifié est la production de guanine et d'adénine monophosphate. Ces deux nucléotides semblent en effet inhiber directement la fusion entre phagosomes, endosomes et lysosomes à la base de la formation du phagolysosome (Canning, Roth et al. 1986).

De plus, la composition atypique de la membrane externe de *Brucella* qui est particulièrement riche en phosphatidylcholine (PC), pourrait conférer des propriétés mécaniques telles que la fusion du phagosome avec les lysosomes soit réprimée (Conde-Alvarez, Grillo et al. 2006).

Un troisième mécanisme suggère que le LPS atypique pourrait également contribuer à la déviation du trafic (Porte, Naroeni et al. 2003).

En outre, un composant du périplasme de *Brucella*, le  $\beta$ 1,2 glucane cyclique ( $\beta$ gc), semble permettre l'évasion du pathogène hors de la voie classique d'endocytose. En effet, ces  $\beta$ gc semblent pouvoir interagir avec des *lipid rafts* qui eux-mêmes seraient nécessaires à la maturation du phagosome. De cette manière, en sécrétant des  $\beta$ gc, *Brucella* éviterait la formation du phagolysosome hostile (Arellano-Reynoso, Lapaque et al. 2005).

La formation du phagolysosome étant ainsi évitée, les bactéries peuvent alors atteindre leur niche de réplication ; ce qui requiert un système de sécrétion de type IV dénommé *VirB* chez *Brucella* (Fig. 2C). En effet, les souches mutées pour ce système sont certes capables d'infecter des cellules hôtes mais ne parviennent pas à persister, ni à s'y répliquer (Comerci, Martinez-Lorenzo et al. 2001). Il a dès lors été suggéré que la modulation du trafic intracellulaire par *Brucella* puisse impliquer la sécrétion d'effecteurs bactériens par le système de sécrétion de type IV permettant *in fine* à la bactérie d'atteindre sa niche de réplication (Gorvel and Moreno 2002; Starr, Ng et al. 2008; Fronzes, Christie et al. 2009).

D'autres facteurs de virulence ont été également identifiés comme critiques dans la pathogénèse. Il s'agit entre autres de facteurs de réponse aux stress, de sidérophores, de protéines impliquées dans une structure flagellaire (pour plus d'informations, voir les revues (Corbel 1997; Boschioli, Foulongne et al. 2001; Batut, Andersson et al. 2004; Matur, Amarnath et al. 2007)).

## 2. Le métabolisme, un nouveau déterminant majeur de virulence

Au vu de l'ensemble de ces résultats, il semble que notre compréhension de la pathogénèse de *Brucella* reste encore à ce jour lacunaire. De nombreuses questions restent en suspens et de nombreux acteurs moléculaires doivent encore être identifiés. Cela justifie le grand intérêt porté par la communauté scientifique vis-à-vis des facteurs de virulence.

A l'inverse, très peu d'attention a été portée sur le métabolisme et ce, quelque soit le pathogène considéré. La question fondamentale de savoir pourquoi l'hôte constitue un milieu de croissance exceptionnel pour les bactéries pathogènes reste donc sans réponse et ce, en dépit des milliards de dollars dépensés chaque année dans la recherche et le traitement de ces infections (Brown, Palmer et al. 2008). Il semble pourtant évident que pour pouvoir être pathogène, une bactérie doit disposer et exploiter les nutriments nécessaires à sa survie. Dès lors, la colonisation d'une niche telle qu'une cellule requiert des adaptations métaboliques spécifiques qui constituent le fondement même de l'instauration d'une infection. Hormis quelques rares exceptions, nos connaissances sur cette adaptation de la physiologie du pathogène sont tout à fait insignifiantes.

Il est d'ailleurs intéressant de signaler que l'étymologie du mot parasite, qui qualifie entre autres les microorganismes pathogènes, provient du grec « parasitos » (παράσιτος). Ce terme signifie « pique-assiette », « se dit d'un être qui se nourrit et vit au dépens d'autrui ». soulignant paradoxalement notre manque de connaissance sur la nutrition des pathogènes (Munoz-Elias and McKinney 2006). De manière tout aussi ironique, une des premières antibiothérapies, développée il y a plus d'un siècle, ciblait justement le métabolisme bactérien. En effet, le Prontosil était capable, une fois métabolisé, d'interférer avec la voie essentielle de synthèse de l'acide folique, un précurseur de synthèse des nucléotides et de certains acides aminés (méthionine, histidine et sérine) (Brown 1962; Brown, Palmer et al. 2008).

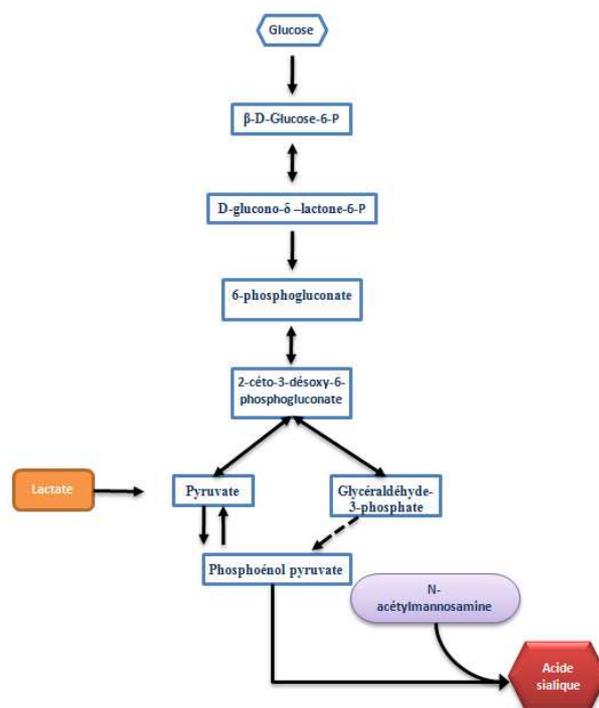
Le manque d'intérêt qui a été porté au métabolisme *in vivo* des bactéries infectieuses s'explique par deux faits. D'une part, il était communément accepté que le métabolisme

observé dans des conditions *in vitro* différait peu de celui existant *in vivo*. D'autre part, au vu de la conservation importante de la structure du réseau métabolique entre organismes, le métabolisme central n'était pas considéré comme une cible thérapeutique intéressante car trop similaire entre hôtes et pathogènes. Il était effectivement supposé qu'un principe actif ciblant une enzyme du métabolisme central d'une bactérie aurait un faible pouvoir discriminant et affecterait l'hôte.

Depuis lors, il a été démontré relativement récemment que le métabolisme d'*E. coli* décrit en conditions *in vitro* n'est en aucun cas représentatif du métabolisme *in vivo* (*i.e* lorsque la bactérie colonise l'intestin des mammifères) et que cette constatation doit certainement être applicable à d'autres espèces (Chang, Smalley et al. 2004). Des différences structurales entre facteurs métaboliques microbiens et eucaryotes ont également été mises en évidence rendant une discrimination hôte-pathogène possible (Walsh 2003; Chang, Smalley et al. 2004; Munoz-Elias and McKinney 2006). Il apparaît donc que le métabolisme des bactéries pathogènes constitue une base oubliée de la virulence et une cible thérapeutique sous-exploitée.

En outre, des études récentes tendent à démontrer que métabolisme et facteurs de virulence classiques d'un pathogène ne sont pas indépendants l'un de l'autre mais bien étroitement liés. Exemple en est le cas de *Neisseria meningitidis*, une bactérie Gram négative habituellement localisée au niveau de l'oropharynx chez l'homme qui peut provoquer septicémies et méningites. Afin de limiter sa reconnaissance par le système immunitaire, *N. meningitidis* a acquis la capacité d'imiter les propriétés moléculaires des cellules de l'hôte en produisant de l'acide sialique qui se localise au niveau de sa surface externe. Ce mimétisme joue un rôle clé dans la pathogenèse de la bactérie et est supposé être directement associé à son métabolisme. En effet, *N. meningitidis* catabolise préférentiellement le lactate *in vivo* et ce même si une autre source de carbone moins oxydée, et par conséquent plus rentable comme le glucose, est disponible. Ce phénomène semble s'expliquer par le fait que le métabolisme du lactate permette d'alimenter directement la voie de synthèse de l'acide sialique (Fig. 4). Le catabolisme d'une source préférentielle de carbone apparaît donc comme étant directement couplé à un mécanisme d'immunoévasion essentiel chez *N. meningitidis* (Exley, Shaw et al. 2005; Brown, Palmer et al. 2008).

**Figure 4. Synthèse de l'acide sialique par *Neisseria meningitidis*** (adaptée de Brown, Palmer et al. 2008). La synthèse d'acide sialique permet à *N. meningitidis* d'imiter les propriétés moléculaires de son hôte. La production de cet acide à partir de glucose, qui se fait au travers de la voie d'Entner-Doudoroff chez cette bactérie, implique de plus nombreuses étapes qu'à partir de lactate. Cette différence semble expliquer l'utilisation préférentielle de lactate par rapport au glucose chez *N. meningitidis*.



De manière moins directe, il a été démontré chez *Brucella* que l'expression des gènes codant pour le facteur de virulence majeur qu'est le système de sécrétion de type IV (VirB) soit induite en présence de l'alarmone (p)ppGpp. Cette dernière fait partie du mécanisme de réponse de stringence, lui-même induit en cas de stress nutritionnel. Cette réponse permet l'adaptation de la physiologie de la bactérie, et par conséquent de son métabolisme, dans un environnement pauvre en substrat. Il semble donc exister un couplage entre perception de la disponibilité en substrats dans l'environnement et l'expression d'un facteur de virulence majeur chez *Brucella* (Boschiroli, Ouahrani-Bettache et al. 2002; Dozot, Boigegrain et al. 2006).

### III. Le métabolisme de *Brucella*

#### 1. Contributions des études biochimiques et des séquences génomiques

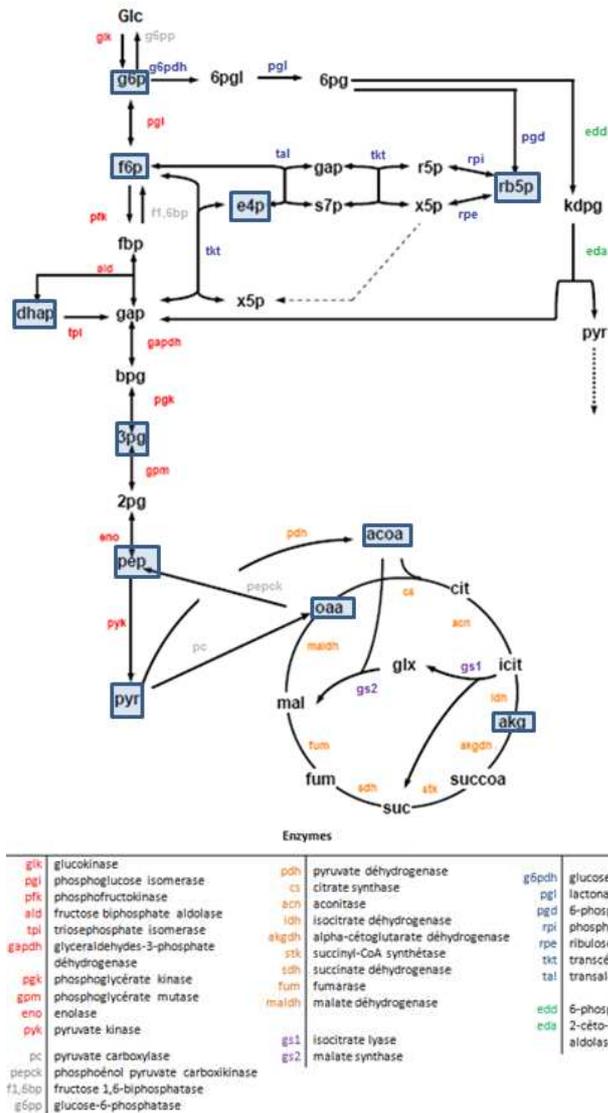
L'étude du métabolisme de *Brucella* a connu plusieurs vagues successives d'intérêt. La première date des années 1960 et visait entre autres à déterminer des propriétés spécifiques de *Brucella*, la distinguant d'autres espèces bactériennes. Au cours des années 1970, des études biochimiques ont permis la caractérisation des voies métaboliques présentes chez *Brucella*. De telles études sont basées sur des tests de croissance *in vitro* ainsi que sur des tests d'activité enzymatique. Les tests d'activité reposent sur l'ajout d'un substrat spécifique de l'enzyme étudiée à des extraits cellulaires. Si l'enzyme présente une activité catalytique, les produits générés peuvent être détectés par spectrophotométrie notamment. Il est ainsi évident que les conditions expérimentales dans lesquelles ont lieu ce type d'expériences se distinguent nettement des conditions *in vivo* de par les conditions de culture et de par le fait que les enzymes ne se trouvent plus dans le compartiment cellulaire.

La troisième vague d'intérêt a eu lieu au cours des années 1980 et est liée au développement de nouvelles techniques de génétique moléculaire. Tandis que le dernier regain d'intérêt pour le métabolisme de *Brucella* fait suite à la disponibilité récente des séquences génomiques de différentes espèces de *Brucella*. Ces séquences ont notamment permis de prédire le potentiel métabolique de *Brucella* (DelVecchio, Kapatral et al. 2002; Essenberg, Seshadri et al. 2002; Paulsen, Seshadri et al. 2002; Halling, Peterson-Burch et al. 2005).

La plupart de ces études se sont essentiellement focalisées sur le métabolisme du carbone car il fournit la bactérie en énergie sous forme d'ATP et d'équivalents réducteurs ainsi qu'en précurseurs essentiels de biomasse. Les voies majeures du métabolisme du carbone sont la voie classiquement appelée « glycolyse » également connue en tant que voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la voie des pentoses phosphate (PP), la voie d'Entner-Doudoroff (ED), le cycle de Krebs également connu en tant que cycle des acides tricarboxyliques (TCA) et la néoglucogenèse (Fig. 5). Certaines voies anaplérotiques<sup>1</sup> sont également comprises avec notamment le cycle du glyoxylate qui alimente le TCA. Ces différentes voies chez *Brucella* et leurs rôles respectifs sont décrits ci-dessous.

---

<sup>1</sup> Une réaction ou une voie est dite anaplérotique lorsqu'elle permet d'alimenter une voie métabolique en métabolites. Ces voies anaplérotiques permettent par exemple le maintien de concentrations constantes des métabolites du TCA malgré leur utilisation dans des voies biosynthétiques en conditions normales (adapté de David L. Nelson, M. M. C. (2005). *Lehninger: Principles of biochemistry* Freeman.).



**Figure 5. Représentation du réseau constitué par les voies majeures du métabolisme du carbone (adapté de C. Nicolas).** Cette figure représente 6 des 7 voies du métabolisme carboné que nous avons considéré: la voie glycolytique classique d'Embden-Meyerhof-Parnas (en rouge), la voie des pentoses phosphates (en bleu), la voie d'Entner-Doudoroff (en vert), la néoglucogénèse (dont les réactions différant de la voie EMP sont en gris), le cycle de Krebs (en orange) et le cycle du glyoxylate (en mauve). La liste des abréviations utilisées est disposée en parallèle et les principaux précurseurs de synthèse de biomasse sont encadrés en bleu (C. Nicolas).

#### Métabolites et substrats

Glc	glucose
g6p	glucose-6-phosphate
f6p	fructose-6-phosphate
fbp	fructose 1,6-biphosphate
dhap	dihydroxyacétone phosphate
gap	glycéraldéhyde 3-phosphate
bpg	1,3-biphosphoglycérate
3pg	3-phosphoglycérate
2pg	2-phosphoglycérate
pep	phosphoenol pyruvate
pyr	pyruvate
acoa	acétyl-CoA
cit	citrate
icit	isocitrate
akg	alpha-cétoglutarate
succoa	succinyl-CoA
suc	succinate
fum	fumarate
mal	malate
oaa	oxaloacétate
6pgl	6-phosphoglucono-lactone
6pg	6-phosphogluconate
rb5p	ribulose-5-phosphate
r5p	ribose-5-phosphate
x5p	xylulose-5-phosphate
s7p	sédoheptulose-7-phosphate
e4p	érythrose-4-phosphate
kdp	2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate
glx	glyoxylate

### A. Une phosphofructokinase absente

La glycolyse (EMP), la voie des pentoses phosphate (PP) et la voie d'Entner-Doudoroff (ED) sont toutes trois impliquées dans le métabolisme des sucres. Chacune de ces voies est caractérisée par un rendement et la production de précurseurs biosynthétiques qui lui est spécifique. La glycolyse classique permet ainsi de générer de l'ATP, du  $\text{NADH}+\text{H}^+$  ainsi que certains précurseurs de biosynthèse (G6P, F6P, DHAP, 3PG, PEP, PYR, cfr liste des abréviations) tandis que la voie des pentoses phosphate permet la production de  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  ainsi que d'autres précurseurs (R5P, E4P). La voie d'Entner-Doudoroff permet quant à elle de générer de l'ATP, du  $\text{NADH}+\text{H}^+$  et du  $\text{NADPH}+\text{H}^+$ . L'utilisation de ces voies va dès lors en partie dépendre des besoins physiologiques rencontrés par la bactérie.

Les études menées sur *Brucella* ont révélé une voie glycolytique incomplète car elle ne dispose pas de la phosphofructokinase. La gluconate-6-phosphate déshydrogénase de la voie d'Entner-Doudoroff n'a également pas pu être mise en évidence par les études biochimiques. Toutefois, l'analyse des séquences des génomes disponibles de *Brucella* ont identifié un gène codant vraisemblablement pour cette enzyme, suggérant que la voie ED serait complète. En ce qui concerne la voie des pentoses phosphate, elle semble intacte avec le  $\text{NADP}^+$  et le  $\text{NAD}^+$  pouvant servir de cofacteurs aux deux déshydrogénases (Robertson and McCullough 1968; Essenberg, Seshadri et al. 2002).

## B. [Les cycles de Krebs et du glyoxylate sont complets](#)

L'oxydation de l'acétyl-CoA, dérivé entre autres du catabolisme d'un sucre, peut se poursuivre via le cycle de Krebs. Ce cycle permet de générer de l'ATP, des équivalents réducteurs sous forme de  $\text{NADH}+\text{H}^+$  et de  $\text{FADH}_2$  ainsi que des précurseurs de biomasse (ACoA, AKG et OAA). Ce cycle est étroitement lié à de nombreuses autres voies, telle que le métabolisme des acides gras et de l'azote, notamment par les intermédiaires respectifs de l'acétyl-CoA et de l' $\alpha$ -cétoglutarate.

Le cycle du glyoxylate, qui doit son nom à l'un des métabolites produits, est également lié au TCA. La première réaction de ce cycle implique l'isocitrate lyase qui clive de l'isocitrate et génère du glyoxylate et du succinate (Fig. 5). Le glyoxylate peut ensuite, avec de l'acétyl-coA, être condensé en malate par la malate synthase. Ce cycle du glyoxylate est nécessaire pour la synthèse de carbohydrates sur base d'acétate. Cela s'explique par la production de malate et succinate, deux métabolites du TCA, par le cycle du glyoxylate. Un de ces métabolites peut être converti en oxaloacétate nécessaire pour de futurs tours dans le cycle de Krebs tandis que le second peut servir à la synthèse de phosphoénolpyruvate. Ce dernier peut alors être converti en carbohydrates via la voie de la néoglucogenèse (D. L. Nelson 2005).

Les études biochimiques réalisées sur *Brucella* ainsi que l'analyse des séquences génomiques disponibles indiquent que ces deux cycles sont présents et complets chez *Brucella* (DeVecchio, Kapatral et al. 2002; Essenberg, Seshadri et al. 2002).

## C. [Une néoglucogenèse également complète](#)

La néoglucogenèse partage avec sa voie inverse l'EMP la plupart de ses enzymes métaboliques. En effet, seules trois réactions sont irréversibles et impliquent dès lors des enzymes différentes qui sont pour la néoglucogenèse : la phosphoénolpyruvate synthase, la fructose biphosphatase et la glucose-6-phosphatase. Cette voie permet, au même titre que la glycolyse, de générer des précurseurs de biomasse mais nécessite un investissement énergétique dans ce cas-ci sous forme d'ATP et d'équivalents réducteurs (Munoz-Elias and McKinney 2006). L'ensemble des gènes codant pour les enzymes de cette voie semblent présents chez *Brucella* (DeVecchio, Kapatral et al. 2002; Essenberg, Seshadri et al. 2002).

## D. [Particularités métaboliques de \*Brucella\*](#)

La structure particulière du réseau métabolique de *Brucella* qui ne dispose pas de phosphofructokinase implique que le catabolisme des hexoses se déroule principalement au travers de la voie des pentoses phosphate (PP) ou d'Entner-Doudoroff si cette dernière est active. Une telle utilisation de la voie des PP est inhabituelle mais est théoriquement aussi rentable énergétiquement que la voie glycolytique classique grâce à la production d'équivalents réducteurs.

Une autre particularité de *Brucella* est l'utilisation préférentielle d'érythritol par rapport au glucose. En effet, il a été démontré que l'incorporation du glucose dans les composants carbonés de la bactérie est réduite de 30% en présence d'érythritol et que ce phénomène est indépendant du transport du glucose. Sperry and Robertson ont caractérisé la voie métabolique de ce sucre. Elle implique une kinase, deux déshydrogenases et génère *in fine* un métabolite de la glycose, à savoir le dihydroxyacétone phosphate (Fig. 6) (Sperry and Robertson 1975). L'ensemble de ces résultats fournit une vue globale du métabolisme potentiel du carbone chez *Brucella*. Cependant, il ne donne que peu d'indications sur les voies métaboliques réellement actives en conditions *in vitro* et encore moins *in vivo*.

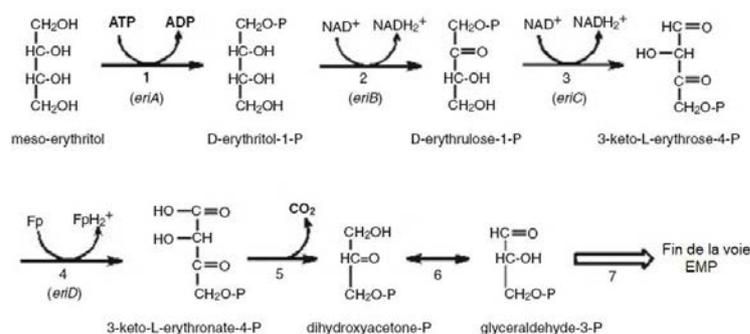


Figure 6. Voie d'assimilation de l'érythritol. La septième voie que nous avons considéré dans le métabolisme du carbone de *Brucella* est celle de l'assimilation de l'érythritol. Le catabolisme de ce sucre permet la production d'équivalents réducteurs (2 NADH+H<sup>+</sup> ainsi qu'une flavoprotéine réduite de type FMN ou FAD) et d'un triose phosphate (DHAP) intermédiaire de la voie glycolytique EMP. Cette voie comprend 5 réactions catalysées successivement par : (1) l'érythritol kinase, (2) l'érythritol-1-phosphate déshydrogénase, (3) l'érythrose-1-phosphate déshydrogénase, (4) la 3-keto-érythrose-4-phosphate déshydrogénase, et (5) la 3-keto-érythronate-4-phosphate décarboxylase. L'oxydation du dihydroxyacétone-phosphate généré peut alors se poursuivre via la voie EMP avec (6) la triose-phosphate isomérase (Moreno, 2006).

## 2. Premières indications sur le métabolisme en cours d'infection

### A. Les enzymes métaboliques essentielles à la virulence

Différentes études ont récemment apporté des indications préliminaires sur l'activité de certaines voies chez *Brucella*, en cours d'infection. Une première contribution a été apportée par les travaux de recherche menés sur les facteurs de virulence classiques. Ils ont en effet permis d'identifier des protéines métaboliques nécessaires au cours d'une infection. Parmi ces études figurent les travaux menés par Lestrade *et al.*, Hong *et al.* et Wu *et al.* dont l'objectif était initialement d'identifier de nouveaux facteurs de virulence chez *B. abortus* et *B. melitensis*. L'identification de ces nouveaux facteurs reposait sur la recherche de mutants transpositionnels atténués en modèle murin d'infection.

Au cours de leurs travaux, Lestrade *et al.* ont mis en évidence un total de 45 mutants atténués chez *B. melitensis*. Sur l'ensemble de ces souches, 10 sont mutées au niveau d'un gène codant pour une protéine directement liée au métabolisme (ceux-ci sont repris dans le tableau 1 ci-dessous) (Lestrade, Delrue *et al.* 2000; Lestrade, Dricot *et al.* 2003).

Tableau 1. Mutants atténués identifiés par Lestrade *et al.*

Fonction présumée du gène disrupté (Lestrade, Delrue <i>et al.</i> 2000)	Fonction présumée du gène disrupté (Lestrade, Dricot <i>et al.</i> 2003)
<b>Métabolisme des acides aminés</b>	<b>Métabolisme</b>
O-acétylsérine (thiol)-lyase	<i>ilvC</i> : synthèse de la valine, de la leucine et de l'isoleucine
Sulphite réductase	<i>cobB</i> : synthèse de la cobalamine
Homocystéine-N5-méthyltetrahydrofolate transméthylase	<i>mosA</i> : inosamine méthylase
<b>Métabolisme des acides nucléiques</b>	<i>galcD</i> : D-galactarate déshydratase
Adénine ADN méthyltransférase	<i>glcK</i> : glycérol kinase
<b>Métabolisme des protéines membranaires</b>	
Peptidoglycan transglycolase	

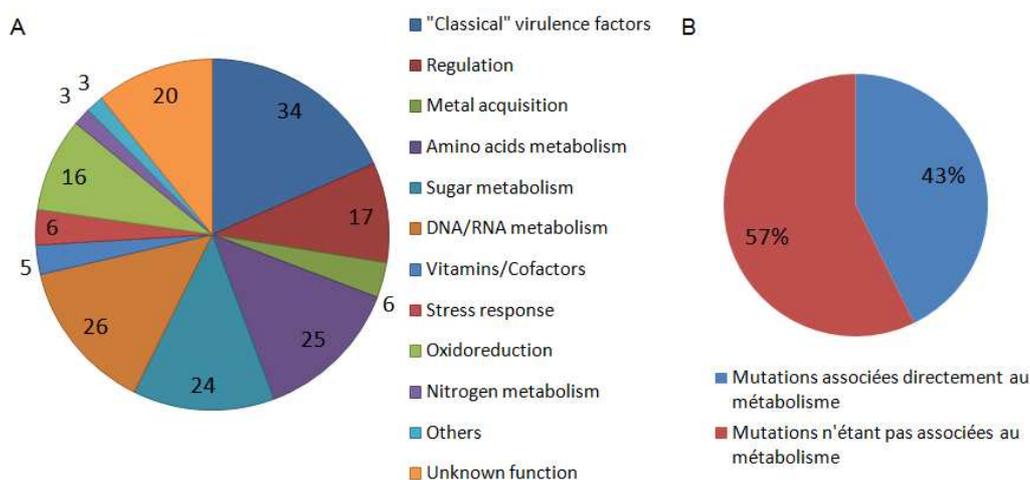
La seconde étude a révélé que sur 14 mutants identifiés chez *B. abortus*, 4 souches étaient mutées au niveau de fonctions associées au métabolisme. La transposition avait disrupté les gènes codant pour le transporteur de glucose et galactose (*gluP*), une sous-unité de la glutamate synthase (*gltD*), la glycine déshydrogénase et un facteur vraisemblablement impliqué dans la biosynthèse des acides aminés aromatiques (Hong, Tsolis *et al.* 2000).

Quant à la troisième étude, elle a permis de mettre en évidence chez *B. melitensis* 61 gènes dont 9 codent pour des protéines liées au métabolisme (ceux-ci sont repris dans le tableau 2 ci-dessous). Les gènes identifiés incluent le gène *glpD* qui code pour la glycérol-3-phosphate déshydrogénase FAD-dépendante. Cette enzyme converti le dihydroxyacétone phosphate en glycérol-3-phosphate. Les auteurs ont également identifié les gènes *eryB* et *eryC* qui codent pour des enzymes du métabolisme de l'érythritol et qui avaient déjà été mis en évidence lors d'une étude antérieure (Wu, Pei *et al.* 2006).

Tableau 2. Mutants atténués identifiés par Wu *et al.*

Fonction présumée du gène disrupté	Fonction présumée du gène disrupté
<b>Métabolisme et transport des nucléotides</b>	<b>Production d'énergie et conversion</b>
Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase	Glutathione réductase
Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit	Glycérol-phosphate déshydrogenase FAD-dépendante
Phosphoribosylformylglycinamide synthase (purS)	<b>Métabolisme et transport des carbohydrates</b>
Phosphoribosylformylglycinamide synthase (purQ)	HPr du système PTS
Exopolyphosphatase	L-fucose phosphate aldolase

Delrue *et al.* ont par ailleurs effectué un recensement de l'ensemble des mutants atténués décrits chez *B. melitensis* (Delrue, Lestrade et al. 2004). Globalement il apparaît que près de la moitié des mutations affectent des gènes codant pour des protéines du métabolisme (Fig. 7). A titre d'exemple, une mutation au niveau du gène codant pour la glucose-6-phosphate isomerase (glycolyse/néoglucogenèse) amène à un phénotype d'atténuation. Il en est de même pour les gènes codant pour la 6-phosphogluconate déshydrogenase (voie des pentoses phosphate) ou encore pour différentes protéines impliquées dans la voie de synthèses des purines (la liste des mutations liées au métabolisme est disponible en annexe 1) (Delrue, Lestrade et al. 2004).



**Figure 7. Classes fonctionnelles de mutations atténuantes identifiées chez *B. melitensis* 16M.** L'ensemble des mutations amenant à un phénotype d'atténuation identifiées chez *B. melitensis* 16M ont été recensées et réparties en groupes fonctionnels (A). Il apparaît qu'un nombre important de ces mutations sont liées à des facteurs de virulence classiques et au métabolisme des sucres des acides aminés ou encore des acides, nucléiques. La réorganisation de ces mutations en deux classes se distinguant par l'existence d'un lien ou non avec le métabolisme a été réalisée et est représentée en (B). Près de 43% des souches atténuées sont ainsi mutées au niveau de fonctions métaboliques. Cette observation supporte le concept que métabolisme et virulence sont étroitement intriqués et que la compréhension de l'un ne peut se faire sans celle de l'autre (Delrue, Lestrade et al. 2004).

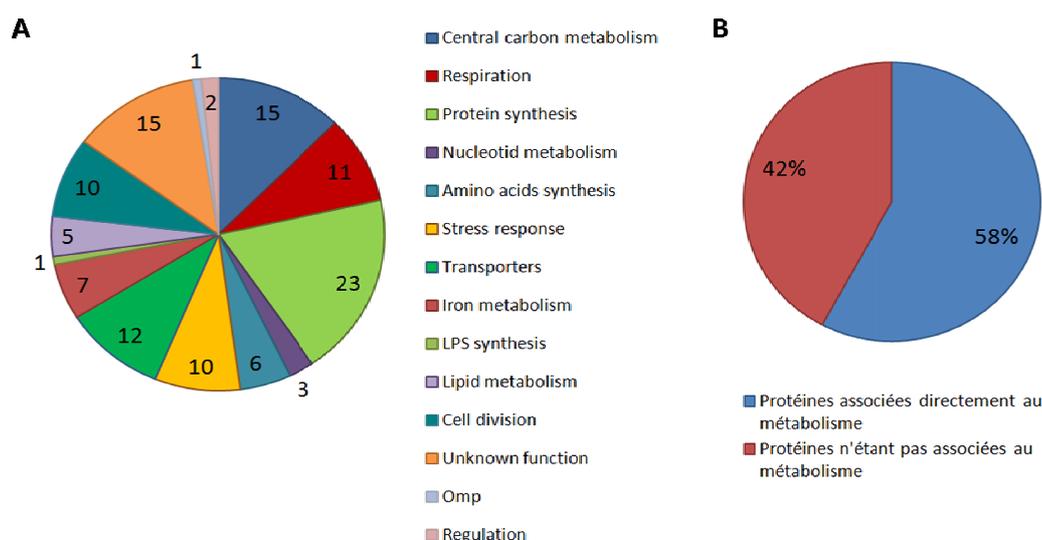
Ces résultats démontrent une fois de plus l'existence d'un lien étroit entre métabolisme et virulence. De plus, ils fournissent des informations préliminaires sur l'adaptation de *Brucella* au cours de l'infection et permettent d'avancer certaines hypothèses. Ainsi, les gènes codant pour les enzymes impliquées dans la voie de synthèse de 9 acides aminés (lysine, valine, leucine, glutamine, sérine, isoleucine, cystéine, thréonine, tryptophane, histidine, méthionine) étant essentiels à la virulence, il est concevable que *Brucella* rencontre au cours du trafic intracellulaire un environnement pauvre en acides aminés qu'elle doit dès lors synthétiser *de novo*. De la même manière, le fait que le catabolisme de l'érythritol ainsi que certaines protéines prédites comme étant impliquées dans le transport de sucres soient essentiels suggère que ces sucres puissent constituer des sources de carbone et d'énergie nécessaires à la bactérie au sein de la cellule hôte.

## B. Le protéome de *Brucella* en cours d'infection révèle une adaptation métabolique progressive et majeure

Plus récemment, des résultats d'études du protéome de *Brucella spp.* au cours du processus infectieux ont étoffé les hypothèses précédemment avancées sur l'adaptation physiologique de la bactérie. Ce type d'analyse permet l'identification des protéines différenciellement produites au cours d'une infection et ce par rapport à une condition de référence qui est dans ce cas-ci une culture en conditions *in vitro*. Les variations observées peuvent se traduire soit par une diminution soit par une augmentation de l'abondance d'une protéine considérée. Ces modifications sont supposées être représentatives de la physiologie ainsi qu'indirectement de l'environnement rencontré par le pathogène au sein de la cellule infectée.

Un premier constat global des études de protéomique est que, indépendamment de l'espèce de *Brucella* considérée, la majorité des protéines bactériennes différenciellement produites durant une infection est impliquée dans le métabolisme primaire (les résultats d'une de ces études sont illustrés à la Fig. 8). Ce dernier se définit comme étant le métabolisme strictement nécessaire à la survie de la bactérie. Cette observation démontre l'existence d'une adaptation physiologique majeure de la bactérie vis-à-vis de son hôte.

Les résultats de deux études de protéomique sont décrits ci-dessous.



**Figure 8. Classes fonctionnelles des protéines différenciellement produites au cours d'une infection.** Lors de l'étude du protéome de *B. abortus* 2308 en conditions d'infection, Lamontagne *et al.* ont identifié 121 protéines différenciellement produites. Ces protéines ont été réparties en classes fonctionnelles ce qui est représenté par la figure A. Les classes les plus représentées sont ainsi les protéines impliquées dans la synthèse de protéines, le métabolisme central du carbone, les protéines dont la fonction est inconnue, les transporteurs et celles impliquées dans la respiration. Comme pour la figure 4, ces différentes protéines ont été regroupées en deux classes distinguant celles étant associées ou non au métabolisme (B). Ce second graphique montre que plus de la moitié des protéines différenciellement produites sont des enzymes métaboliques. Cette constatation suggère l'existence d'une adaptation physiologique importante de la bactérie vis-à-vis de son hôte ce qui de nouveau supporte le concept que métabolisme et virulence sont liés (Lamontagne, Forest *et al.* 2009).

### *Le protéome de *B. suis* en cours d'infection*

Les travaux menés sur le protéome de *Brucella suis* 48h après infection de macrophages murins J774, a mis en évidence 168 protéines différenciellement produites. Parmi celles dont la production est réduite, ils ont identifié des enzymes du métabolisme de l'énergie, des enzymes liées à la synthèse d'acides aminés (majoritairement celle du glutamate), la pyruvate kinase appartenant à la voie de la glycolyse, ainsi que des enzymes nécessaires à la synthèse des protéines et des acides nucléiques. Le fait que la production de ces protéines soit réduite au cours d'une infection avance la possibilité d'un ralentissement important du métabolisme bactérien par rapport à la situation de contrôle (*in vitro*). Ce

ralentissement se caractérise par une biosynthèse réduite de composés essentiels (acides aminés et protéines, acides nucléiques) ainsi que par une activité restreinte de la voie glycolytique. Assez paradoxalement, la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogenase se retrouve en quantité plus importante. Il en est de même pour l'isocitrate déshydrogenase, l'isocitrate lyase faisant partie du cycle de Krebs et de la voie anaplérotique du glyoxylate. De plus, un nombre importants de transporteurs d'acides aminés et de sucres sont également produits de manière plus importante.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'environnement rencontré par *B. suis* est particulièrement pauvre. En réponse à cela, la bactérie semble adapter sa physiologie en réduisant la production des enzymes impliquées dans la biosynthèse de macromolécules et en augmentant la production de transporteurs. Cette pauvreté nutritionnelle corréle les hypothèses avancées précédemment et explique l'atténuation des souches mutées au niveau de la biosynthèse de nucléotides et acides aminés. D'autre part, en dépit d'un métabolisme ralenti, un niveau basal d'activité métabolique semble être maintenu, impliquant notamment le cycle de Krebs. La fonction de ce dernier serait la production d'équivalents réducteurs et non de précurseurs vu la biosynthèse réduite d'acides aminés. De plus, la détection plus importante de glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogenase, à l'inverse de la pyruvate kinase, suggère l'existence d'une activité néoglucogénique (Al Dahouk, Jubier-Maurin et al. 2008).

#### *Le protéome de B. abortus en cours d'infection*

Une seconde étude de protéomique a ajouté une dimension temporelle au modèle d'adaptation physiologique de la bactérie durant le processus d'infection. Lamontagne *et al.* ont en effet analysé le protéome de *B. abortus* à différentes étapes de l'infection à savoir : un temps précoce après infection (3h), un temps moyen (20h) et un temps tardif (44h).

Ils ont constaté que, 3 h après infection, de nombreuses enzymes du cycle de Krebs (aconitate hydratase,  $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogenase, succinyl-coA synthétase et la malate déshydrogenase), certaines enzymes de la voie des pentoses phosphate (transcétolases et transaldolases) ainsi que des protéines de la biosynthèse des purines et pyrimidines étaient produites de manière réduite. Il en est de même pour les protéines impliquées dans la synthèse de protéines et d'ARN. Lamontagne *et al.* ont également observé un remaniement de la composition de la chaîne de transport d'électrons suggérant une conversion vers une phosphorylation oxydative typique d'une faible tension en oxygène.

Quant aux protéines dont la production est accrue, certaines enzymes intervenant dans le catabolisme des acides aminés ont été identifiées telles que l'hydantoinase. Cette enzyme catalyse en effet la dégradation de la proline et permet de générer du glutamate. Le glutamate peut quant à lui être converti en  $\alpha$ -cétoglutarate et être incorporé dans le cycle de Krebs.

Ces observations chez *B. abortus* à un temps précoce après infection sont en partie corrélées avec les résultats obtenus chez *B. suis*. Il semble en effet que les acides aminés et plus particulièrement le glutamate, sont catabolisés et génèrent des métabolites du cycle de Krebs qui est vraisemblablement lui-même ralenti. Le ralentissement de ce cycle contraste avec les observations précédentes chez *B. suis*. Le TCA permettrait néanmoins de générer des équivalents réducteurs qui peuvent être convertis en ATP par une chaîne de transport d'électrons typique d'une faible tension en oxygène. Ce métabolisme basal permettrait à *Brucella* de survivre au cours du trafic intracellulaire jusqu'à atteindre sa niche de répllication où elle commencerait seulement à se multiplier (Gorvel and Moreno 2002).

24 et 48h après infection, le protéome de *Brucella* tend à redevenir similaire à celui observé dans des conditions *in vitro* (l'ensemble des protéines différenciellement produites, identifiées lors de cette étude sont disponibles en annexe2) (Lamontagne, Forest et al. 2009).

### 3. Modèle proposé d'adaptation physiologique en cours d'infection

En résumé, sur base de leurs résultats, Lamontagne *et al.* ont avancé un modèle d'adaptation physiologique de *B. abortus* vis-à-vis de son hôte en cours d'infection. Ce modèle semble également applicable à *B. suis* ainsi que peut être à d'autres espèces de *Brucella*. Ainsi, tôt après avoir été phagocytée, *Brucella* se localise dans un compartiment transitoire qui s'avérerait être pauvre en substrats et en oxygène. Dès lors, le métabolisme de la bactérie subirait un ralentissement important et global caractérisé par une biosynthèse réduite d'acides aminés, de protéines et d'acides nucléiques. Une activité métabolique basale serait néanmoins maintenue avec notamment un TCA ralenti. Ce dernier serait alimenté par le glutamate, lui-même généré à partir d'autres acides aminés. *Brucella* activerait également d'autres voies cataboliques et utiliserait ses propres macromolécules (ribosomes et autres protéines de stress) pour générer des métabolites essentiels.

L'adaptation à ce nouvel environnement serait complète au bout de 20h après infection. A ce stade, *B. abortus* exploiterait essentiellement les acides aminés en tant que source de carbone. La production accrue de transporteurs d'acides aminés et de peptides suggère que les acides aminés exploités par la bactérie soient d'origine cellulaire. A l'inverse, la production de transporteurs de sucres semble réduite suggérant une faible abondance de ce type de substrat dans l'environnement rencontré par la bactérie. La biosynthèse des protéines et acides nucléiques de la bactérie serait par ailleurs restaurée.

Après une croissance importante au sein de la cellule 44h après infection, *B. abortus* semble présenter une physiologie similaire à celle des bactéries en phase stationnaire en conditions *in vitro*. Certaines voies comme les pentoses phosphate sont effectivement progressivement restaurées après un ralentissement important en début d'infection (Lamontagne, Forest et al. 2009).

Ce modèle permet d'expliquer l'atténuation de certaines souches mutantes précédemment décrites. Par exemple, il apparaît que les acides aminés semblent constituer une source importante de carbone et potentiellement d'énergie au cours de l'infection. Cela explique dès lors que les souches mutées au niveau de gènes tels que *gltD* (une sous-unité de la glutamate synthase) qui sont liés au métabolisme des acides aminés soient atténuées. Selon le modèle proposé, ces mutants ne semblent effectivement pas capables de s'adapter et donc de survivre à l'environnement intracellulaire dans les temps précoces d'infection (Hong, Tsolis et al. 2000).

L'identification des mutations atténuantes ainsi que les études récentes de protéomique ont de cette manière largement contribué à une meilleure compréhension de la physiologie de *Brucella* durant l'infection de macrophages. Sur base des résultats obtenus, un modèle a pu être établi qui devra être confirmé à l'avenir. Toutefois, ces études ne fournissent que peu d'informations précises concernant les substrats fournis par la cellule hôte qui sont nécessaires à la prolifération bactérienne. L'identification des sources carbonées prélevées par *Brucella* au sein de la cellule contribuerait à une meilleure compréhension de l'adaptation métabolique en cours d'infection. Cette adaptation est en outre directement liée à la pathogenèse de *Brucella*. En effet, Lamontagne *et al.* ont avancé que la virulence de *Brucella spp.* ne semble pas dépendre essentiellement des rares facteurs de virulences identifiés mais soit plutôt liée à l'association de ces quelques facteurs et de la physiologie de

la bactérie (Lamontagne, Forest et al. 2009). Une telle identification de sources carbonées prélevées par un pathogène et des voies métaboliques empruntées par celles-ci au cours d'une infection a déjà été réalisée sur une autre bactérie: *Listeria monocytogenes*.

#### IV. Le marquage isotopique et la spectrométrie de masse, des outils pour investiguer le métabolisme de pathogènes *in vivo*

Lors d'une étude récente, Eylert *et al.* sont parvenus pour la première fois à identifier les sources carbonées prélevées et métabolisées par un pathogène Gram positif à réplification cytoplasmique, *Listeria monocytogenes*, au sein de macrophages murins. Pour ce faire, ils ont mis au point une méthodologie basée sur la détermination du marquage isotopique des acides aminés déterminé par spectrométrie de masse couplée à de la chromatographie en phase gazeuse (GC/MS).

##### 1. Le principe du marquage

Un isotope stable d'un élément chimique se définit comme étant un atome non-radioactif dont le nombre de neutrons est différent. C'est le cas notamment du  $^{13}\text{C}$  ou encore du  $^{15}\text{N}$  qui ont chacun acquis un neutron supplémentaire. Certains de ces isotopes se retrouvent naturellement dans l'environnement, le  $^{13}\text{C}$  constituant par exemple approximativement 1,1% du carbone terrestre (Eisenreich, Slaghuis et al. 2006). Cette abondance naturelle peut être perturbée *in vivo* par l'apport d'un substrat marqué tel que le glucose uniformément marqué au  $^{13}\text{C}$  ([U- $^{13}\text{C}$ 6]) qui a été utilisé dans ce cas-ci. Ce glucose, lorsqu'il est ajouté au milieu de culture, peut être métabolisé par les différentes voies actives et générer des métabolites et macromolécules ayant elles-mêmes intégré un ou plusieurs  $^{13}\text{C}$ . L'incorporation d'un isotope provoque, suite à la présence d'un neutron supplémentaire, une augmentation d'une unité de la masse de la molécule considérée. Cette modification de masse peut alors être détectée par analyse GC/MS. Lors de cette étude, les auteurs se sont focalisés exclusivement sur le marquage des acides aminés protéinogéniques. Ce choix s'explique par le fait que ces acides aminés sont stables au cours du temps et fournissent des indications directes sur le métabolisme du carbone. De cette manière, Eylert *et al.* ont étudié séparément le marquage des acides aminés bactériens et celui des acides aminés cellulaires en cours d'infection.

##### 2. Identification des acides aminés prélevés ou synthétisés *de novo* par *Listeria* en cours d'infection

Comme contrôle, les auteurs ont identifié les acides aminés synthétisés *de novo* par les macrophages non-infectés. Pour ce faire, les cellules ont été cultivées dans du milieu de culture défini complété avec du glucose [U- $^{13}\text{C}$ 6] pour une durée de 6 heures.

Par la suite, deux autres procédures de marquage distinctes ont été menées et sont décrites ci-dessous.

###### A. Infection de macrophages prémarqués

La première implique un prémarquage des composants cellulaires durant 10 jours en présence de glucose [U- $^{13}\text{C}$ 6] avant infection par *Listeria monocytogenes*. Le milieu de culture marqué a ensuite été remplacé par du milieu classique durant l'infection. De cette manière, les acides aminés bactériens marqués ne peuvent provenir que de l'incorporation

d'acides aminés cellulaires et/ou de la métabolisation de composés marqués issus des cellules infectées.

Il est possible de déterminer si un acide aminé bactérien a été prélevé au sein de la cellule ou s'il a été synthétisé en comparant les profils de marquages isotopiques des fractions cellulaires et bactériennes. Ce profil se traduit par l'abondance relative des différentes formes de marquages existantes. A titre d'illustration, une molécule à trois carbones peut se présenter sous forme non-marquée, marquée avec un seul  $^{13}\text{C}$ , avec deux  $^{13}\text{C}$  ou totalement marquée avec trois  $^{13}\text{C}$ . Il a été postulé que si un acide aminé présente le même profil de marquage isotopique au niveau des cellules et au niveau des bactéries, il est plausible que cet acide aminé ait été prélevé en tant que tel par le pathogène. A l'inverse, deux profils dissemblables indiquent que les acides aminés bactériens marqués ont une origine biosynthétique spécifique. Ils ont par conséquent été biosynthétisés par la bactérie sur base de sources carbonées marquées prélevées à la cellule hôte.

#### B. Marquage isotopique en cours d'infection

Quant à la seconde procédure, elle consiste en un marquage au cours du processus infectieux. L'analyse des acides aminés bactériens et cellulaires dans ces conditions permet de nouveau d'identifier les acides aminés synthétisés *de novo* par la cellule. Il est également possible d'identifier les acides aminés cellulaires prélevés ou synthétisés *de novo* par la bactérie sur base de sources carbonées d'origine cellulaire.

### 3. Identification des sources de carbones disponibles en cours d'infection

Pour identifier les sources carbonées autres que les acides aminés qui sont prélevées, de nouvelles infections ont été réalisées avec différentes souches de *L. monocytogenes* mutées pour des étapes clés du métabolisme. Si une mutation affecte le transport ou la voie de métabolisation de la source carbonée fournie par la cellule hôte, le marquage des acides aminés de la souche mutée est plus faible. De cette manière, Eylert *et al.* ont mis en évidence que *L. monocytogenes* prélèverait vraisemblablement à la cellule hôte des métabolites à trois carbones comme le glycérol et/ou le dihydroxyacétone phosphate ainsi que du glucose-6-phosphate. Le métabolisme décrit de la sorte *in vivo* s'est avéré différent de celui qu'ils avaient précédemment décrit en conditions de culture *in vitro* (Eisenreich, Slaghuis *et al.* 2006; Eylert, Schar *et al.* 2008).

Ainsi, l'étude du profil isotopique des acides aminés après analyse par GC/MS permet une investigation en détail du métabolisme en cours d'infection d'une bactérie intracellulaire. C'est pourquoi, nous avons opté pour cette stratégie afin de caractériser le métabolisme de *Brucella abortus* 2308 en cours d'infection et d'identifier les sources carbonées prélevées par la bactérie au sein de la cellule infectée.

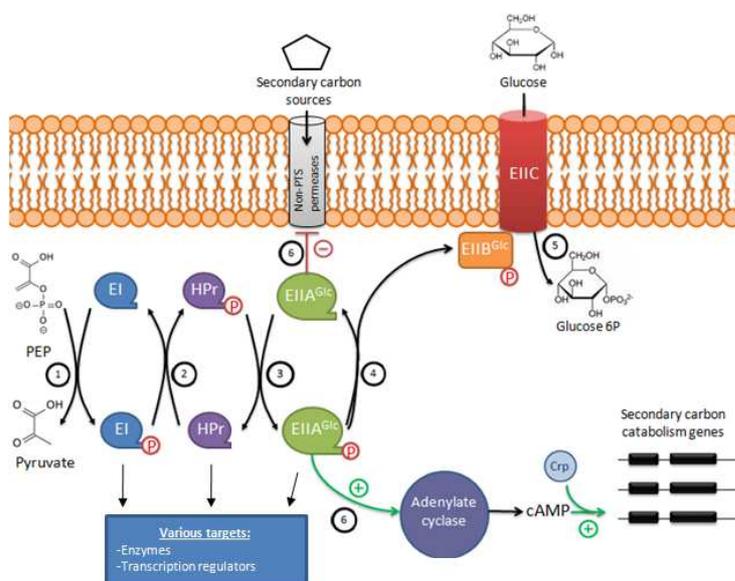
## V. Le système PTS, un régulateur métabolique

Le système phosphoénolpyruvate : carbohydre phosphotransferase ou système PTS est un régulateur global important. Il permet une adaptation de la physiologie bactérienne en fonction de la disponibilité en sources de carbone.

### 1. Les composants et fonctions de ce système

Lors de sa découverte chez *E. coli*, le système PTS a été décrit comme un système couplant le transport et la phosphorylation de nombreux sucres et dérivés (Deutscher, Francke et al. 2006). Ce système fonctionne comme un phosphorelais qui transfère un groupement phosphorylé d'un donneur initial, le phosphoénolpyruvate, au travers des différents acteurs du système, jusqu'à la phosphorylation finale d'une source carbonée internalisée.

Chez les bactéries Gram négatives, trois entités catalytiques sont requises pour ce transfert à savoir : l'enzyme I (EI), HPr (pour heat-stable, histidine-phosphorylatable protein) et l'enzyme II (EII). Alors que les protéines EI et HPr sont des composants généraux du système PTS, les enzymes II sont spécifiques d'une ou de quelques sources carbonées. Sur base des séquences, les enzymes sont regroupées en différentes familles telles que la famille du glucose (Glc), du fructose (Fru) ou encore du mannose (Man). Les enzymes II d'une même famille forment généralement un complexe classiquement composé des trois protéines : EIIA, EIIB et la protéine transmembranaire EIIC. Le groupement phosphorylé va ainsi être transféré séquentiellement du phosphoénolpyruvate à EI, HPr, EIIA, EIIB avant la phosphorylation terminale du sucre transporté par l'intermédiaire d'EIIC (Fig. 9). Ces phosphorylations successives ont lieu au niveau de résidus histidines à l'exception de la plupart des enzymes EIIB qui sont phosphorylés au niveau de résidus cystéines (Dozot M.; Barabote and Saier 2005; Deutscher, Francke et al. 2006; Poncet 2009).



**Figure 9. Représentation schématique du système PTS (du glucose) et du mécanisme de répression catabolique carbonée décrits chez *E. coli*.** Le système PTS est un phosphorelais permettant le transfert d'un groupement phosphorylé du phosphoénolpyruvate (PEP) à un sucre nouvellement transporté (le glucose dans ce cas-ci). Le transfert se fait par les intermédiaires successifs EI (1), HPr (2), EIIA (3), EIIB (4) et le sucre transporté par EIIC (5). Ce système permet de plus l'utilisation sélective des sources carbonées les plus préférées, phénomène connu en tant que répression catabolique carbonée (RCC). La RCC implique chez *E. coli* l'exclusion d'inducteurs et la modulation directe de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de sources secondaires. Cette régulation transcriptionnelle repose sur l'adénylate cyclase productrice de cAMP pouvant s'associer avec Crp pour former le complexe activateur transcriptionnel cAMP/Crp (6). De plus, les protéines du PTS peuvent directement interagir avec d'autres facteurs tels que des régulateurs transcriptionnels ou des enzymes.

Chez les bactéries Gram positives comme les Firmicutes, HPr peut être en outre phosphorylé au niveau d'un résidu sérine (différent donc de celui phosphorylé par EI). Cette phosphorylation est catalysée par une enzyme supplémentaire dénommée HprK/P (pour HPr kinase/phosphatase). L'activité kinase d'HprK requiert de l'ATP ou du pyrophosphate et est activée par le fructose 1-6 biphosphate, métabolite de la glycolyse. A l'inverse, cette phosphorylation est inhibée par du phosphate inorganique. Une fois HPr phosphorylé au niveau du résidu sérine, il devient réfractaire à une phosphorylation sur résidu histidine médiée par EI. Le phosphorelais se trouve dès lors ralenti (Dozot M.; Barabote and Saier 2005; Deutscher, Francke et al. 2006; Poncet 2009). Il apparaît par conséquent que le fonctionnement du PTS diffère entre bactéries Gram positives et Gram négatives.

La fonction de ce système ne se résume pas uniquement au transport couplé à la phosphorylation de sources carbonées. Le PTS constitue en effet un élément clé de la régulation de nombreux aspects de la physiologie bactérienne. Il est entre autres impliqué dans (i) la virulence en association avec des facteurs classiques, (ii) il sert de cofacteur enzymatique en fournissant notamment un groupement phosphate à la dihydroxyacétone kinase chez *E. coli* et (iii), il est essentiel au phénomène de répression catabolique carbonée (RCC ou Carbon Catabolite Repression) (Gutknecht, Beutler et al. 2001; Mertins, Joseph et al. 2007; Stulke 2007). Cette RCC est un mécanisme de régulation par lequel l'expression de gènes nécessaires au métabolisme de sources de carbones secondaires est inhibée en présence d'une source carbonée préférentielle. Il existe donc une hiérarchisation dans l'utilisation des sources de carbone et la RCC permet l'utilisation sélective de la source préférentielle (Dozot M.; Stulke and Hillen 1999; Barabote and Saier 2005; Poncet 2009). La mécanistique moléculaire sous-jacente dépend du type de bactérie considéré et diffère de nouveau entre bactéries Gram positives et bactéries Gram négatives.

## 2. La répression catabolique carbonée (RCC) chez *Escherichia coli*

Un des mécanismes de régulation de l'utilisation du carbone le mieux caractérisé est celui décrit chez *E. coli*. Ainsi, en l'absence de glucose, les intermédiaires du PTS de la famille du glucose (ou PTS<sup>Glc</sup>) ne peuvent transférer leur phosphate et restent donc phosphorylés. Sous forme phosphorylée, EIIA<sup>Glc</sup> active l'adénylate cyclase qui génère de l'AMP cyclique (cAMP). Ce dernier peut alors se lier à Crp (cAMP Receptor Protein) (Fig.9) et le complexe cAMP-Crp constitue un activateur transcriptionnel de gènes nécessaires au catabolisme de sources de carbone secondaires comme le lactose. L'absence d'une source de carbone primaire active donc l'expression de gènes impliqués dans le catabolisme de sources secondaires.

En présence de glucose, EIIA<sup>Glc</sup> se présente sous forme non phosphorylée et est capable d'inhiber entre autres le transport du lactose. Il y a de cette manière prévention de la formation d'allolactose, l'inducteur de la transcription de l'opéron lactose. Ce mécanisme est connu en tant qu'exclusion d'inducteur.

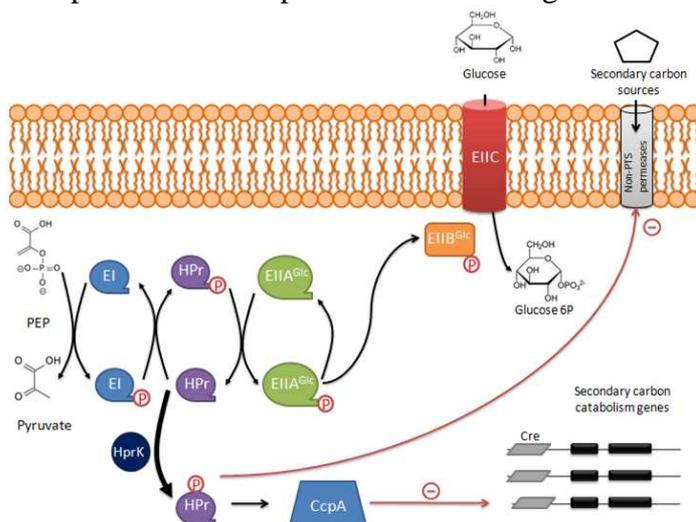
La RCC chez *E. coli* est ainsi médiée par deux mécanismes, l'un cAMP-dépendant et l'autre par exclusion d'inducteurs. Ce système de RCC a longtemps été considéré comme représentatif pour la plupart des bactéries Gram négatives, toutefois un nombre croissant d'arguments démontrent l'existence de différences chez les bactéries non-entériques telles que *Pseudomonas spp.* (Collier, Hager et al. 1996; Stulke and Hillen 1999; Pinedo, Bringhurst et al. 2008).

### 3. La RCC chez les bactéries Gram positives (avec un faible contenu en GC)

Alors que EIIA joue un rôle central dans le phénomène de RCC chez de nombreuses bactéries Gram négatives, c'est HPr qui constitue la protéine clé chez la plupart des Gram positives. Comme signalé précédemment HPr peut être phosphorylé sur deux sites, au niveau d'une histidine par EI (HPr-His-P) ou au niveau d'une sérine par HprK/P (HPr-Ser-P). L'abondance de l'une ou l'autre forme dépend directement des substrats disponibles pour la bactérie. En effet, en présence d'une source carbonée métabolisée efficacement comme le glucose chez *Bacillus subtilis*, l'activité kinase d'HprK va être activée par la production d'ATP ainsi que par le fructose 1-6 biphosphate. HPr phosphorylé au niveau d'un résidu sérine peut alors interagir avec le régulateur transcriptionnel CcpA (Catabolite control protein A) et l'association HPr-Ser-P/CcpA module la transcription de nombreux gènes présentant en amont un site Cre (catabolite response element) (Fig.10). L'expression des gènes nécessaires au catabolisme de sources carbonées secondaires se trouve de cette manière réprimée (Reizer, Hoischen et al. 1998). De plus, il semblerait que chez certaines espèces, HPr-Ser-P puisse aussi exclure des inducteurs en interagissant avec des systèmes de transport de sucres (Saier, Chauvaux et al. 1996; Stulke and Hillen 1999; Viana, Monedero et al. 2000; Pinedo, Bringham et al. 2008).

A l'inverse, sous forme phosphorylée au niveau d'un résidu histidine, HPr peut moduler l'activité de nombreux facteurs tels que des activateurs transcriptionnels disposant d'un site PRD (PTS regulation domain) phosphorylable. La phosphorylation de ces sites PRD par HPr-His-P induit l'expression de certains gènes encodant en général des protéines du PTS. Ainsi, l'expression de ces gènes est réprimée en présence d'un substrat tel que le glucose. En effet, HPr-His-P se trouvant en quantité moindre, la phosphorylation activatrice des sites PRD est réduite (Kruger, Gertz et al. 1996; Deutscher, Francke et al. 2006; Poncet 2009).

Le mécanisme de RCC est d'autant plus complexe que EIIB sous forme phosphorylée peut également activer les sites PRD. Ainsi, en l'absence de source carbonée préférentielle, EIIB peut activer l'expression de certains gènes liés au PTS (Poncet 2009).



**Figure 10. Représentation schématique du système PTS (du glucose) et du mécanisme de répression catabolique carbonée décrits chez les bactéries Gram positives.** Le PTS des bactéries Gram positives inclut une kinase HprK supplémentaire pouvant phosphoryler HPr au niveau d'un résidu sérine. Cette phosphorylation a lieu en présence d'un substrat préférentiel tel que le glucose. HPr – Ser-P interagit alors avec CcpA et le complexe formé réprime l'expression de nombreux gènes incluant notamment des gènes impliqués dans le catabolisme de sources de carbone secondaires. HPr-Ser-P peut aussi interagir et inhiber certains transporteurs excluant de la sorte des inducteurs. HPr phosphorylé au niveau d'une histidine par EI a également de nombreux effets comme la phosphorylation de sites PRD régulant l'expression de gènes du PTS.

Globalement, il apparaît que de manière relativement similaire à de nombreuses bactéries Gram négatives, la RCC chez les bactéries Gram positives soit médiée par deux types de mécanismes différents : l'un CcpA/Cre dépendant et l'autre par exclusion d'inducteurs.

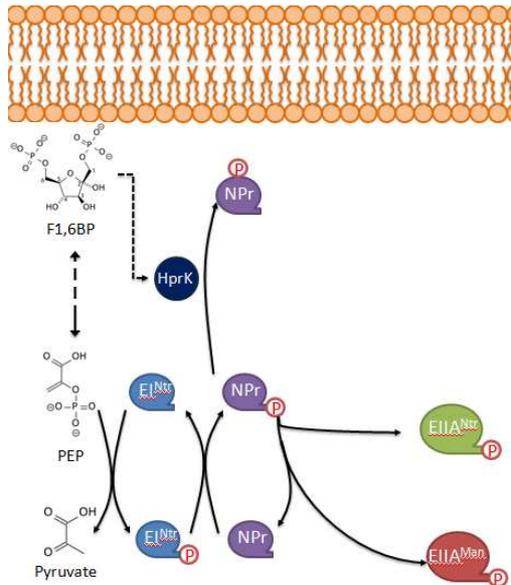
## 4. Le système PTS chez *Brucella*

### A. Un système hybride...

Comme mentionné précédemment et au vu de ces observations, il ressort qu'indépendamment du type de bactérie considérée, le système PTS semble constituer un élément majeur de la régulation du métabolisme carboné bactérien. Dès lors, il est intéressant que l'investigation de cette composante du métabolisme de *Brucella* se fasse en parallèle de l'étude de ce système régulateur.

L'analyse des séquences génétiques disponibles pour différentes espèces d'alpha-protéobactéries a révélé que la plupart ne disposent soit d'aucun gène codant pour des protéines du PTS, soit qu'elles disposent comme *Brucella* de différents intermédiaires mais pas de perméase de type EIIC (Barabote and Saier 2005). En effet, des gènes homologues à ceux d'*E. coli* codant pour des protéines d'un système PTS particulier ont été identifiés. Ce système PTS dénommé PTS<sup>Ntr</sup> (pour PTS nitrogen) a été décrit chez *E. coli* comme étant encodé par des paralogues du PTS de la famille du fructose. Les différentes protéines dont il est composé sont désignés en tant que « nitrogen enzyme I » (EI<sup>Ntr</sup>), « nitrogen HPr » (NPr) et « nitrogen enzyme IIA » (EIIA<sup>Ntr</sup>). La chaîne de phosphorylation constituée par ce système semble peu liée au PTS classique. Le PTS<sup>Ntr</sup> est supposé avoir essentiellement une fonction régulatrice, notamment au niveau du couplage du métabolisme de l'azote et du carbone (Powell, Court et al. 1995; Reizer, Reizer et al. 1996; Rabus, Reizer et al. 1999). Les gènes homologues ayant été identifiés chez *Brucella* sont quant à eux dénommés *ptsP*, *ptsO*, *ptsN* et codent respectivement pour EI<sup>Ntr</sup>, NPr et EIIA<sup>Ntr</sup>. Un autre gène a également été identifié dans le génome de *Brucella* à savoir *ptsM*. Ce dernier est un homologue du gène codant pour l'enzyme EIIA de la famille du mannose (EIIA<sup>Man</sup>) chez *E. coli*. Enfin, un cinquième gène associé au système PTS dénommé *hprk* a été identifié. Il s'avère être un homologue du gène codant pour la kinase/phosphatase d'HPr spécifique des bactéries Gram positives. Le gène *hprk* chez *Brucella* semble toutefois être tronqué car il ne dispose pas d'un domaine qui a été associé à l'activité phosphatase (Dozot M.).

Il a été récemment démontré que ce système hybride entre bactéries Gram positives et négatives constitue bien un phosphorelais impliquant séquentiellement la phosphorylation d'un résidu histidine de EI<sup>Ntr</sup>, NPr puis soit EIIA<sup>Man</sup>, soit EIIA<sup>Ntr</sup> (Fig. 11). En outre, il s'est avéré que de manière similaire au mécanisme rencontré chez les bactéries Gram positives, NPr peut également être phosphorylé au niveau d'un résidu sérine par la protéine HprK. Cette dernière semble effectivement disposer d'une activité kinase nécessitant soit de l'ATP soit un pyrophosphate. Ces deux types de phosphorylation sont inhibées par du phosphate inorganique. L'activité kinase ATP-dépendante de HprK est activée en présence de fructose 1-6 bisphosphate. Ce dernier, de par l'absence de phosphofructokinase chez *Brucella* constitue un métabolite de la néoglucogenèse ce qui contraste avec la situation décrite précédemment chez les Firmicutes. Quant à l'activité phosphatase de l'enzyme, elle n'a pas pu être mise en évidence chez *Brucella* ce qui peut s'expliquer de par l'absence du domaine associé à cette activité catalytique (Dozot M.).

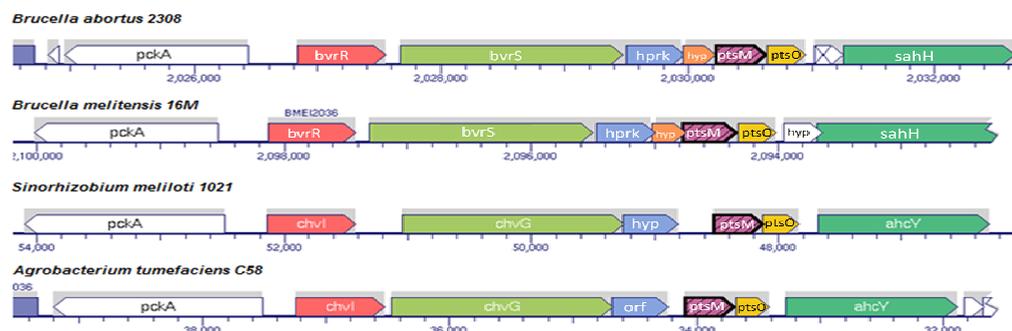


**Figure 11. Représentation schématique du système PTS de *Brucella*.** Le PTS décrit chez *Brucella* est un système hybride mêlant des intermédiaires de différentes familles de PTS (Nitrogen et Mannose) et comprend une kinase HprK typique des bactéries Gram positives. Ce système constitue bien un phosphorelais, le groupement phosphorylé, initialement fourni par phosphoénolpyruvate, transite via EII<sup>Ntr</sup>, NPr puis soit EIIA<sup>Ntr</sup> soit EIIA<sup>Man</sup>. Npr peut également être phosphorylé par HprK. Les fonctions de ce système restent globalement méconnues mais l'absence de perméase suggère un rôle régulateur majeur.

## B. ...aux fonctions méconnues

### PTS et virulence

Les fonctions de ce système chez *Brucella* restent méconnues, cependant un nombre croissant de liens entre PTS et virulence ont récemment été mis en évidence chez *Brucella* ainsi que chez d'autres pathogènes (Mertins, Joseph et al. 2007; Stulke 2007). D'une part, il s'avère que les gènes *ptsO*, *ptsM* et *hprk* sont localisés dans un locus génétique conservés parmi les alphaprotéobactéries. Ce locus comprend en plus des gènes du PTS, *sahH* codant pour une S-adenosylhomocystéine hydrolase impliquée dans le métabolisme de la méthionine, ainsi que les gènes *bvrR* et *bvrS* codant pour le système à deux composants BvrR-BvrS essentiel à la virulence de *Brucella* (cfr point II.1.B) (Fig. 12). Le gène, *pckA* codant pour la phosphoénolpyruvate carboxykinase intervenant dans la néoglucogénèse se situe également à proximité du locus mais dans une orientation opposée aux autres gènes. Il a récemment été démontré que l'ensemble de ces gènes, exception faite de *pckA*, sont liés transcriptionnellement. Le couplage transcriptionnel entre gènes du PTS et gènes du système à deux composants BvrR-BvrS suggère l'existence d'un lien potentiel entre système PTS et virulence. Cette observation renforce aussi l'hypothèse récente que le système BvrR-BvrS soit impliqué dans le métabolisme (Dozot M.; Lamontagne, Butler et al. 2007).



**Figure 12. Structure et conservation du locus génétique comprenant les gènes *pts O*, *ptsM* et *hprk*.** Le locus génétique représenté sur cette figure comprend les gènes codant pour le système à deux composants BvrR-BvrS (*bvrR* et *bvrS*), les protéines du PTS que sont HprK (*hprk*), EIIA<sup>Man</sup> (*ptsM*) et NPr (*ptsO*), la S-adenosyl-L-cystéine hydrolase impliquée dans le métabolisme de la méthionine (*sahH*) et la phosphoénolpyruvate carboxykinase (*pckA*). Ce locus est conservé parmi les différentes espèces d'alpha-protéobactéries comme *Brucella*, *Agrobacterium tumefaciens* et *Sinorhizobium meliloti*. Il présente de plus des propriétés similaires à un opéron, les différents gènes étant transcriptionnellement liés à l'exception de *pckA* qui se trouve en orientation opposée (d'après MetaCyc: <http://www.metacyc.org>).

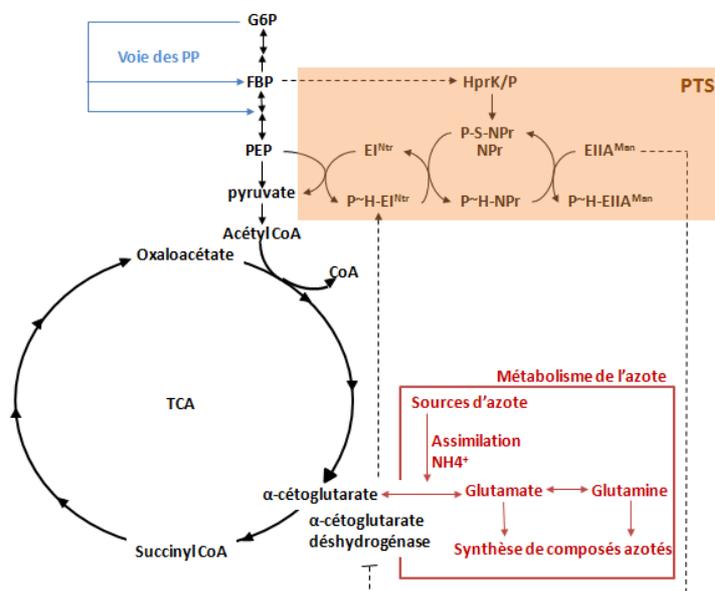
D'autre part, afin d'investiguer l'existence de ce lien et de comprendre de manière globale les fonctions du PTS chez *Brucella melitensis* 16M, des mutants ont été élaborés dans notre laboratoire (Dozot M.). Il a été constaté que les mutants ne produisant plus  $EI^{Ntr}$ ,  $NPr$ ,  $EIIA^{Ntr}$  ainsi que dans une moindre mesure  $HprK$ , présentent un phénotype de petites colonies sur milieu riche solide (2YT). Ce phénotype qui a déjà été observé au préalable, a été associé à une persistance de bactéries virulentes dans l'hôte (Jacob, Hort et al. 2006). En outre, les mutants délétés de *ptsO* ( $NPr$ ) ou de *ptsP* ( $EI^{Ntr}$ ) produisent de manière drastiquement réduite les sous-unités  $VirB5$  et  $VirB10$  du système de sécrétion de type IV lui-même essentiel à la virulence. Il a dès lors été proposé que le système PTS puisse constituer un senseur de l'état métabolique de la bactérie activant, en collaboration avec la réponse de stringence, l'expression de l'opéron *virB* et la production du système de sécrétion de type IV durant l'infection (Dozot M.).

Cependant, les différentes souches mutées pour les composants du système PTS ne présentent pas d'atténuation en modèle cellulaire et murin d'infection. Le lien entre PTS et virulence reste ainsi incomplètement compris à ce jour (Dozot M.).

#### PTS et métabolisme du carbone et de l'azote

Par ailleurs, le fait qu'aucun homologue de perméase n'ait pu être identifié chez *Brucella* suggère que ce système PTS particulier puisse avoir essentiellement une fonction régulatrice globale qui reste actuellement inconnue (Dozot M.; DelVecchio, Kapratl et al. 2002; Paulsen, Seshadri et al. 2002; Halling, Peterson-Burch et al. 2005).

Un premier modèle a néanmoins été proposé par Dozot *et al.* Ce modèle avance l'hypothèse que le système PTS de *Brucella* soit impliqué dans la coordination du métabolisme du carbone et de l'azote (Fig.13). Cette coordination serait basée sur la capacité de  $EI^{Ntr}$  de fixer l'alpha-cétoglutarate qui est un métabolite clé entre métabolisme de l'azote et du carbone. De la sorte,  $EI^{Ntr}$  pourrait constituer un senseur de l'azote et du carbone cellulaire permettant au système PTS de réguler des enzymes métaboliques en conséquence. Cette régulation en aval de la fonction sensorielle de  $EI^{Ntr}$  impliquerait  $EIIA^{Man}$  qui semble capable d'interagir avec une sous-unité de l'alpha-cétoglutarate déshydrogénase. Cette interaction aurait vraisemblablement un effet inhibiteur sur la déshydrogénase lorsqu' $EIIA^{Man}$  se trouverait sous forme déphosphorylée.  $HprK$  intervient également dans ce modèle en phosphorylant  $NPr$ . Cette phosphorylation amenant à un ralentissement du phosphorelais, elle favoriserait l'inhibition de l'alpha-cétoglutarate déshydrogénase.



**Figure 13. Modèle de régulation du métabolisme carboné et azoté par le PTS (adapté de M. Dozot).** Le modèle proposé implique que le PTS régule le métabolisme du carbone et de l'azote.  $EI^{Ntr}$  pourrait en effet constituer un senseur de l'état métabolique de la bactérie en se fixant à l'alpha-cétoglutarate.  $EI^{Ntr}$  pourrait transmettre ensuite un signal à  $EIIA^{Man}$  qui en conséquence modulerait l'activité de l'alpha-cétoglutarate déshydrogénase. Sous forme non phosphorylée,  $EIIA^{Man}$  aurait vraisemblablement une action inhibitrice sur l'alpha-cétoglutarate déshydrogénase. La protéine  $HprK$  interviendrait également dans ce modèle suite au ralentissement du phosphorelais qu'elle provoque en phosphorylant  $NPr$  au niveau d'un résidu sérine. Suite à ce ralentissement,  $EIIA^{Man}$  se trouverait sous forme déphosphorylée et inhiberait l'alpha-cétoglutarate déshydrogénase (Dozot M.).

En parallèle, le système BvrR-BvrS pourrait également constituer un lien entre métabolisme de l'azote et du carbone. Ce système a deux composants pourrait en effet potentiellement réguler l'alpha-cétoglutarate déshydrogenase et le senseur protéique PII qui contrôle le métabolisme de l'azote (Dozot M.; Lamontagne, Butler et al. 2007).

Néanmoins, ce modèle doit encore être confirmé. D'autre part il ne fournit que des informations préliminaires quant aux fonctions régulatrices du système PTS chez *Brucella*. C'est pourquoi nous avons poursuivi l'étude menée dans notre laboratoire avec une attention particulière sur les implications métaboliques du PTS hybride de *Brucella*.

---

# Objectifs

---

Comme les résultats d'études présentés dans l'introduction bibliographique le suggèrent, le métabolisme d'un organisme pathogène semble constituer un fondement de la pathogénèse. Cela semble d'autant plus vrai chez le pathogène *Brucella* dont la virulence apparaît comme étant directement le résultat d'une coordination entre adaptation métabolique de la bactérie vis-à-vis de son hôte et un nombre restreint de facteurs de virulence.

Jusqu'à présent, comme pour la plupart des pathogènes, le métabolisme de *Brucella* a été essentiellement caractérisé par des tests d'activité enzymatique sur extraits cellulaire ou par des méthodes *in silico* sur base des génomes séquencés. Les résultats de ces études ne seraient en rien représentatifs de la physiologie existant en cours d'infection. A ce titre, nous souhaitons initier la caractérisation du métabolisme du carbone de *Brucella* dans la cellule infectée. Notre premier objectif est ainsi d'identifier les sources carbonées prélevées par *B. abortus* 2308 en cours d'infection. Dans cette optique, il a été préalablement nécessaire de mettre au point un protocole permettant d'isoler les *Brucella* intracellulaires avant d'obtenir des résultats préliminaires.

D'autre part, un second objectif était de caractériser le lien entre le système PTS et le métabolisme chez *Brucella abortus* 2308. Pour ce faire, il a d'abord été nécessaire de construire des souches délétées des gènes codant pour les différents composants du PTS avant d'entamer leur caractérisation impliquant notamment l'étude de leur croissance sur différents milieux.

---

# Résultats

---

# Résultats

## Chapitre 1: Identification des sources de carbone prélevées par *B. abortus* 2308 en cours d'infection

La procédure mise au point par (Eylert, Schar et al. 2008) permet la caractérisation du métabolisme d'un pathogène en cours d'infection. Cette méthode a pour buts :

- l'identification des acides aminés synthétisés *de novo* par les cellules non-infectées,
- l'identification des acides aminés prélevés par la bactérie au sein de la cellule,
- l'identification des acides aminés synthétisés *de novo* par la bactérie sur base d'une ou de sources carbonées fournies par la cellule,
- et enfin l'identification de ces sources carbonées par l'intermédiaire de souches mutantes.

Ces identifications reposent sur l'analyse de marquage isotopique des acides aminés protéinogéniques cellulaires et bactériens par spectrométrie de masse. Pour ce faire, il est nécessaire de séparer fractions cellulaires et bactériennes ainsi que de collecter une quantité de matière sèche d'un minimum d'1 mg pour chaque fraction. Il a donc préalablement été nécessaire de développer un protocole permettant de collecter une telle quantité de masse sèche de *Brucella* intracellulaires.

### I. Mise au point du protocole

#### 1. Récolte d'une masse sèche 100 fois trop faible

En dépit de nombreuses modifications apportées au protocole décrit par *Eylert et al.* (cfr section matériel et méthodes), la masse sèche bactérienne finalement collectée est faible (Fig. 14). En effet, la quantité de matière sèche maximale ayant pu être collectée post-infection est d'approximativement 10 µg. Ainsi, pour atteindre le seuil des 1 mg fixé, il est nécessaire de réaliser l'infection d'un minimum de 100 flacons de culture cellulaire (175 cm<sup>2</sup>/flacon).

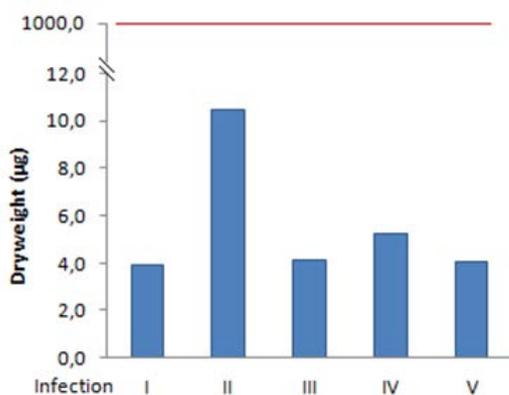


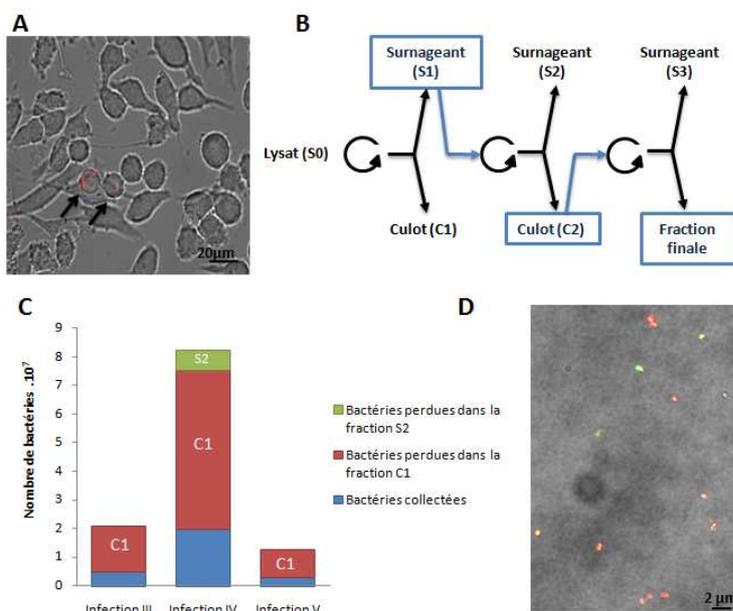
Figure 14. Récapitulatif des rendements en matière sèche des cinq premières procédures d'infection (adaptées d'Eylert et al). Le seuil fixé pour l'analyse GC/MS est illustré par un trait (1 mg).

Trois hypothèses ont été avancées pour expliquer l'inefficacité des protocoles testés : (i) l'efficacité d'infection est faible, (ii) une fraction importante des bactéries est perdue lors des étapes intermédiaires de la phase de séparation, de fractionnement et (iii) la plupart des bactéries collectées sont mortes. Cette dernière hypothèse s'explique par le fait que la

matière sèche collectée est estimée uniquement sur base de comptage de CFU<sup>1</sup>. Seules les bactéries vivantes sont donc considérées, or, dans le cadre d'une analyse GC/MS, il n'est pas nécessaire que les bactéries collectées soient viables étant donné la stabilité des acides aminés que l'on souhaite analyser. Par conséquent, si une proportion importante des bactéries collectées est morte, il existerait un biais dans nos estimations de masse sèche utile qui serait dès lors sous-estimée. Chacune des trois hypothèses a donc été testée.

Afin d'évaluer l'efficacité d'infection (c'est-à-dire à la fois la fréquence de cellules infectées et la charge bactérienne au sein de ces cellules infectées) de nouvelles infections ont été réalisées avec une souche de *B. melitensis* 16M exprimant le fluorochrome mCherry (Fig. 15A).

La fréquence de cellules HeLa infectées n'a pu être estimée tant elle était faible. Tandis que la charge bactérienne au sein des rares cellules infectées est relativement importante après 48h. Ces résultats supportent de la sorte l'hypothèse d'une faible efficacité d'infection.



**Figure 15. Identification des causes des faibles rendements en matière sèche bactérienne récoltée post-infection.** Les trois hypothèses avancées ont été testées. (A) L'efficacité d'infection de cellules HeLa a été déterminée au cours d'une infection de ces cellules par une souche de *B. melitensis* 16M exprimant le fluorochrome mCherry. (B et C) La proportion de bactéries perdues en cours de fractionnement a été estimée sur base de comptages de CFU. Les différentes étapes et fractions du protocole sont représentées à la figure (B), les flèches en spirale représentant une étape de centrifugation (pour plus de détail cfr section Matériel et méthodes). Les résultats de comptages sont illustrés en (C). (D) Enfin, la proportion de bactéries mortes finalement collectées post-infection a été déterminée par test Live-dead.

En vue de tester la seconde hypothèse nous avons réalisé des étalements et comptages de CFU pour chaque étape intermédiaire du processus de fractionnement (le protocole de fractionnement est schématisé à la Fig. 15B tandis que les résultats de comptages sont illustrés à la Fig. 15C). Ces comptages ont mis en évidence que près de 75% des bactéries sont perdues, et ce, principalement dans le culot après la première centrifugation. Une perte mineure est également observée dans la fraction S2. Ces résultats supportent ainsi la seconde hypothèse. Une telle perte peut s'expliquer soit par des vitesses de centrifugation inadaptées, soit, plus vraisemblablement par une lyse incomplète des cellules infectées ne permettant pas la libération des bactéries intracellulaires.

Enfin, un test live-dead a été effectué sur la fraction finale de sorte à tester notre troisième hypothèse suggérant que la majorité des bactéries collectées sont mortes. Ce test permet effectivement de distinguer les bactéries vivantes marquées en vert des mortes apparaissant en rouge en microscopie à fluorescence (Fig. 15D). Les observations réalisées

<sup>1</sup> Une CFU est une colonie bactérienne issue théoriquement de la multiplication d'une unique bactérie. Le comptage de ces colonies macroscopiques permet donc une estimation aisée du nombre initial de bactéries viables.

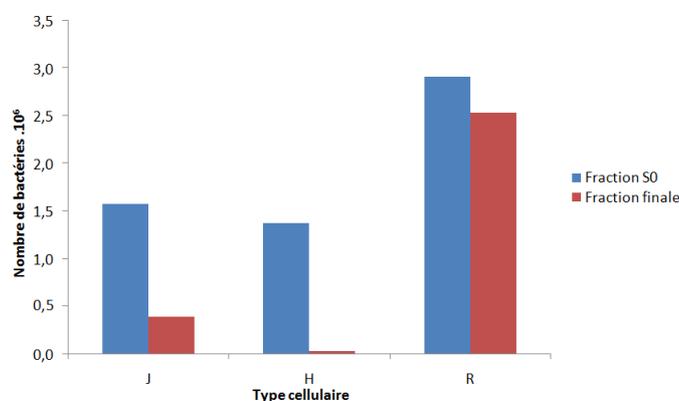
ont démontré que près de 80% des bactéries sont mortes. Cette évaluation se base toutefois sur un nombre restreint de bactéries mais semble indiquer une mortalité importante. Cela implique que la matière sèche utile collectée soit sous-estimée sur la seule base de comptages de CFU.

Par conséquent, les faibles rendements de matière sèche bactérienne collectée post-infection sont dus à la convergence d'une faible efficacité d'infection, d'une perte importante de bactéries au cours du processus de fractionnement et à une sous-estimation de la matière sèche liée à un taux de mortalité importante. L'identification de ces causes permet de déterminer de nouvelles solutions en vue d'optimiser le rendement en matière sèche.

## 2. HeLa, RAW ou J774 ? Que le plus faible gagne !

Une perspective aisée à mettre en place est l'utilisation d'une autre lignée cellulaire permettant une efficacité d'infection plus élevée que les HeLa. Nous avons ainsi testé les lignées de macrophages murins RAW et J774. Trois flacons T25 de chaque type cellulaire ont été infectés afin d'évaluer l'efficacité d'infection sur chaque lignée. Ces flacons ont par la suite subi une lyse et un fractionnement similaires aux procédures présentées précédemment (cfr matériel et méthodes). Des étalements et comptages de CFU ont été réalisés avant (S0) et après fractionnement (fraction finale) (Fig. 16). Les résultats mettent en évidence un meilleur taux d'infection chez les cellules RAW. Ces dernières permettent en effet de collecter deux fois plus de bactéries avant le processus de fractionnement et 100 fois plus après. C'est pourquoi, nous avons depuis lors opté pour le type cellulaire RAW.

Figure 16. Efficacité d'infection des cellules J774, HeLa et RAW par *B. abortus* 2308. J: J774, H: HeLa, R: Raw.



En dépit de l'existence d'autres optimisations possibles du protocole initial d'Eylert *et al.*, ce dernier a été abandonné depuis la publication d'un protocole ayant déjà été utilisé avec *B. abortus* 2308.

## 3. Un protocole directement adapté à *B. abortus* 2308

Au cours de leur étude du protéome de *B. abortus* 2308, Lamontagne *et al.* ont également procédé à l'isolement de *Brucella* intracellulaires (Lamontagne, Forest *et al.* 2009). La modification majeure apportée par cette étude réside au niveau du protocole de fractionnement qui implique l'utilisation d'un gradient discontinu de sucrose pour isoler les bactéries. Cette méthode a dès lors été testée après de légères modifications (Fig. 17) et s'est révélée efficace en permettant de récolter près de 300 µg de matière sèche bactérienne par T25 infecté.

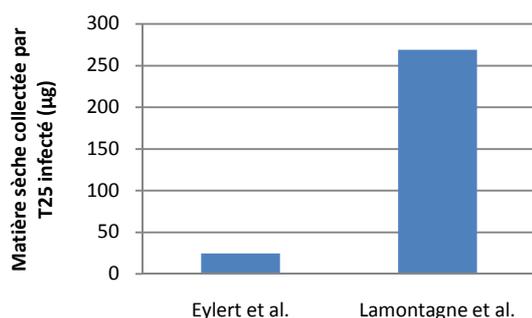


Figure 17. Comparatif des rendements maximaux en masse sèche obtenus pour les deux types de protocoles testés.

Le protocole final implique donc l'infection synchronisée de 10 T25 de cellules RAW semi-confluentes ( $2.10^5$  cellules/ml) à une MOI de 300 durant 48h. Les cellules infectées sont ensuite lysées par un premier traitement au PBS triton 1% suivi d'un second à 0,1%. Les flacons sont de plus lavés avec du PBS. Les lysats ainsi constitués subissent une première centrifugation à faible vitesse sur un coussin de sucrose 0,8M dans lequel la fraction cellulaire va être isolée. Le culot est collecté et conservé, tandis que le surnageant subit une seconde centrifugation à haute vitesse sur un gradient discontinu de sucrose. Les *Brucella* se localisent alors dans le culot et sont également collectées.

## II. Données préliminaires sur le métabolisme des cellules RAW et de *B. abortus* 2308

Trois expériences de marquage isotopique ont été menées : (i) marquage de cellules non-infectées, (ii) marquage des acides aminés durant le processus d'infection et (iii) le pré-marquage de cellules RAW avant infection. Le déroulement de chacune de ces expériences est illustré sous forme de lignes du temps à la figure suivante (Fig. 18).

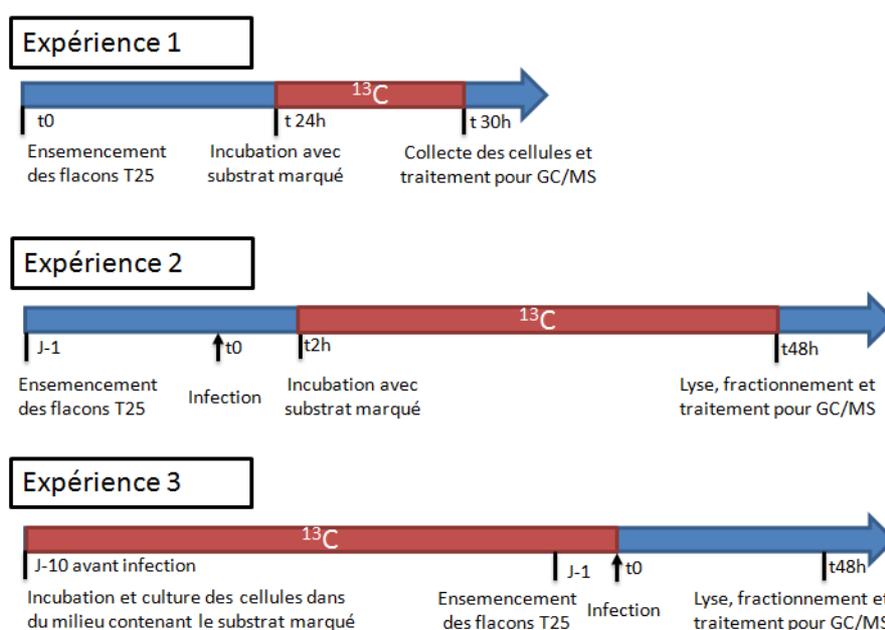


Figure 18. Lignes du temps reprenant les étapes majeures des trois procédures de marquages par isotope  $^{13}\text{C}$  des acides aminés protéinogéniques. La période d'incubation avec le glucose [ $\text{U-}^{13}\text{C6}$ ] est illustrée en rouge avec le sigle «  $^{13}\text{C}$  ». Le début de l'infection est représenté par une flèche et constitue le temps  $t_0$ .

## 1. Les macrophages murins RAW synthétisent de l'alanine, de la sérine, de la glycine, de l'aspartate et du glutamate *de novo*

Au cours de la première expérience de marquage isotopique, les cellules ont été cultivées 6 h dans du milieu DMEM complété et contenant 10,7 mM de glucose uniformément marqué au  $^{13}\text{C}$  ([U- $^{13}\text{C}$ 6]). L'excédent de marquage a été analysé au niveau des acides aminés (cfr section Matériel et méthodes). Cela a permis d'identifier les acides aminés synthétisés *de novo*, soit les acides aminés nouvellement synthétisés par la cellule sur base de sources carbonées dérivées du glucose [U- $^{13}\text{C}$ 6] dans ce cas-ci (Fig. 19 expérience 1).

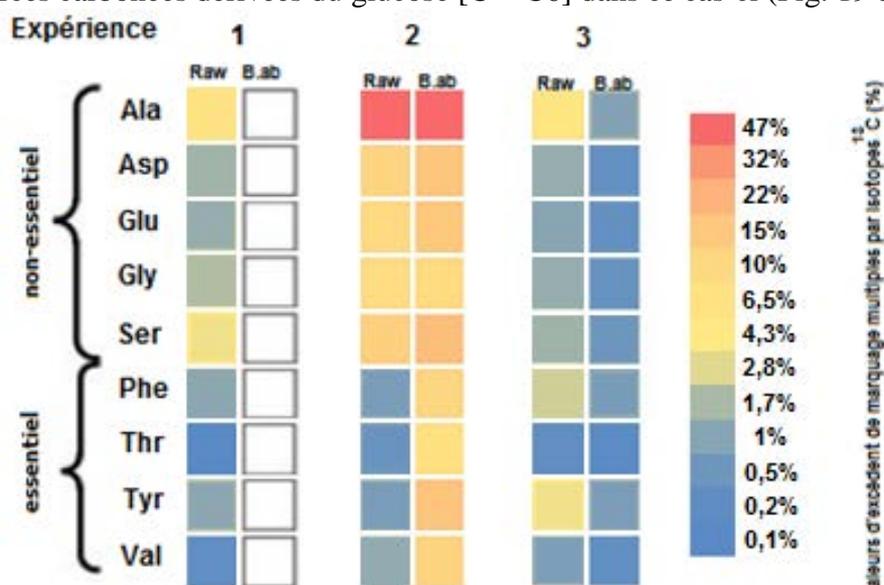


Figure 19. Valeurs d'excédent de marquage multiples par isotope  $^{13}\text{C}$  des acides aminés dérivés des protéines cellulaires et bactériennes. L'échelle colorée indique les valeurs d'excédent qui ont été calculées selon l'équation  $[2*(M+2) + 3*(M+3) + \dots + n*(M+n)]/n$  avec M représentant la masse du fragment de l'acide aminé considéré et n étant le nombre de carbone de ce même fragment. Les expériences considérées sont 1: marquage de cellules non infectées durant 6 heures, 2: marquage durant l'infection, 3: infection après prémarquage des composants cellulaires durant 10 jours.  
B. ab (B. abortus 2308), Ala (alanine), Asp (aspartate), Glu (glutamate), Gly (glycine), Ser (sérine), Phe (Phénylalanine), Thr (thréonine), Tyr (tyrosine), Val (valine).

L'analyse du marquage des acides aminés des macrophages RAW révèle que les acides aminés essentiels présentent des valeurs d'excédent de marquage (VEM, cfr section Matériel et Méthodes) proches de 0. Les faibles valeurs obtenues sont certainement liées au fait que l'on se trouve à la limite de la résolution de la technique. Ces résultats étaient attendus *a priori*, étant donné que la cellule ne synthétise pas ces acides aminés mais les prélève dans le milieu. Cela confirme que la méthode développée est fiable.

Au niveau des acides aminés non-essentiels, l'alanine, la sérine, la glycine, l'aspartate et le glutamate présentent des VEM comprises entre 6% à 1,3%. Ces acides aminés sont par conséquent synthétisés *de novo* par les cellules RAW en conditions classiques de culture *in vitro*.

## 2. L'alanine est l'acide aminé majoritairement marqué dans les deux fractions après un marquage en cours d'infection

Au cours d'une seconde expérience de marquage, les macrophages ont été exposés au substrat marqué au cours de l'infection (Fig. 19 expérience 2).

Dans la fraction cellulaire, l'alanine présente la valeur d'excédent de marquage la plus importante avec 46%. Ce taux, supérieur à celui observé lors de l'expérience précédente, s'explique par le temps d'incubation de 48h nettement plus long que précédemment. Cette

observation est d'ailleurs valable pour l'ensemble des acides aminés. La sérine, l'aspartate, le glutamate et la glycine présentent des valeurs d'excédent de marquage comprises entre 12 et 8%. Ces résultats confirment les observations précédemment décrites qui indiquent l'existence d'une biosynthèse *de novo* de ces acides aminés par la cellule. Au niveau des acides aminés essentiels, les valeurs sont relativement faibles, de l'ordre de 1% ou inférieur ce qui confirme de nouveau la fiabilité de la technique.

L'alanine est également l'acide aminé ayant la VEM la plus importante dans la fraction bactérienne avec 46%. La sérine, la tyrosine, l'aspartate, le glutamate, la valine et la phénylalanine présentent des taux compris entre 18 et 10% tandis que la glycine et la thréonine sont caractérisées par des valeurs légèrement plus faibles de 8 et 7% respectivement.

Ces observations mettent en évidence que tous les acides aminés bactériens sont marqués. Le fait que la phénylalanine, la thréonine, la tyrosine et la valine aient incorporé des isotopes indique que ces acides aminés, étant essentiels pour les cellules hôtes, ont été synthétisés *de novo* par *Brucella*.

Pour ce qui est des acides aminés non-essentiels, ils peuvent avoir deux origines non-exclusives. Soit ils sont fournis directement par la cellule hôte et sont utilisés sans remaniement du squelette carboné, soit ils sont synthétisés par la bactérie sur base d'une source carbonée marquée et prélevée à la cellule hôte. Néanmoins, le fait que les acides aminés bactériens présentent des valeurs d'excédent de marquage supérieures à celles observées dans la fraction cellulaire suggèrent qu'au moins une fraction de ces acides aminés bactériens est synthétisée *de novo* en cours d'infection.

### 3. Identification des acides aminés fournis par la cellule hôte après prémarquage isotopique

Lors de cette troisième expérience de marquage, les cellules ont été exposées durant 10 jours au glucose [ $U\text{-}^{13}\text{C}6$ ] avant l'infection. De cette manière, seuls les composants cellulaires ont initialement incorporé des isotopes et sont donc marqués. La présence de  $^{13}\text{C}$  au niveau des acides aminés bactériens ne peut dès lors provenir que des acides aminés ou d'une source carbonée marquée originaire du compartiment cellulaire (Fig. 19 expérience 3).

Indépendamment de la fraction considérée, les valeurs obtenues pour cette expérience avec prémarquage sont particulièrement faibles. En effet, la VEM de l'alanine n'excède pas respectivement 5% et 0,9% dans les fractions cellulaires et bactériennes. De si faibles taux ne permettent pas une analyse détaillée du marquage isotopique. Une telle réduction de valeurs d'excédent en  $^{13}\text{C}$  s'explique certainement par la longue période d'infection de 48h en présence de milieu classique non marqué qui semble bien plus importante que le « turnover » des protéines. Eylert *et al.* n'ont quant à eux pas eu ce problème étant donné que la durée des infections menées étaient de 6 heures seulement.

### 4. La synthèse *de novo* chez *Brucella*

L'origine d'un acide aminé peut être déterminée par comparaison des profils isotopiques obtenus entre les fractions cellulaire et bactérienne. Un profil isotopique d'un acide aminé est constitué des abondances relatives de chaque forme marquée pouvant exister pour cet acide aminé (le profil de l'alanine est illustré à la Fig. 20). Ces formes sont dénommées « fractions isotopiques » et leurs abondances relatives pour les différents acides aminés de chaque expérience sont disponibles en annexe (annexe 3).

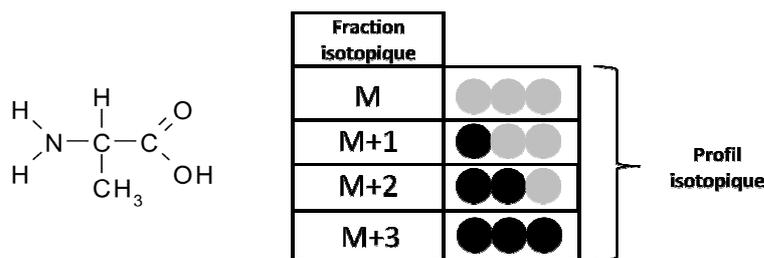


Figure 20. Profil et fractions isotopiques de l'alanine. La composition en carbone de chaque fraction isotopique de l'alanine (M, M+1, M+2 et M+3) est illustrée. Les cercles gris représentent un  $^{12}\text{C}$  et ceux en noirs représentent un  $^{13}\text{C}$ . L'ensemble des fractions constitue le profil isotopique de cet acide aminé.

Les différentes fractions isotopiques renseignent sur le marquage de leur précurseur biosynthétique (les précurseurs biosynthétiques des acides aminés sont repris à la figure 21) (Shaikh, Tang et al. 2008).

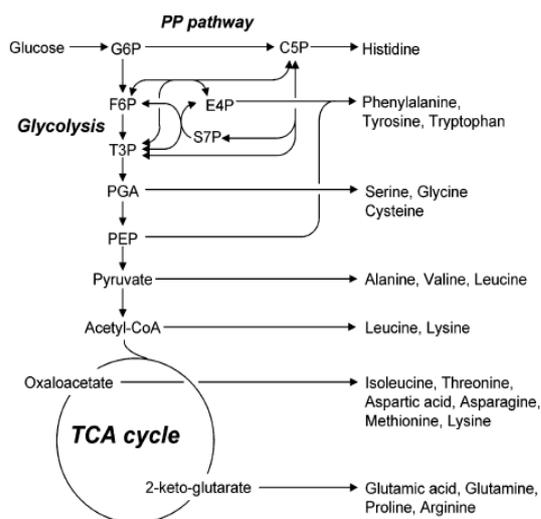


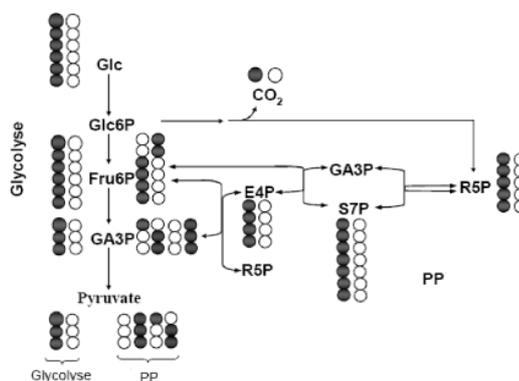
Figure 21. Les précurseurs biosynthétiques des acides aminés (adapté de Shaikh, Tang et al. 2008).

G6P: glucose-6-phosphate, F6P: fructose-6-phosphate, T3P: triose-3-phosphate, PGA: 3 phosphoglycérate, PEP: phosphoénolpyruvate, C5P: ribose-5-phosphate, E4P: érythrose-4-phosphate, S7P: sédoheptulose 7 phosphate.

Dans certains cas, une forme marquée d'un précurseur permet de déterminer son origine métabolique à partir du glucose [ $\text{U-}^{13}\text{C6}$ ] suite aux réarrangements du squelette carboné ayant lieu dans cette voie. A titre d'illustration, le précurseur de l'alanine est le pyruvate et les squelettes carbonés des deux molécules sont strictement identiques. D'après le marquage observé, il est possible de déterminer l'origine métabolique du pyruvate (Fig. 22). Si une majorité d'alanine a incorporé trois  $^{13}\text{C}$  (M+3, M étant la masse du fragment non marqué de l'alanine), le pyruvate ayant servi à sa synthèse est certainement issu du catabolisme classique par la voie EMP du glucose [ $\text{U-}^{13}\text{C6}$ ]. En effet, deux molécules de pyruvate peuvent être générées par glucose assimilé via cette voie. L'alanine ayant incorporé deux  $^{13}\text{C}$  témoigne, de la même manière, d'un historique de synthèse du pyruvate plus complexe impliquant la voie des pentoses phosphate.

Figure 22. Origine métabolique des fractions isotopiques M+3 et M+2 de l'alanine à partir de glucose [ $\text{U-}^{13}\text{C6}$ ] (adapté de la thèse de C. Nicolas). Les isotopes  $^{13}\text{C}$  sont représentés par des cercles noirs tandis que les  $^{12}\text{C}$  sont illustrés en blanc.

Glc: glucose, Glc6P: glucose-6-phosphate, Fru6P: fructose-6-phosphate, GA3P: glyceraldéhyde-3-phosphate, R5P: ribose-5-phosphate, S7P: sédoheptulose 7 phosphate, E4P: érythrose-4-phosphate, PP: voie des pentoses phosphate.



Ainsi, l'analyse de seulement certaines fractions d'un profil isotopique fournit des indications sur les voies métaboliques actives amenant à la synthèse des acides aminés. Les fractions considérées au cours de ce travail et l'origine métabolique de leurs précurseurs à partir du glucose [ $U\text{-}^{13}\text{C}6$ ] sont illustrées à la figure 23. Grâce aux indications fournies par ces fractions spécifiques, il est possible de déterminer si les acides aminés bactériens et cellulaires ont une origine biosynthétique commune ou non. En effet, si on reprend le cas de l'alanine, le rapport entre la proportion d'alanine ayant incorporé trois  $^{13}\text{C}$  (M+3) et la proportion d'alanine ayant incorporé deux  $^{13}\text{C}$  (M+2) est comparé entre fractions cellulaire et bactérienne. Ce rapport est dénommé indice d'origine des acides aminés ou IOAA (cfr section Matériel et Méthodes). Si cet indice est similaire entre les bactéries et les cellules, l'alanine a été biosynthétisée d'une manière similaire entre les deux fractions. Cette similarité suggère que l'alanine a été prélevée telle quelle par *Brucella* dans cellule. A l'inverse, deux IOAA différents témoignent de deux historiques de synthèse différents suggérant que l'alanine n'a pas été prélevée directement mais qu'elle a bien été partiellement synthétisée par la bactérie à partir d'une autre source carbonée. Les IOAA de chaque acide aminé ont donc été comparés entre bactéries et cellules afin d'identifier les acides aminés synthétisés *de novo* par *Brucella*.

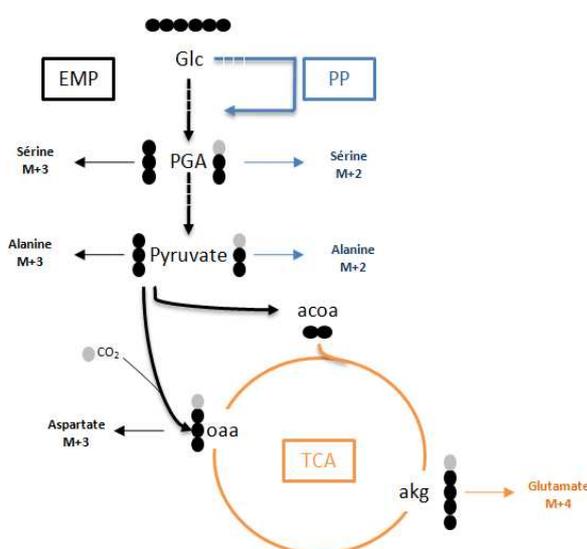


Figure 23. Fractions isotopiques considérées de la sérine, l'alanine, l'aspartate et du glutamate et origines métaboliques de leurs précurseurs biosynthétiques. Certaines fractions isotopiques spécifiques d'un acide aminé renseignent sur l'origine métabolique de son précurseur de synthèse. Ces fractions qui ont été considérées au cours de ce travail sont : la sérine M+3 et M+2, l'alanine M+3 et M+2, l'aspartate M+3 et M+2 et le glutamate M+4 et M+2. Les voies de synthèse générant ces différentes fractions à partir du glucose [ $U\text{-}^{13}\text{C}6$ ] sont illustrées à cette figure, exception faite des historiques complexes (aspartate et glutamate M+2).

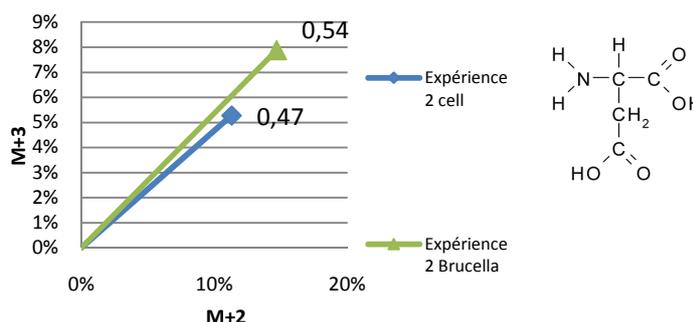
Les flèches en pointillés représentent plusieurs étapes d'une voie métabolique. Les cercles noirs représentent un  $^{13}\text{C}$  tandis que les cercles gris représentent un  $^{12}\text{C}$ . Glc: glucose, PGA: 3-phosphoglycérate, acoa: acétyl-coA, akg:  $\alpha$ -cétoglutarate, oaa: oxaloacétate, EMP: voie d'Embden-Meyerhof-Parnas, PP: voie des pentoses phosphate, TCA: cycle des acides tricarboxyliques.

#### A. L'aspartate et la sérine sont fournis par la cellule hôte

##### *Le profil de l'aspartate*

Les formes d'aspartate considérées sont les fractions isotopiques M+2 et M+3, soit celles ayant incorporé deux et trois isotopes. La présence de trois  $^{13}\text{C}$  indique que l'aspartate a été synthétisé sur base d'un oxaloacétate lui-même issu d'une carboxylation d'un pyruvate uniformément marqué. L'incorporation de deux  $^{13}\text{C}$  indique un historique plus complexe impliquant le TCA. Le rapport calculé pour l'IOAA est donc le suivant : pourcentage d'aspartate M+3/ pourcentage d'aspartate M+2 (Fig. 24).

**Figure 24. Comparaison des profils isotopiques de l'aspartate (m/z 418) entre fractions bactérienne et cellulaire.** Ce graphique illustre les indices d'origine des acides aminés (IOAA) de chaque fraction. En effet, les IOAA constituent le coefficient angulaire des droites. De plus, la valeur du ratio (M+3/M+2 dans ce cas-ci) est annotée. Il est ainsi possible de comparer les IOAA d'un acide aminé entre bactéries et cellules. Si les deux fractions présentent des IOAA similaires, les droites de deux fractions présentent un même coefficient angulaire et seront proches. La structure de l'acide aminé est représentée en parallèle du graphique.



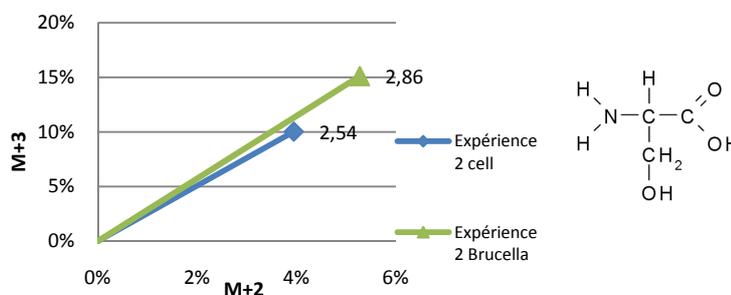
Les IOAA obtenus pour les deux fractions en cours d'infection sont similaires avec des rapports de 0,47 et 0,54 pour les cellules et bactéries respectivement. Le fait que ces valeurs soient semblables entre les deux fractions atteste d'une origine biosynthétique similaire de l'aspartate. Cet acide aminé serait donc vraisemblablement prélevé par la bactérie dans le compartiment cellulaire.

Etant donné que la proportion d'aspartate ayant incorporé deux  $^{13}\text{C}$  est près de deux fois plus importante que la proportion en ayant incorporé trois, il semblerait que la biosynthèse de cet acide aminé requiert essentiellement un cycle de Krebs actif.

#### Le profil de la sérine

Les fractions isotopiques considérées pour la sérine sont, comme pour l'alanine, les fractions M+3 et M+2. L'incorporation de trois  $^{13}\text{C}$  témoigne d'une synthèse basée sur un triose phosphate précurseur, le 3-phosphoglycérate, qui est uniformément marqué (voie EMP). Tandis que la sérine comprenant deux  $^{13}\text{C}$  a un historique biosynthétique plus complexe qui implique la voie des pentoses phosphate (PP) (Fig. 25).

**Figure 25. Comparaison des profils isotopiques de la sérine (m/z 390) entre fractions bactérienne et cellulaire.** Ce graphique illustre les indices d'origine des acides aminés (IOAA) de chaque fraction. En effet, les IOAA constituent le coefficient angulaire des droites. De plus, la valeur du ratio (M+3/M+2 dans ce cas-ci) est annotée. Il est ainsi possible de comparer les IOAA d'un acide aminé entre bactéries et cellules. Si les deux fractions présentent des IOAA similaires, les droites de deux fractions présentent un même coefficient angulaire et seront proches. La structure de l'acide aminé est représentée en parallèle du graphique.



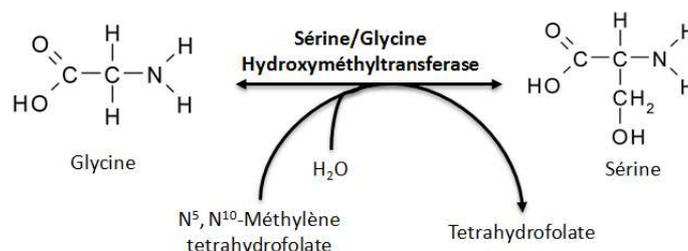
Au niveau de la fraction cellulaire, la sérine semble essentiellement avoir incorporé trois  $^{13}\text{C}$ , le pourcentage de sérine M+3 étant de deux à trois fois supérieur à celui de la sérine M+2. Cela indique que le 3-phosphoglycérate précurseur utilisé lors de la synthèse était uniformément marqué et proviendrait du catabolisme du glucose [ $U\text{-}^{13}\text{C}6$ ] via la voie EMP.

Le profil observé dans la fraction bactérienne est également caractérisé par une majorité de sérine M+3 qui est de deux à trois fois plus importante que la fraction M+2. Les indices d'origine des deux fractions sont donc très similaires. Ces résultats suggèrent *Brucella* prélève de la sérine telle quelle au sein de la cellule.

Il est à noter qu'il est également possible que la sérine soit synthétisée par la bactérie de manière identique à la cellule sur base d'une source carbonée prélevée tel qu'un triose-phosphate. Dans ce cas, les IOAA seraient similaires entre fractions cellulaire et bactérienne.

Il est intéressant de signaler que la fraction isotopique de sérine M+1 présente des valeurs similaires à la fraction de sérine M+3. Cette fraction non négligeable, qui est observable au niveau des cellules et des bactéries, implique qu'une partie de cet acide aminé soit également produit par des voies alternatives comme l'hydroxyméthylation de la glycine ayant incorporé elle-même un  $^{13}\text{C}$  (Fig. 26).

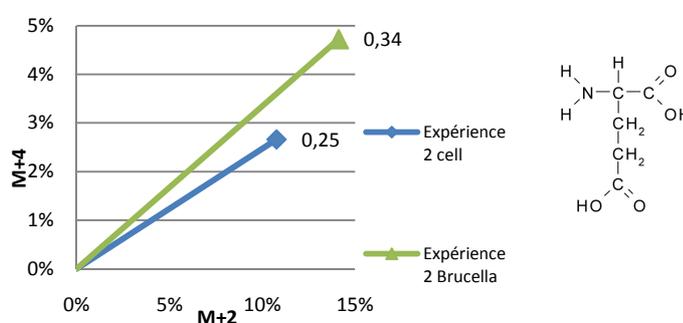
Figure 26. Synthèse de sérine par hydroxyméthylation de glycine.



### B. Le glutamate, de premiers indices sur une synthèse *de novo* par *Brucella*

Dans le cas du glutamate, ce sont les fractions M+4 et M+2 qui ont été prises en compte. L'incorporation de quatre  $^{13}\text{C}$  indique l'association d'un oxaloacétate contenant trois  $^{13}\text{C}$  et un acétyl-coA avec deux  $^{13}\text{C}$  dans un cycle de Krebs actif. Tandis que la forme avec deux  $^{13}\text{C}$  indique un historique plus complexe comprenant plusieurs cycles dans le TCA (Fig. 27).

Figure 27. Comparaison des profils isotopiques du glutamate (m/z 432) entre fractions bactérienne et cellulaire. Ce graphique illustre les indices d'origine des acides aminés (IOAA) de chaque fraction. En effet, les IOAA constituent le coefficient angulaire des droites. De plus, la valeur du ratio (M+4/M+2 dans ce cas-ci) est annotée. Il est ainsi possible de comparer les IOAA d'un acide aminé entre bactéries et cellules. Si les deux fractions présentent des IOAA similaires, les droites de deux fractions présentent un même coefficient angulaire et seront proches. La structure de l'acide aminé est représentée en parallèle du graphique.

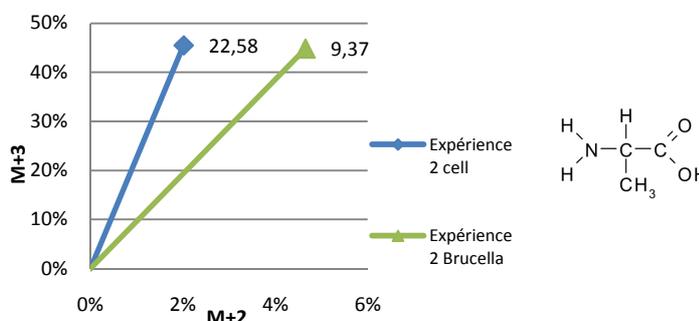


Les profils obtenus démontrent que 3 à 5 fois plus de glutamate a incorporé deux isotopes  $^{13}\text{C}$ . Cette observation est valable pour les deux fractions qui présentent donc des profils similaires. Toutefois, une proportion légèrement plus importante (d'un facteur 1,4) de glutamate a incorporé quatre isotopes dans la fraction bactérienne par rapport aux cellules. Cette légère différence indique qu'il existe une activité biosynthétique complémentaire mineure de *Brucella abortus* 2308.

### C. *Brucella abortus* 2308 synthétise une partie de son alanine

Comme il l'a déjà été mentionné, les fractions isotopiques considérées sont l'alanine M+3 et M+2 (Fig. 28).

**Figure 28. Comparaison des profils isotopiques de l'alanine (m/z 360) entre fractions bactérienne et cellulaire.** Ce graphique illustre les indices d'origine des acides aminés (IOAA) de chaque fraction. En effet, les IOAA constituent le coefficient angulaire des droites. De plus, la valeur du ratio (M+3/M+2 dans ce cas-ci) est annotée. Il est ainsi possible de comparer les IOAA d'un acide aminé entre bactéries et cellules. Si les deux fractions présentent des IOAA similaires, les droites de deux fractions présentent un même coefficient angulaire et seront proches. La structure de l'acide aminé est représentée en parallèle du graphique.



En ce qui concerne la fraction cellulaire, la fraction isotopique M+3 est majoritaire indiquant que le pyruvate précurseur est directement issu de la glycolyse du glucose marqué.

C'est également cette forme M+3 qui prédomine dans la fraction bactérienne. Au même titre que la sérine, l'alanine marquée de la sorte pourrait provenir du compartiment cellulaire étant donné que *Brucella* ne dispose pas d'une voie EMP complète. Elle pourrait cependant également être synthétisée par *Brucella* sur base d'un métabolite de la voie EMP, situé au niveau ou en aval du fructose 1-6 biphosphate, qui a été prélevé à la cellule hôte. Toutefois, les pourcentages de M+3 étant similaires entre fraction bactérienne et cellulaire, il est vraisemblable que *Brucella* ait prélevé cet acide aminé en tant que tel.

Bien que la forme M+3 soit majoritaire dans les deux fractions, les IOAA se distinguent nettement entre bactéries et cellules avec des valeurs respectives de 9 et 22,6. Il semble par conséquent y avoir une abondance significativement accrue de la proportion d'alanine ayant incorporé deux isotopes dans la fraction bactérienne. Il existe donc une synthèse *de novo* de l'alanine par la bactérie dont le précurseur est dérivé de la voie des pentoses phosphate.

## Chapitre 2: Caractérisation du lien PTS-métabolisme

La fonction du système PTS hybride décrit chez *Brucella abortus* 2308 reste méconnue. Toutefois, l'absence de perméase EIIC suggère que ce PTS soit essentiellement un système régulateur. Un modèle récemment proposé par M. Dozot *et al.* propose qu'une première fonction soit la régulation du métabolisme carboné et azoté, certaines protéines du PTS pouvant potentiellement interagir avec l' $\alpha$ -cétoglutarate et l' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase. Ce lien entre métabolisme et PTS peut être investigué au travers de la caractérisation du métabolisme de souches délétées pour les différents gènes du PTS (*ptsP* codant pour EI<sup>Ntr</sup>, *ptsO* codant pour NPr, *ptsN* codant pour EIIA<sup>Ntr</sup>, *ptsM* codant pour EIIA<sup>Man</sup> et *hprk* codant pour HprK).

A l'exception du délétant  $\Delta$ EIIA<sup>Man</sup>, ces mutants avaient déjà été construits chez *B. melitensis* 16M par M. Dozot. Toutefois, l'étude du métabolisme d'une souche nécessite généralement la possibilité de cultiver cette dernière dans un milieu défini. Des tests de croissance sur différents milieux définis de *B. melitensis* 16M et *B. abortus* 2308 ont révélé que cette dernière est capable de croître sur une gamme plus variée de substrats carbonés. C'est pourquoi, dans la perspective de caractérisations métaboliques, nous avons opté pour la construction de lignées délétantes chez *B. abortus* 2308.

Pour une meilleure compréhension, les délétants seront dénommés selon le nom de la protéine qui n'est plus produite et non par le gène qui est délété ( $\Delta$ EI<sup>Ntr</sup>,  $\Delta$ NPr,  $\Delta$ EIIA<sup>Man</sup>,  $\Delta$ EIIA<sup>Ntr</sup> et  $\Delta$ HprK).

### 1. Les effets transcriptionnels des délétions de *ptsM*, *ptsO* et *hprk*

Les gènes *ptsM*, *ptsO* et *hprk* codant respectivement pour EIIA<sup>Man</sup>, NPr et HprK sont localisés dans un locus génétique qui présente des propriétés typiques d'un opéron. En effet, ces gènes sont liés transcriptionnellement avec le gène *sahH* (codant pour une S-adénosylhomocystéine hydrolase impliquée dans le métabolisme de la méthionine) et les gènes *bvrR* et *bvrS* (codant pour un système régulateur à deux composants) (Fig. 29).



Figure 29. Structure du locus génétique comprenant les gènes *ptsO*, *ptsM* et *hprk*. Il a été démontré que les gènes situés à ce locus, à l'exception de *pckA*, sont transcriptionnellement liés deux à deux. Les liens mis en évidence sont illustrés par un trait. Il semble donc que ce locus présente des propriétés similaires à un opéron (M. Dozot).

Etant donné ce lien transcriptionnel, la délétion de l'un des trois gènes du PTS localisés à ce locus pourrait avoir des effets sur l'expression des gènes situés en aval. C'est pourquoi les délétions ont été réalisées par remplacement allélique avec la cassette non-polaire *apha4* (Dozot, Boigegrain et al. 2006). Les effets transcriptionnels des délétions de *ptsM*, *ptsO* et *hprk* ont néanmoins été caractérisés par RT PCR (Fig. 30).

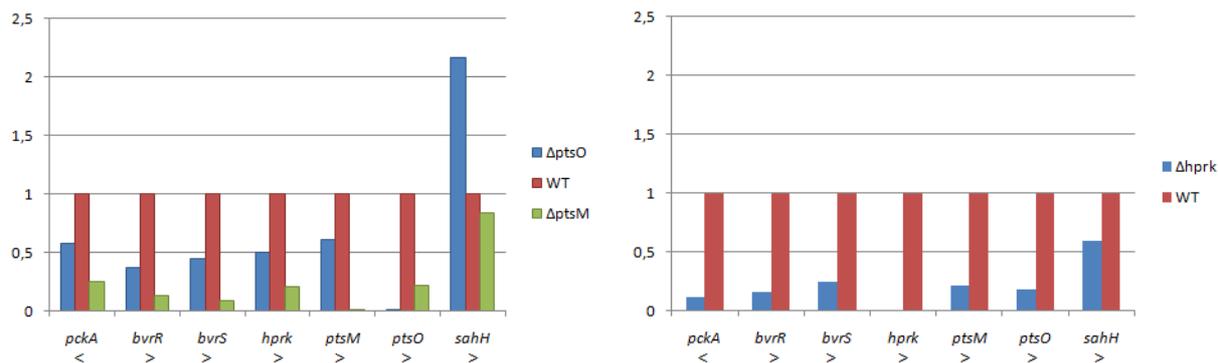


Figure 30. Caractérisation des effets de la délétion de *ptsO*, *ptsM* et *hprK* sur l'expression des gènes situés à proximité par RT PCR. Les RT PCR ont été réalisées sur des cultures en phase stationnaire de croissance de *B. abortus* 2308 sauvage (WT), de *B. abortus* 2308  $\Delta$ NPr ( $\Delta$ *ptsO*),  $\Delta$ EIIA<sup>Man</sup> ( $\Delta$ *ptsM*) et  $\Delta$  HprK ( $\Delta$ *hprK*). Les résultats obtenus pour les souches délétées sont normalisés par rapport à la souche sauvage. L'ordre des gènes est conservé et leur orientation est illustrée par les symboles < ou >. Ces gènes sont: *pckA* (codant pour une phosphoénolpyruvate carboxykinase), *bvrR* et *bvrS* (codant pour un système régulateur à deux composants), *hprK* (HprK), *ptsM* (EIIA<sup>Man</sup>) *ptsO* (NPr) et *sahH* (codant pour une S-adenosylhomocystéine hydrolase).

Ces résultats de RT PCR permettent de confirmer que la délétion des différents gènes du PTS a bien eu lieu. En effet, aucun transcrite des gènes délétés n'a été détecté dans les souches mutantes.

D'autre part, il apparaît que la délétion de *ptsO* (NPr) soit associée à une expression réduite de moitié des gènes *bvrR*, *bvrS*, *hprK*, *ptsM* et *pckA*. A l'inverse, l'expression du gène codant pour la S-adenosylhomocystéine hydrolase est doublée. La délétion de *ptsM* a un effet de réduction de l'expression des gènes *pckA*, *bvrR*, *bvrS*, *hprK*, *ptsM* et *pckA* plus marqué que la délétion de *ptsO* avec notamment une réduction d'un facteur dix de l'expression de *bvrS*. L'expression de *sahH* chez ce second délétant est relativement similaire à celle de la souche sauvage (WT). En ce qui concerne le délétant *hprK*, l'expression de l'ensemble des gènes présents à ce locus se retrouve fortement réduite.

La délétion de gènes du PTS génère donc une modification important de l'expression de gènes situés à proximité, qu'ils soient transcriptionnellement liés ou non. Cette modification pourrait ainsi constituer un nouveau phénotype. Toutefois, il est possible que dans une certaine mesure, les effets transcriptionnels observés au niveau des gènes situés en aval de la délétion puissent également être partiellement liés à des effets polaires de la délétion.

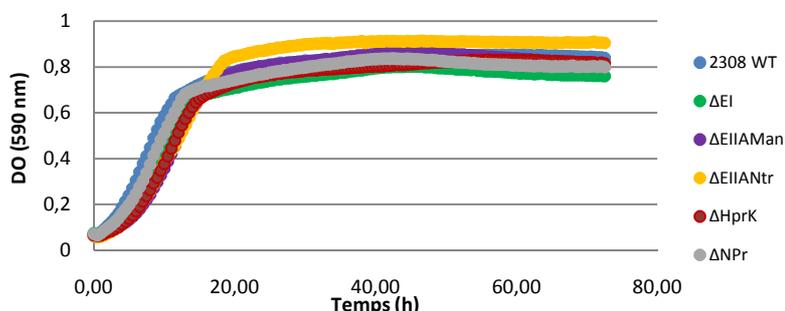
## 2. Les profils de croissance des délétants PTS : mise en évidence d'un lien entre PTS et métabolisme de l'érythritol et du glutamate

Afin d'initier la caractérisation du lien métabolisme-PTS, la croissance des différentes souches délétantes a été déterminée à l'aide d'un Bioscreen sur du milieu riche 2YT et des milieux définis dont la base minérale a été complétée par différentes sources carbonées. Les sources de carbone testées sont :

- le fumarate à une concentration de 20mM,
- le malate à une concentration de 10mM,
- l' $\alpha$ -cétoglutarate à une concentration de 20mM,
- le glutamate à une concentration de 2 g/l (16,4 mM),
- l'érythritol à une concentration de 2 g/l (13,6 mM).

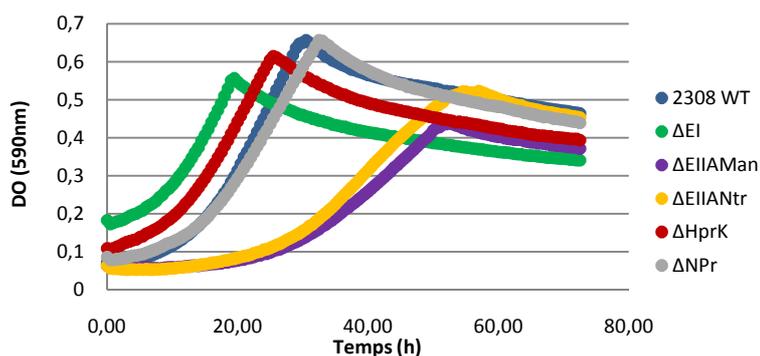
Sur milieu riche 2YT (Fig. 31), les délétants présentent une croissance similaire à la souche sauvage. Sur les milieux définis avec fumarate, malate et  $\alpha$ -cétoglutarate en tant qu'unique source de carbone, ni *B. abortus* 2308 WT ni aucun des délétants ne poussent (résultats non montrés).

Figure 31. Profils de croissance de *B. abortus* 2308 WT,  $\Delta EI^{Ntr}$ ,  $\Delta NPr$ ,  $\Delta EIIA^{Man}$ ,  $\Delta EIIA^{Ntr}$  et  $\Delta Hprk$  sur milieu 2YT. Chaque expérience a été réalisée en triplicat. Les valeurs représentées sont les moyennes des DO des triplicats.



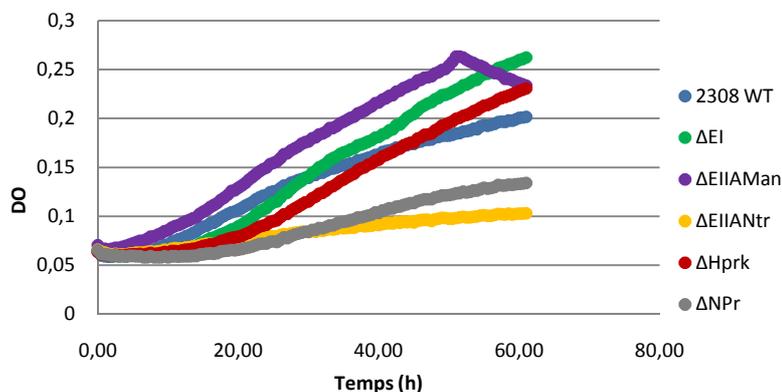
Lorsque de l'érythritol est fourni en tant que source de carbone (Fig. 32), les six souches présentent une croissance soutenue. Cependant, alors que *B. abortus* 2308  $\Delta EI^{Ntr}$ ,  $\Delta NPr$  et  $\Delta Hprk$  ont des profils similaires à *B. abortus* 2308 WT, les deux délétants pour une enzyme EIIA présentent une phase de latence plus importante. En effet, ces deux derniers délétants atteignent une DO de 0,2 après 30 à 35 heures alors qu'à ce même temps, les autres souches sont en phase stationnaire. Ce retard de croissance suggère l'existence d'un lien entre ces deux protéines du PTS et l'assimilation de l'érythritol.

Figure 32. Profils de croissance de *B. abortus* 2308 WT,  $\Delta EI^{Ntr}$ ,  $\Delta NPr$ ,  $\Delta EIIA^{Man}$ ,  $\Delta EIIA^{Ntr}$  et  $\Delta Hprk$  sur milieu minimum contenant 2g/l d'érythritol. Chaque expérience a été réalisée en triplicat. Les valeurs représentées sont les moyennes des DO des triplicats.



Le glutamate est situé au carrefour du métabolisme de l'azote et du carbone or, le PTS est suspecté de jouer un rôle dans la régulation de ce métabolisme, c'est pourquoi nous avons testé cet acide aminé en tant qu'unique source de carbone (Fig. 33). Les résultats obtenus indiquent que *B. abortus* 2308  $\Delta EI^{Ntr}$ ,  $\Delta EIIA^{Man}$  et  $\Delta Hprk$  sont caractérisés par une croissance similaire à la souche sauvage tandis que les délétants de  $EIIA^{Ntr}$  et  $NPr$  présentent des taux de croissance réduits. Ces résultats suggèrent que ces deux protéines soient liées à l'assimilation du glutamate.

Figure 33. Profils de croissance de *B. abortus* 2308 WT,  $\Delta EI^{Ntr}$ ,  $\Delta NPr$ ,  $\Delta EIIA^{Man}$ ,  $\Delta EIIA^{Ntr}$  et  $\Delta Hprk$  sur milieu minimum contenant 2g/l de glutamate. Chaque expérience a été réalisée en triplicat. Les valeurs représentées sont les moyennes des DO des triplicats.



### 3. Le milieu influence la morphologie de *B. abortus* 2308 $\Delta EI^{Ntr}$

Dans un travail antérieur, les observations réalisées sur les souches délétées des différents gènes du PTS chez *B. melitensis* 16M avaient révélé que la souche  $\Delta EI^{Ntr}$  formait des structures en chaînettes (Dozot M., thèse de doctorat 2007). Nous avons par conséquent entrepris d'observer par microscopie la morphologie des différentes souches délétantes chez *B. abortus* 2308 (en phase exponentielle de croissance).

Au cours de nos observations, les délétants  $\Delta NPr$ ,  $\Delta EIIA^{Man}$  et  $\Delta HprK$  n'ont pas révélé de morphologie particulière tandis que *B. abortus* 2308  $\Delta EIIA^{Ntr}$  présente de très rares altérations morphologiques. En ce qui concerne le délétant  $\Delta EI^{Ntr}$ , la morphologie observée différait selon le milieu de culture utilisé. Nous avons donc émis l'hypothèse que le milieu de culture puisse influencer la morphologie de la souche  $\Delta EI^{Ntr}$ .

Afin de tester notre hypothèse, *B. abortus* 2308 WT et  $\Delta EI^{Ntr}$  ont été cultivés dans différents milieux, à savoir les milieux riches 2YT et TSB ainsi que le milieu défini contenant 2g/l d'érythritol, avant observation au microscope (Fig. 34 et 35).

Sur milieu 2YT, la souche délétée ne présente pas de phénotype particulier à l'inverse de ce qui avait pu être observé sur le même délétant chez *B. melitensis* 16M. Le milieu 2YT ne semble par conséquent pas influencer la morphologie du délétant  $\Delta EI^{Ntr}$ .

Sur le milieu riche TSB, la souche délétée présente près de sept fois plus de bactéries avec une morphologie inhabituelle que la souche sauvage. Les morphologies atypiques observées sont de type « tripolaire » (Fig. 34A) et des cellules à l'aspect « gonflé » (Fig. 34B). Le TSB semble donc avoir un effet sur la morphologie bactérienne. Cet effet est toutefois spécifique au délétant, la souche sauvage ne présentant pas de phénotype particulier.

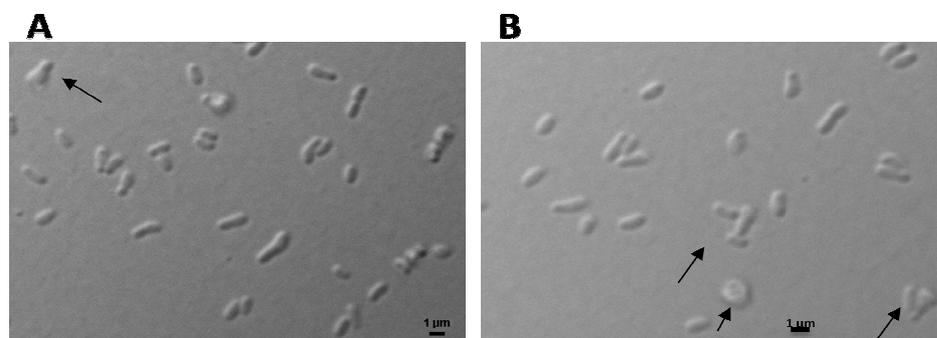


Figure 34. Observation microscopique de *B. abortus* 2308  $\Delta ptsP$  après une croissance sur TSB. Différentes morphologies atypiques peuvent être observées : les morphologies de types « tripolaire » où la bactérie acquière une forme triangulaire (A), les bactéries peuvent également présenter un aspect « gonflé » avec parfois de plus petites bactéries à leur pôle (B).

Ce lien composition environnementale-morphologie de *B. abortus* 2308  $\Delta EI^{Ntr}$  est également mis en évidence lorsque cette souche est cultivée sur milieu défini avec érythritol. Dans ces conditions, près de 16% (135/813) des *Brucella*  $\Delta EI^{Ntr}$  présentent des morphologies atypiques (Fig. 35). Cette fréquence est 4 fois moins importante chez la souche sauvage. De plus, 10% des mutants forment de courtes chaînes composées d'un minimum de trois bactéries alors que ce taux est nul chez la souche sauvage.

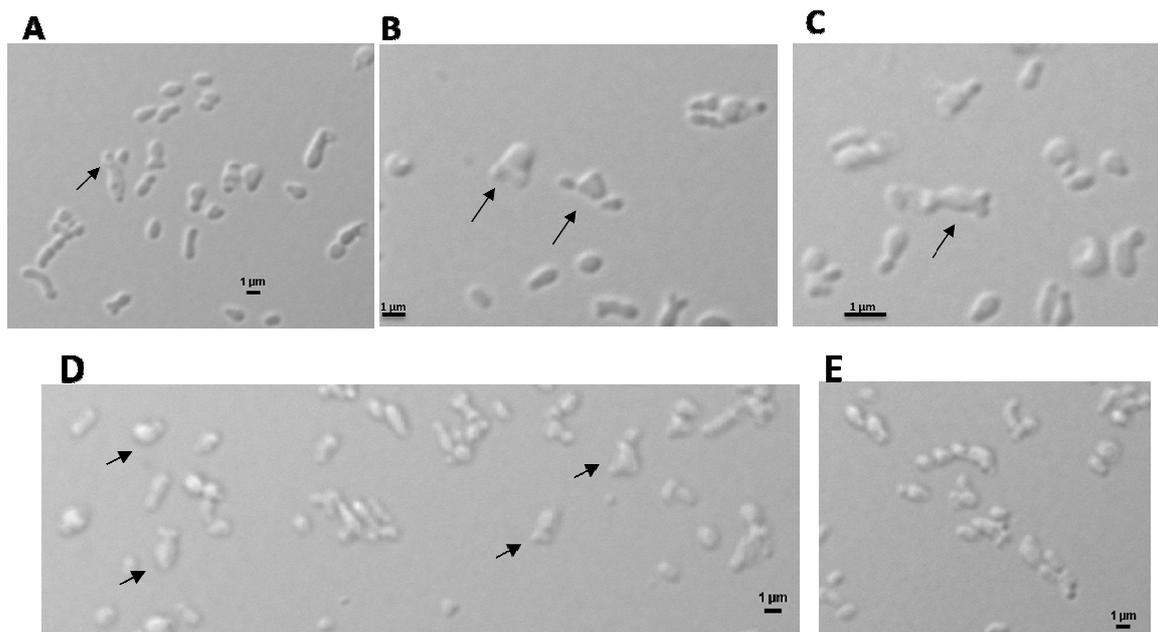


Figure 35. Observation microscopique de *B. abortus* 2308  $\Delta ptsP$  après une croissance sur milieu minimum avec érythritol (2g/l). De nombreuses aberrations morphologiques peuvent être observées après croissance sur ce milieu avec notamment des aspects en forme de « Y » (A), des « tripolaires » et cellules à l'aspect « gonflé » (B, C, D). De plus, le délétant constitue relativement fréquemment des structures en « chaînette » (E).

Il est intéressant de noter d'autre part qu'une proportion non négligeable de *Brucella* WT présente une forme allongée inhabituelle lorsqu'elles croissent sur érythritol (Fig.36).

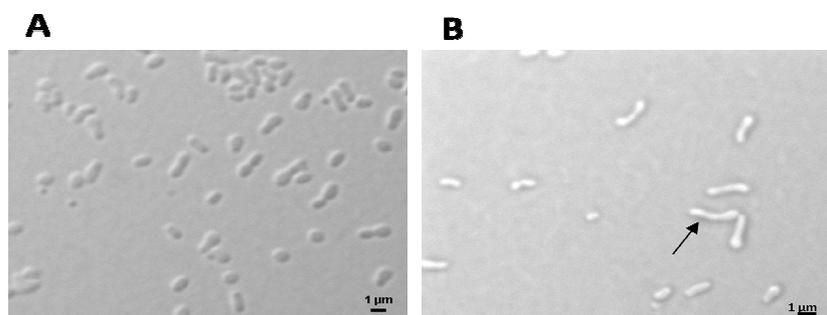


Figure 36. Observation microscopique de *B. abortus* 2308 WT après une croissance sur 2YT et sur milieu minimum avec érythritol (2g/l). La souche sauvage présente une morphologie normale après avoir été cultivée dans du 2YT (A) tandis que des formes « allongées » peuvent être observées lors d'une croissance sur érythritol (B).

Ces résultats suggèrent que, suite à la délétion de *ptsN* ( $EI^{Ntr}$ ), la composition de l'environnement influence dans une certaine mesure la morphologie bactérienne. Cet effet peut être observé à deux niveaux : au niveau d'une bactérie isolée mais aussi au niveau d'un groupe de bactéries qui peuvent générer des « hyperstructures » de type chaînettes.

---

# Discussion et perspectives

---

---

# Discussion et perspectives

---

Le développement d'une infection par une bactérie pathogène nécessite une adaptation de la physiologie du pathogène vis-à-vis de son hôte. Cette adaptation implique une modification du métabolisme de la bactérie qui semble essentielle à la virulence. Suite à cette adaptation, il semblerait que le métabolisme en conditions d'infection soit différent de ce qui a pu être décrit jusqu'à présent par des études *in vitro*. En conséquence, nos connaissances sur ce fondement de la pathogenèse bactérienne étaient minimales jusqu'à récemment. Avec le développement de nouvelles technologies comme le marquage par isotopes stables, nous disposons depuis peu des outils nécessaires pour investiguer la physiologie de pathogènes *in vivo*, ce qui a d'ailleurs fait l'objet d'études récentes. Ces travaux ont permis une meilleure compréhension de la physiologie de certains pathogènes tel que *L. monocytogenes*, en cours d'infection, ce à quoi nous avons également souhaité contribuer. Nous nous sommes en effet fixé comme objectifs d'identifier les sources carbonées prélevées par le pathogène intracellulaire *B. abortus* 2308 en cours d'infection, ainsi que de caractériser le lien entre métabolisme et le système PTS chez cette même bactérie.

## I. Le protocole mis au point est fonctionnel

Le protocole mis au point et utilisé au cours de ce travail afin d'analyser le marquage isotopique des acides aminés s'est révélé fonctionnel et fiable. En effet, il a d'une part permis d'obtenir de premières indications sur le métabolisme de l'hôte et de la bactérie. D'autre part, ce protocole semble fiable étant donné les faibles valeurs d'excédent de marquage observées au niveau des acides aminés essentiels cellulaires et ce, toute expérience confondue. Ce résultat attendu *à priori* démontre que la séparation des fractions cellulaire et bactériennes est efficace. D'ailleurs, la comparaison des VEM entre bactéries et cellules révèle que la contamination de la fraction cellulaire par les acides aminés bactériens n'excède pas 10%. Ce taux relativement faible est similaire à celui observé par Eylert *et al.* (Eylert, Schar et al. 2008).

## II. Premières indications sur le métabolisme de la cellule hôte et de *B. abortus* 2308

### 1. Le métabolisme des cellules RAW

#### A. Une voie glycolytique classique et un TCA actifs en conditions non infectantes

Lorsque les cellules RAW sont cultivées durant 6 heures dans du milieu DMEM contenant du glucose uniformément marqué [U-<sup>13</sup>C6], elles synthétisent de l'alanine, de la sérine, de la glycine, de l'aspartate et du glutamate *de novo*.

L'analyse des indices d'origine de ces acides aminés a révélé que l'alanine et la sérine sont majoritairement présentes sous forme triplement marquée (M+3). Les précurseurs de ces deux acides aminés, le pyruvate et le 3-phosphoglycérate, devaient dès lors être uniformément marqués. Par conséquent, les 2 précurseurs ont été générés suite au catabolisme du glucose [U-<sup>13</sup>C6] via la voie EMP qui s'avère ainsi être active chez les cellules RAW en conditions de culture *in vitro*.

Au niveau de l'aspartate et du glutamate, tout deux se présentent essentiellement sous forme M+2. L'acquisition de deux isotopes  $^{13}\text{C}$  au niveau de ces acides aminés témoigne d'un historique biosynthétique complexe qui implique un TCA actif.

Il semble donc que la voie majeure du métabolisme du glucose dans les cellules RAW non infectées soit la combinaison classique de la glycolyse (EMP) et du TCA. Par ailleurs, le fait que les résultats obtenus pour les différents acides aminés soient cohérents entre eux démontre la fiabilité du procédé utilisé.

Ces observations définissent le métabolisme en conditions classiques de culture des cellules RAW et constitue notre situation « contrôle ». Ce contrôle devait permettre de réaliser des comparaisons avec le métabolisme des cellules en conditions infectantes. Toutefois, les traitements réalisés entre les deux conditions sont différents. En effet, les temps d'incubation avec le glucose [ $\text{U-}^{13}\text{C6}$ ] sont différents (6h et 48h) ainsi que les traitements et lavages. Par conséquent, il sera nécessaire d'établir un nouveau contrôle plus adapté, subissant les mêmes traitements qu'en conditions d'infection, avant de pouvoir réaliser toute comparaison.

#### B. EMP et TCA également en cours d'infection

Les valeurs d'excédent obtenues lors de l'expérience de marquage en cours d'infection (expérience 2) ont révélé que la cellule synthétisait essentiellement de l'alanine, mais aussi de la sérine, la glycine et l'aspartate dans une moindre mesure.

L'analyse des indices d'origine de ces acides aminés démontre que l'alanine et la sérine sont de nouveau très majoritairement issues d'un pyruvate et d'un 3-phosphoglycérate uniformément marqués. Ces observations démontrent que le glucose [ $\text{U-}^{13}\text{C6}$ ] est catabolisé via la voie EMP par la cellule infectée. Au niveau de l'aspartate et du glutamate, ces deux acides aminés ont principalement incorporé deux isotopes ce qui indique un cycle de Krebs actif. Il semble donc que le catabolisme du glucose implique de nouveau majoritairement les voies classiques de l'EMP et du TCA chez la cellule infectée.

A l'avenir, il sera intéressant de comparer le métabolisme des cellules en conditions d'infection avec la situation contrôle. Cette comparaison permettra de déterminer si le pathogène affecte le métabolisme de l'hôte et si oui, de quelle manière. Pour ce faire, une situation contrôle adéquate sera requise. Il sera également nécessaire d'isoler les rares cellules infectées. En effet, la majorité des cellules ne sont pas infectées et présentent donc un métabolisme « normal ». Ainsi, si l'on souhaite mettre en évidence une modification métabolique suite à l'infection, il sera nécessaire de ne considérer strictement que le métabolisme des cellules infectées qui devront dès lors être préalablement isolées.

Pour ce faire, il est possible de recourir à une souche de *B. abortus* 2308 exprimant un fluorochrome tel que mCherry et à la cytométrie de flux. De cette manière, la présence de bactéries fluorescentes au sein cellules peut être détectée et permettre la discrimination entre cellules infectées ou non. Les cellules peuvent alors être séparées sur base de ce critère à l'aide d'un FACS (Fluorescent Activated Cell Sorter).

En parallèle de cette voie EMP activé au niveau de la cellule, il a été récemment proposé que *Brucella* puisse exploiter la glycolyse (EMP) de l'hôte à son avantage. Il a effectivement été démontré qu'une glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) eucaryote se localise au niveau du BCV, le compartiment dans lequel se trouve la bactérie en cours d'infection. L'inhibition de cette enzyme par de petits ARN interférants inhibe fortement la répllication de *Brucella* en cours d'infection. De la même manière, les auteurs

ont mis en évidence que l'inhibition de l'énolase altère également la réplication du pathogène au sein de la cellule. Ces résultats suggèrent que *Brucella* puisse exploiter la glycolyse de l'hôte afin d'obtenir par exemple de l'énergie. Cette hypothèse reste néanmoins à vérifier.

Toutefois, la fonction de la GAPDH ne se résume pas au métabolisme. En effet, elle est également impliquée dans le transport de vésicules de sécrétion. La réplication réduite observée suite à l'inhibition de la GAPDH pourrait donc soit être liée métabolisme, soit à cette fonction dans le trafic intracellulaire ou encore aux deux.

### C. Le métabolisme de la bactérie

Dans la fraction bactérienne, l'alanine a été marquée de manière importante avec une valeur d'excédent de marquage de l'ordre de 43%. La sérine, la tyrosine, l'aspartate, le glutamate, la valine et la phénylalanine présentent quant à eux, des valeurs comprises entre 18 et 10% tandis que la glycine et la thréonine sont caractérisées par des taux légèrement plus faibles de 8 et 7% respectivement.

L'analyse des indices d'origine de l'aspartate et de la sérine a révélé qu'ils sont similaires entre fractions cellulaire et bactérienne (Fig. 24 et 25). Ces résultats attestent d'une origine biosynthétique commune. Il est donc vraisemblable que ces deux acides aminés aient été prélevés en tant que tels par *Brucella* au sein de la cellule.

Cependant, une seconde possibilité serait que ces deux acides aminés soient synthétisés par la bactérie sur base des mêmes sources carbonées et par les mêmes voies que celles utilisées par la cellule. Cette possibilité semble d'avantage applicable à la sérine. En effet, dans le cas de cette dernière, si *Brucella* utilise un triose phosphate prélevé à la cellule hôte afin de synthétiser le précurseur de cet acide aminé, les IOAA seront similaires entre bactéries et cellules. Il est également envisageable qu'une partie de la sérine et de l'aspartate bactérien soit prélevée à la cellule hôte et qu'en parallèle, *Brucella* synthétise également ces deux acides aminés de manière similaire à la cellule.

L'hypothèse d'une synthèse bactérienne d'aspartate, et de la sérine est supportée par le fait que ces deux acides aminés présentent des valeurs d'excédent de marquage plus élevées au niveau de la fraction bactérienne (Fig. 19). Cette différence entre bactéries et cellules suggère qu'en parallèle d'un prélèvement potentiel, une partie de ces acides aminés soient synthétisés par *Brucella* sur base de sources de carbone marquées qui ont été prélevées.

Par ailleurs, une activité biosynthétique spécifiquement bactérienne a été mise en évidence. La valine, la phénylalanine, la tyrosine et la thréonine qui, étant marqués et essentiels, ne peuvent effectivement avoir été synthétisés *de novo* que par *Brucella*.

Au niveau des acides aminés non-essentiels, le glutamate présente, de manière similaire à l'aspartate et à la sérine, une VEM plus élevée au niveau de la fraction bactérienne par rapport à la fraction cellulaire. Cette différence suggère de nouveau l'existence d'une activité biosynthétique bactérienne. L'IOAA du glutamate dans la fraction bactérienne est relativement proche de celui observé au niveau des cellules. Toutefois, une proportion plus importante de cet acide aminé a incorporé quatre  $^{13}\text{C}$  chez *Brucella*. Cette dernière prélève donc une partie de son glutamate mais en synthétise également de manière minoritaire.

Le précurseur ayant servi à la synthèse du glutamate M+4 proviendrait d'un TCA actif. Un oxaloacétate M+3 en association avec un acétyl Coa uniformément marqué générerait effectivement un  $\alpha$ -cétoglutarate à 4  $^{13}\text{C}$  (Fig. 37). L'origine de cet oxaloacétate M+3 et de l'acétyl coA M+2 est commune: le pyruvate uniformément marqué. Cette

synthèse spécifiquement bactérienne du glutamate implique que *Brucella* prélèverait à la cellule une source carbonée dérivée du catabolisme du glucose par la voie EMP. De plus, de par l'absence de phosphofructokinase chez *Brucella*, cette source carbonée doit être au niveau ou en aval du fructose-1,6-biphosphate dans la voie EMP.

L'analyse des fractions isotopiques de l'alanine révèle qu'une proportion majeure d'alanine est, de manière similaire aux cellules, triplement marquée. Cette alanine M+3 peut, comme la sérine, soit avoir été prélevée, soit avoir été synthétisée par la bactérie de manière similaire à la cellule. Toutefois, une fraction relativement importante de l'alanine bactérienne a spécifiquement incorporé deux isotopes. Cette fraction est donc synthétisée par *Brucella* à partir d'une source de carbone ayant été métabolisée par la voie des pentoses phosphate. *Brucella* prélèverait ainsi une partie de son alanine mais en synthétise également en parallèle.

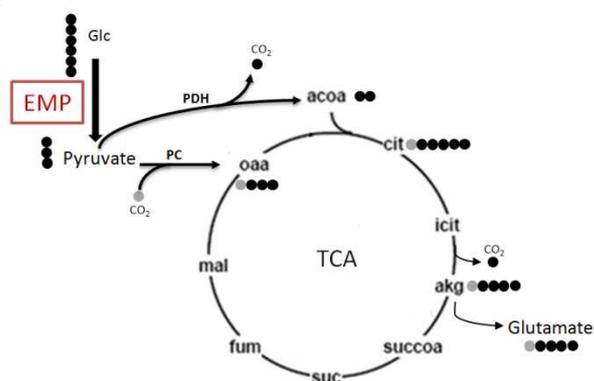


Figure 37. Origine métabolique des précurseurs de synthèse du glutamate M+4. Les isotopes  $^{13}\text{C}$  sont représentés par des cercles noirs tandis que les  $^{12}\text{C}$  sont illustrés en gris. Glc: glucose, EMP: Embden-Meyerhof-Parnas, PDH: pyruvate déshydrogénase, PC: pyruvate carboxylase, acoa: acétyl-coA, cit: citrate, icit: isocitrate, akg:  $\alpha$ -cétoglutarate, succoa: succinyl-coA, suc: succinate, mal: malate, oaa: oxaloacétate.

Si on émet l'hypothèse que la synthèse de l'alanine et du glutamate spécifique de *Brucella* repose sur une unique source de carbone prélevée à la cellule hôte, le précurseur doit être commun entre la voie des pentoses phosphate et à la voie EMP, soit le glucose-6-phosphate. Toutefois, *Brucella* ne dispose pas de la phosphofructokinase et ne peut donc pas générer d'alanine M+3 sur base de glucose-6-phosphate. Il semble donc que *Brucella* prélève dans la cellule un minimum de deux sources carbonées distinctes.

Ces sources carbonées prélevées en cours d'infection restent encore à déterminer. Pour ce faire, des souches mutées au niveau de transporteurs ou d'enzymes clés du métabolisme de la bactérie seront prochainement construites. Si une mutation affecte la voie d'assimilation de la source carbonée fournie par la cellule hôte, le marquage des acides aminés de la souche mutée sera en conséquence plus faible (Eylert, Schar et al. 2008). Il sera ainsi possible de déterminer quelles sources sont prélevées et utilisées afin de synthétiser des acides aminés.

Les gènes ciblés n'ont pas encore été déterminés. Cependant, il sera particulièrement intéressant de considérer les trioses phosphates étant donné que *Brucella* présente un taux de croissance important sur érythritol dont le catabolisme génère du dihydroxyacétone phosphate. Nous tiendrons également compte de la composition potentielle de la niche de réplique de la bactérie. Le réticulum endoplasmique comprend notamment certains sucres comme le mannose, le fucose et le galactose qui sont nécessaires pour la N-glycosylation des protéines qui y a lieu (D. L. Nelson 2005).

Le catabolisme du fucose est particulièrement intéressant car il génère des trioses phosphate, au même titre que l'érythritol. De plus, une souche de *B. melitensis 16M* mutée au niveau du gène codant pour la L-fucose-phosphate aldolase, une enzyme impliquée dans le catabolisme du fucose, présente un phénotype d'atténuation (Wu, Pei et al. 2006). Il est donc concevable que le fucose puisse constituer une source de carbone prélevée par *Brucella* en cours d'infection.

Au même titre que l'identification des sources carbonées, une perspective prioritaire sera de répéter chaque expérience de marquage isotopique et d'analyse GC/MS de sorte à obtenir des triplicats biologiques et de confirmer les résultats obtenus. De plus, il sera nécessaire de mettre au point une nouvelle procédure de prémarquage permettant d'obtenir des valeurs d'excédent suffisantes pour être interprétées.

### III. Caractérisation du lien entre PTS hybride et métabolisme du carbone et de l'azote chez *Brucella*

Le système PTS (phosphoénolpyruvate : carbohydate phosphotransferase) est un régulateur global du métabolisme et du transport des sources carbonées chez les bactéries. La structure de ce système chez *Brucella* est hybride car il est constitué de protéines homologues de différentes familles : EI<sup>Ntr</sup>, NPr, EIIA<sup>Ntr</sup>, EIIA<sup>Man</sup> et HprK. L'absence de perméase EIIC dans ce système a suggéré que ce PTS puisse avoir des fonctions essentiellement régulatrices. De manière similaire à ce qui a été réalisé chez *Sinorhizobium meliloti*, des souches délétantes ont été construites pour chaque gène du PTS ( $\Delta ptsP$ ,  $\Delta ptsO$  NPr,  $\Delta ptsN$ ,  $\Delta ptsM$  et  $\Delta hprk$ ) afin de déterminer l'implication du PTS dans le métabolisme carboné et azoté chez *Brucella* (Pinedo, Bringham et al. 2008; Pinedo and Gage 2009). De nouveau, pour une meilleure compréhension, les délétants seront dénommés selon la protéine qui n'est plus produite et non pas par le gène délété.

#### 1. Les effets transcriptionnels de la délétion de *ptsO*, *ptsM* et d'*hprk*

Avant de caractériser les différents mutants, l'impact des délétions des gènes *ptsO*, *ptsM* et *hprk* sur l'expression des gènes situés au même locus génétique a été caractérisée. Les RT PCR réalisées démontrent que les délétions ont un effet important sur l'expression des gènes qu'ils soient transcriptionnellement liés ou non. Ces modifications d'expression semblent constituer un nouveau phénotype.

L'existence d'une régulation transcriptionnelle de ces gènes par le PTS est supportée par le fait que ce système, chez les bactéries Gram positives, a été décrit comme régulant l'expression de ses propres gènes via les domaines PRD (PTS regulation domain) (Kruger, Gertz et al. 1996; Deutscher, Francke et al. 2006; Poncet 2009). Toutefois, aucun homologue de domaine PRD n'a pu être identifié chez *Brucella* par analyse d'homologie de séquence BLAST. Ces résultats suggèrent l'existence d'un autre mécanisme de régulation transcriptionnel qui reste à déterminer.

Ces résultats de RT PCR devront être confirmés, les RT PCR n'ayant été réalisées qu'à une seule reprise. Il sera de plus nécessaire de déterminer que les effets transcriptionnels observés constituent bien un phénotype en complétant les souches délétées. Enfin, en dépit de l'utilisation de la cassette non-polaire *aphA4*, il sera nécessaire de vérifier que les effets observés sur l'expression des gènes situés en aval de la délétion ne sont pas liés à des effets polaires.

#### 2. Le PTS et le métabolisme du carbone

##### A. Les protéines EIIA et l'assimilation de l'érythritol

Au cours d'un test de croissance avec de l'érythritol en tant que source unique de carbone, les souches délétées pour EIIA<sup>Ntr</sup> et EIIA<sup>Man</sup> ont présenté un retard de croissance important. Ce retard suggère que les deux protéines EIIA soient liées au transport ou au

catabolisme de cette source de carbone préférentielle. Cette observation suggère que, comme pour la plupart des bactéries Gram négatives, les protéines EIIA pourraient jouer un rôle central dans les mécanismes de régulation par le système PTS (Stulke and Hillen 1999; Deutscher, Francke et al. 2006).

D'autre part, il existe une corrélation phénotypique de la délétion de la protéine EIIA<sup>Man</sup> chez *Brucella* et chez *Sinorhizobium meliloti*. Les délétants de ces deux espèces d'alpha-protéobactéries présentent effectivement une croissance altérée sur un substrat préférentiel que constituent respectivement l'érythritol et le succinate (Pinedo, Bringhurst et al. 2008). La caractérisation du mutant décrit chez *S. meliloti* a révélé des altérations dans d'autres processus, notamment au niveau de la synthèse d'exopolysaccharide (EPS). Il pourrait être intéressant de déterminer si la souche mutée chez *Brucella* présente des phénotypes similaires.

Le lien entre le système PTS et le métabolisme de l'érythritol doit encore être déterminé. Toutefois, au vu de nos résultats, nous avons émis l'hypothèse que le système PTS puisse moduler l'expression des gènes du catabolisme ou du transport de l'érythritol. Une perspective pourrait ainsi être de déterminer si l'expression de ces gènes est modifiée dans les souches délétées pour les protéines EIIA.

#### B. NPr et EIIA<sup>Ntr</sup> sont liées à la croissance sur glutamate

Lorsque le glutamate constitue la seule source de carbone disponible, les souches  $\Delta$ EIIA<sup>Ntr</sup> et  $\Delta$ NPr présentent une faible croissance tandis que les autres délétants ont un profil similaire à la souche sauvage.

L'effet de la délétion de *ptsO* (NPr) peut être interprété par le modèle avancé par M. Dozot (Dozot M.). Ce modèle suggère que EI<sup>Ntr</sup> soit un senseur du métabolisme azoté et carboné en fixant l'alpha-cétoglutarate. Cela permettrait au système PTS de réguler des enzymes métaboliques en conséquence. Une de ces enzymes serait l'alpha-cétoglutarate déshydrogenase dont l'activité serait inhibée par EIIA<sup>Man</sup> sous forme déphosphorylée. Cette enzyme du TCA est par ailleurs liée au catabolisme du glutamate. En effet, le glutamate peut être converti par désamination en alpha-cétoglutarate qui peut alors être assimilé dans le TCA et poursuivre le cycle avec l'alpha-cétoglutarate déshydrogenase. De cette manière, en l'absence de NPr, le phosphorelais se trouve coupé et EIIA<sup>Man</sup> ne peut être que sous forme déphosphorylée. L'alpha-cétoglutarate déshydrogenase est par conséquent inhibée d'où une assimilation réduite d'alpha-cétoglutarate dérivé du glutamate dans le TCA. Le catabolisme du glutamate ainsi inhibé ne permettrait pas au final une croissance soutenue sur ce substrat d'où un phénotype de retard de croissance du délétant  $\Delta$ NPr.

Toutefois, si ce mécanisme explique la faible croissance du délétant  $\Delta$ NPr, un phénotype similaire devrait être observé pour la délétion de  $\Delta$ EI<sup>Ntr</sup>. En effet, l'absence de EI<sup>Ntr</sup> couperait le phosphorelais comme précédemment et devrait provoquer une inhibition de l'alpha-cétoglutarate déshydrogénase or, nos résultats démontrent que ce n'est pas le cas. Une première explication à ce phénomène pourrait être la perte du senseur EI<sup>Ntr</sup> suite à la délétion. En effet, il est envisageable que l'activité inhibitrice de EIIA<sup>Man</sup> nécessite la présence du senseur EI<sup>Ntr</sup> associé à de l'alpha-cétoglutarate pour être fonctionnelle. Il est également possible qu'il puisse exister un mécanisme plus complexe qui reste encore à définir.

L'existence d'un mécanisme plus complexe est supportée par le retard de croissance du délétant  $\Delta$ EIIA<sup>Ntr</sup> sur glutamate qui ne peut être expliqué par le modèle de M. Dozot. La nature exacte du lien entre glutamate et EIIA<sup>Ntr</sup> reste donc inconnue.

Un lien entre métabolisme de l'azote et une protéine EIIA du PTS a déjà été mis en évidence. En effet, il a été démontré chez *E. coli* que le complexe cAMP-CRP intervient dans la régulation du métabolisme de l'azote or, la formation de ce complexe est initiée par l'activation de l'adénylate cyclase par la protéine EIIA (Mao, Huo et al. 2007). Toutefois, l'analyse des séquences de *Brucella* révèle qu'elle ne semble pas disposer d'homologues d'adénylate cyclase ou de protéine CRP. Dès lors, le mécanisme impliqué est différent et reste à identifier.

Ainsi, certains liens entre des protéines du système PTS et le métabolisme de certaines sources carbonées restent inconnus et seront investigués en conséquence. Cependant, il sera auparavant nécessaire de confirmer les profils obtenus en répétant les expériences. Des souches mutées au niveau des résidus histidine et sérine qui sont phosphorylés au niveau des différentes protéines du PTS seront également construites et nous déterminerons si les phénotypes observés sont conservés. D'autre part, il sera également nécessaire de compléter les différents phénotypes mis en évidence afin de déterminer s'ils sont bien la conséquence de la délétion d'un gène du système PTS.

#### IV. L'influence de la composition environnementale sur la morphologie de *B. abortus* 2308 $\Delta EI^{Ntr}$

Les observations du délétant  $\Delta EI^{Ntr}$ , ont révélé que le milieu de culture utilisé influence de manière relativement importante la morphologie de la bactérie. Cette influence peut être observée au niveau d'une bactérie isolée, avec la présence de formes aberrantes, ainsi qu'au niveau d'un groupe de bactéries, avec la formation de structures en chaînettes.

Au vu de la formation de morphologies atypiques suite à la délétion de *ptsN* ( $\Delta EI^{Ntr}$ ), nous avons émis l'hypothèse qu'il puisse exister un lien entre le système PTS et le cycle cellulaire.

Ce lien peut soit d'une part impliquer la synthèse de la paroi bactérienne. Il est effectivement concevable qu'un PTS qui n'est plus fonctionnel suite à une délétion, puisse aboutir à une dérégulation au niveau de la synthèse de composés de la paroi bactérienne tel que le peptidoglycan. De telles dérégulations pourraient amener *in fine* à la formation d'aberrations morphologiques.

Il peut d'autre part exister un lien entre PTS et le processus de réplication du chromosome. Ce processus est en effet étroitement lié à la composition du milieu environnant de sorte à permettre une croissance importante sur milieu riche et un ralentissement sur milieu pauvre. Il a d'ailleurs été récemment postulé que la disponibilité en nutriments et le statut métabolique affecte chaque étape de la réplication du chromosome bactérien (Wang and Levin 2009). Il a notamment été décrit chez *Caulobacter crescentus*, une alpha-protéobactérie, qu'en l'absence de source de carbone, la réplication est inhibée. Le mécanisme sous-jacent implique la protéolyse de la protéine DnaA qui est essentielle à l'initiation de la réplication du chromosome. Cette protéolyse est initiée par la protéine SpoT qui est impliquée dans la production de l'alarmone ppGpp(p) en cas d'absence de sources carbonées (Lesley and Shapiro 2008). Il existe donc un lien entre métabolisme et cycle cellulaire et il est donc concevable que ce lien puisse impliquer le système PTS. Le rôle exact de ce PTS reste toutefois à définir.

En parallèle de la modification de la morphologie au niveau de la bactérie, il semble que le milieu module également la formation de « macrostructures » comprenant plusieurs

bactéries telles que des chaînettes. Une hypothèse permettant d'expliquer la formation de telles structures pourrait être que les courtes chaînettes soient la succession de bactéries qui se sont partiellement divisées et sont restées accolées suite à un problème de division. Il est également envisageable que ce mutant puisse présenter un problème au niveau de la production d'exopolysaccharide tel qu'il l'a été observé chez *S. meliloti*  $\Delta EIIA^{Man}$  (Pinedo, Bringham et al. 2008; Pinedo and Gage 2009). Il est alors possible de spéculer que la formation de chaînettes puisse être due à une production excessive d'EPS provoquant l'adhérence des bactéries se divisant générant au final des chaînettes. Ce ne sont cependant que des spéculations qui devront être vérifiées.

Quoiqu'il en soit, de nouveau ces phénotypes potentiels de morphologie atypique dépendante de la composition environnementale devront être complétés afin de confirmer qu'ils soient bien liés aux délétions.

## V. Conclusions

Au cours de ce mémoire, nous avons initié l'identification des sources carbonées prélevées par *B. abortus* 2308 en cours d'infection. Le protocole utilisé a été adapté d'une étude ayant déjà été réalisée sur *L. monocytogenes* et a nécessité diverses mises au point. Le protocole ainsi établi a permis pour la première fois de collecter de premières informations sur le métabolisme de *Brucella* mais également sur le métabolisme de la cellule hôte en cours d'infection.

Nos résultats démontrent que les cellules RAW métabolisent le glucose utilisé comme substrat marqué par les voies de la glycolyse classique (EMP) ainsi que par la voie du cycle de Krebs (TCA). Cette observation est valable que les cellules soient en conditions d'infection ou non. Cependant, il n'a pas été possible de comparer le métabolisme des cellules en conditions d'infection avec les cellules en conditions de cultures standards. Afin de déterminer si le processus infectieux provoque des modifications métaboliques chez l'hôte, une situation contrôle et de nouvelles expériences adaptées seront établies.

Au niveau du métabolisme de *Brucella*, nos résultats démontrent que la bactérie prélève potentiellement certains acides aminés comme l'aspartate, la sérine, le glutamate et l'alanine à la cellule hôte. Cependant, il semblerait qu'en parallèle de ce prélèvement, *Brucella* synthétise au moins du glutamate et de l'alanine *de novo*. Le précurseur ayant servi à la synthèse du glutamate aurait été métabolisé par la voie glycolytique classique (EMP) tandis que le précurseur de la synthèse de l'alanine aurait été métabolisé par la voie des pentoses phosphate. Ces résultats suggèrent que *Brucella* prélève différentes sources de carbone en cours d'infection, sources qui restent à identifier. Pour y parvenir, des lignées mutées au niveau de gènes codant pour des fonctions métaboliques stratégiques seront prochainement construites. Le marquage isotopique des acides aminés protéinogéniques en cours d'infection sera également étudié pour ces souches.

En parallèle de l'étude du métabolisme en cours d'infection, la caractérisation des souches délétées pour chacun des gènes du PTS hybride de *Brucella* a confirmé l'existence d'un lien entre PTS et métabolisme. Deux protéines EIIA sont effectivement associées à la croissance de *B. abortus* 2308 sur du milieu défini contenant de l'érythritol tandis que  $EIIA^{Ntr}$  et  $NPr$  sont liées au métabolisme du glutamate. Autant la conséquence de la délétion de *ptsO* ( $NPr$ ) sur la croissance sur glutamate peut être interprétée par le modèle proposé par M. Dozot, autant les autres mécanismes impliqués restent à définir.

L'observation de ces mutants a par ailleurs révélé que la composition de l'environnement influence la morphologie de *B. abortus* 2308  $\Delta EI^{Ntr}$ . Une hypothèse

permettant d'expliquer cette influence serait qu'il existe un lien entre le système PTS et le cycle cellulaire. Ce lien reste cependant à déterminer.

Il sera par ailleurs intéressant de déterminer pour quelle raison le milieu avec érythritol est associé au plus haut taux de morphologies atypiques. En outre, la souche sauvage présente aussi une morphologie atypique de type « allongée » en présence d'érythritol. Cette observation a également été constatée sur du milieu RPMI contenant de l'érythritol (M. Terwagne, thèse en cours). Ces résultats supportent une hypothèse récente qui propose que l'érythritol ne constitue pas seulement une source de carbone mais constitue également un signal pour *Brucella* (Delrue R.M., thèse 2002 ; Saugeri F., communications personnelles).

Toutefois, avant toute investigation supplémentaire, il sera nécessaire de confirmer que chaque phénotype observé est bien conservé et dû à une délétion en répétant les expériences et en complétant les souches mutées. Il sera également nécessaire de déterminer si les modifications d'expression de certains gènes qui ont été constatées sont dues à des effets polaires ou constituent un autre phénotype des souches délétées.

---

# Matériel et méthodes

---

# Matériel et méthodes

## I. Souches, lignées et plasmides

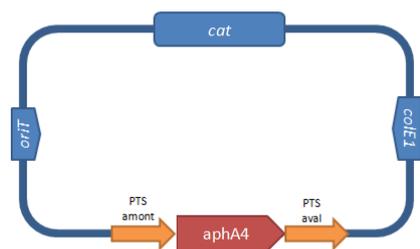
### 1. Souches bactériennes

Souches	Caractéristiques	Références
<i>B. abortus</i> 2308	Souche de <i>Brucella</i> considérée au cours de ce travail. Elle présente un phénotype lisse et est un mutant spontané résistant à l'acide nalidixique (Nal <sup>R</sup> ).	
<i>B. melitensis</i> 16M mCherry	Souche de <i>B. melitensis</i> 16M biovar 1 exprimant constitutivement le fluorochrome mCherry.	Copin R., thèse en cours
<i>E. coli</i> S17	Génotype: $\lambda$ pir [recA thi pro hsdR- M+ RP4::2-Tc ::Mu ::Km Tn7 lysogenized with $\lambda$ pir phage]. Cette souche a été utilisée pour le transfert de plasmides chez <i>Brucella</i> , par conjugaison.	Miller and Mekalanos, 1988 <sup>1</sup>

### 2. Plasmides

Plasmides	Caractéristiques
<i>pSKoriT-cat</i>	Vecteur dérivé du pBluescript SK (Stratagene), dans lequel a été clonée une origine de transfert conjugatif <i>oriT</i> . Il porte le gène <i>cat</i> (résistance au chloramphénicol) et une origine de réplication <i>ColE1</i> . Cette dernière n'est pas fonctionnelle chez <i>Brucella</i> ; c'est donc un plasmide suicide chez celle-ci (Danèse, thèse 2002).
<i>pSKoriTcat-<math>\Delta</math>PTS::aphA4</i>	Vecteurs construits sur base du <i>pSKoriT-cat</i> qui portent une cassette <i>aphA4</i> (résistance à la kanamycine) bordée des régions amont et aval de gènes du système PTS (Fig. M1). Il en existe 5 différents, chacun étant spécifique d'un des gènes du système PTS : <i>ptsP</i> , <i>ptsO</i> , <i>ptsN</i> , <i>ptsM</i> et <i>hprk</i> . Ces plasmides ont été utilisés pour le remplacement allélique des gènes du PTS par la cassette <i>aphA4</i> chez <i>Brucella</i> (thèse de M. Dozot et mémoire de R. Copin).

**Figure M1. Représentation schématique d'un *pSKoriTcat- $\Delta$ PTS::aphA4*.** *aphA4* : cassette de résistance à la kanamycine, *cat* : chloramphénicol acétyltransferase, *colE1* : origine de réplication, *oriT* : origine de transfert conjugatif, PTS amont/aval : régions amonts/aval d'un gène PTS.



### 3. Lignées de cellules eucaryotes

Lignée cellulaire	Caractéristiques
HeLa	Première lignée cellulaire humaine immortalisée qui a été isolée d'un carcinome épithélial humain. Ces cellules ont largement été exploitées en laboratoire depuis (Masters 2002) <sup>2</sup> .
J774	Macrophages de souris BALB/C immortalisés.
RAW 264.7	Lignée de macrophages murins qui a été principalement utilisée dans ce travail. Elles ont été isolées de prélèvements d'ascite de souris mâles après injection intra-péritonéale du virus de leucémie murine d'Abelson (A-MuIV).

<sup>1</sup> Miller, V. L. and J. J. Mekalanos (1988). "A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*." *J Bacteriol* **170**(6): 2575-83.

<sup>2</sup> Masters, J. R. (2002). "HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly." *Nat Rev Cancer* **2**(4): 315-9.

## II. Milieux, tampons et solutions

### 1. Milieux de culture

Milieu riche pour <i>E. coli</i> : milieu Luria-Bertani (LB)		Milieu riche pour <i>Brucella</i> : milieu 2YT	
Pour un litre d'eau désionisée :			
Hydrolysate de caséine (peptone)	10 g	Hydrolysate de caséine (peptone)	16 g
NaCl	5 g	NaCl	5 g
Yeast extract	5 g	Yeast extract	10 g
Agar (pour milieu solide)	15g	Agar (pour milieu solide)	16g

**NB :** Le milieu riche TSB (Tryptic Soy Broth) a également été utilisé mais est acheté dans un conditionnement directement prêt à l'emploi (peptone de caséine pancréatique : 15g/l, peptone de soja : 5g/l, NaCl : 5g/l).

Composition de la base minérale du milieu défini (pour 250ml de milieu)		Sources de carbones ajoutées à la base minérale du milieu défini	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	2,3 g	α-cétoglutarate	20 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,75 g	Erythritol	2 g/l
N <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,025 g	Fumarate	20 mM
NaCl	1,25 g	Glutamate	2 g/l
Nicotinate	0,05 g	Malate	10 mM
Thiamine (hydrochloride)	0,05 g		
Panthoténate	0,0175 g		
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	0,125 g		
MgSO <sub>4</sub>	2,5 mg		
MnSO <sub>4</sub>	0,025 mg		
FeSO <sub>4</sub>	0,025 mg		
Biotine	0,025 mg		

Les milieux ont été stérilisés par autoclavage à 121°C durant 20 min (2YT, LB) ou par filtration (0,22µm).

Milieux de culture de cellules	
Type cellulaire	Milieu utilisé
HeLa	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) High glucose (4,5 g/l) (Gibco) + 10% de sérum foetal bovin (FBS) + 1% acides amines non-essentiels (NEAA, Gibco) + 1% pyruvate de sodium (Gibco)
J774	RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) (Gibco) + 10% de FBS + 1% L-glutamine (Gibco)
RAW 264.7	DMEM High glucose (initialement en poudre, Gibco) + 10% de FBS

### 2. Tampons et solutions

PBS 20X		PBS Triton 1% (250 ml)		PBS Triton 0,1% (250 ml)	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (2mM)	4 g/l	PBS 20X	10 ml	PBS 20X	10 ml
KCl (2,7 mM)	4 g/l	Triton X100	2 ml	Triton X100	0,2 ml
NaCl (137 mM)	160 g/l	Eau désionisée	239,8 ml	Eau désionisée	239,8 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (10 mM)	22,98 g/l				

Solutions nécessaires pour préparer du tampon RIPA		Tampon RIPA		Tampon TAE 50X	
Tris (20 mM)	6,06 g/l	Tris (20 mM)	50 ml	Tris-HCl, pH 8,0	40 mM
MgCl <sub>2</sub> (100 mM)	20,3 g/l	MgCl <sub>2</sub> (100 mM)	5 ml	EDTA	50 mM
Déoxycholate	6,5 g/l	Déoxycholate (5 g/l)	10 ml	Acide acétique glacial	57,1 ml/l
Sodium dodécyl sulfate (SDS)	100g	SDS 10%	1 ml		
		Nonidet P40	1 ml		

### III. Techniques relatives à l'utilisation de bactéries

#### 1. Transformation bactérienne par choc thermique

##### A. Principe

La transformation bactérienne permet l'introduction d'ADN exogène dans une bactérie. Nous avons utilisé la transformation par choc thermique afin de transformer les souches *d'E. coli S17-1* avec les plasmides pSKoriTcat-ΔPTS::aphA4.

##### B. Méthode

Ce type de transformation nécessite l'utilisation de bactéries dites « compétentes » dont les membranes ont préalablement été perméabilisées. Pour ce faire, les bactéries sont centrifugées et le culot est resuspendu à deux reprises dans une solution hypotonique de chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>, 60 mM) avant incubation durant 30 min sur glace. Les bactéries sont ensuite de nouveau centrifugées et le culot est resuspendu dans une solution de CaCl<sub>2</sub> 60mM + 15% de glycérol avant conservation à -80°C ou transformation.

Pour la transformation, 100 µl de bactéries CaCl<sub>2</sub> compétentes sont mises en présence de 5 µl d'ADN plasmidique. Ce dernier forme, avec le CaCl<sub>2</sub>, un complexe résistant aux désoxyribonucléases qui, théoriquement, adhère à la bactérie. Après une incubation sur glace de 30 min, les bactéries subissent un choc thermique (2 min à 37°C) qui permet l'entrée du complexe dans la cellule. S'en suit une incubation (45 min à 37°C sous agitation) en milieu riche (LB) afin de permettre la régénération de la paroi bactérienne ainsi que l'expression des gènes de résistances aux antibiotiques introduits. Les cellules sont ensuite étalées sur une boîte de milieu sélectif approprié qui est mise à incuber toute la nuit à 37°C.

#### 2. La conjugaison

##### A. Principe

La conjugaison est un processus de transfert horizontal de matériel génétique qui peut avoir lieu entre deux bactéries Gram négatives. La bactérie donneuse (*E. coli S17-1*) a intégré dans son génome le plasmide RP4 qui code pour l'ensemble des protéines nécessaire à ce transfert. Cette bactérie va fournir, par l'intermédiaire d'un pilus sexuel, le plasmide conjugatif disposant d'une origine de transfert (*oriT*) à la bactérie receveuse.

##### B. Méthode

50µl d'*E. coli S17-1* donneuse, préalablement transformées avec le plasmide d'intérêt, est mis en présence avec 1ml de *Brucella* receveuses avant centrifugation à 7000 RPM. Le culot est resuspendu dans du milieu riche 2YT (1 ml) avant d'être centrifugé une seconde fois à 7000. Le culot est alors resuspendu dans 100 µl de 2YT qui sont déposés sur 2YT agar et incubés au cours de la nuit à température ambiante. La moitié du « spot » obtenu est resuspendu dans 1 ml de 2YT dont 100 µl sont étalés sur une boîte de 2YT agar avec l'antibiotique sélectif adéquat et de l'acide nalidixique. Les 900 µl restant sont centrifugés, le culot est resuspendu dans approximativement 100 µl de 2YT et est également étalé sur une boîte de 2YT agar avec l'antibiotique sélectif approprié et de l'acide nalidixique. Les boîtes sont finalement mises à incuber à 37°C 3 à 4 jours.

### 3. Construction de souches mutantes par remplacement allélique

#### A. Principe

Le remplacement allélique est une technique qui permet de remplacer un gène d'intérêt (les gènes du système PTS dans notre cas) par une cassette de résistance à un antibiotique (*aphA4*). Ce remplacement fait suite à l'apport d'un vecteur suicide portant la cassette de résistance qui est elle-même bordée des régions « amont » et « aval » (500 paires de bases) du gène d'intérêt. Un événement de double recombinaison homologue peut alors avoir lieu entre le plasmide et le chromosome bactérien permettant le remplacement du gène PTS. Les délétants obtenus, également appelés transjugants, sont alors sélectionnés grâce à leur nouveau phénotype de résistance et à la perte de la résistance au chloramphénicol, encodée par le gène *cat* présent sur le plasmide.

#### B. Méthode

Une conjugaison avec *E. coli* S17-1 transformée avec le plasmide pSKoriTcat- $\Delta$ PTS::aphA4 permet le transfert de ce plasmide chez *B. abortus* 2308. En cas de double recombinaison homologue, le gène PTS considéré est remplacé par la cassette *aphA4*. Les bactéries transformées ou délétées sont sélectionnées sur 2YT agar + kanamycine (50  $\mu$ g/ml) et de l'acide nalidixique (25 $\mu$ g/ml). Après incubation, les bactéries résistantes sont repiquées en parallèle sur 2YT agar avec kanamycine et 2YT agar avec chloramphénicol (20  $\mu$ g/ml) et sont incubées plusieurs jours à 37°C. Les bactéries sensibles au chloramphénicol mais résistantes à la kanamycine sont sélectionnées car délétées.

## IV. Techniques relatives aux acides nucléiques

### 1. Polymerase chain reaction (PCR)

La PCR est une technique permettant l'amplification d'un fragment d'ADN d'intérêt. Cette amplification se fait au travers de trois étapes : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation. Chacune de ces étapes se déroule à une température spécifique. La dénaturation vise à séparer les deux brins d'une matrice d'ADN. La seconde étape permet l'hybridation spécifique de petits brins d'ADN préalablement conçus de sorte à s'hybrider de part et d'autre de la séquence d'intérêt (amorces). La séquence comprise entre les deux amorces peut être alors être amplifiée par une ADN polymérase thermorésistante (ici, la *Taq* DNA polymérase de chez Promega) au cours de l'élongation. La répétition de ces trois étapes à de nombreuses reprises augmente exponentiellement le nombre de copies du fragment d'ADN cible. L'ensemble des composants nécessaires (matrice d'ADN, primers, polymérase et dNTP's) sont préparés dans un mix. La composition de ce mix et le programme PCR sont les suivants :

Mix PCR		Programme PCR	
<b>Réactifs</b>	<b>Quantité</b>		
Tampon 5x de l'enzyme utilisée	10 $\mu$ l	Dénaturation initiale	5 min à 94°C
Mélange de dNTP's (5 mM pour chaque)	2 $\mu$ l	Amplification : 25 cycles de 3 étapes :	
Amorce forward	0,5 $\mu$ l	dénaturation	30 sec à 94°C
Amorce reverse	0,5 $\mu$ l	hybridation	30 sec à X°C <sup>1</sup>
Taq polymérase	1 $\mu$ l	élongation	Y <sup>2</sup> min à 72°C
Matrice d'ADN (template, 1 à 10 ng)	35,5 $\mu$ l	Elongation finale	10 min à 72°C
Eau distillée			

<sup>1</sup> X= la température de melting des amorces [ $T_m = 2*(A+T) + 4*(G+C) - 10^\circ\text{C}$ ] et doit être compris entre 52 et 65°C. Ce calcul ne prend en compte que les régions des primers s'hybridant avec l'ADN template et pas les séquences ajoutées (sites de restriction, ...).

<sup>2</sup> Y= 1minute par millier de paires de bases à amplifier.

Le génome bactérien peut être utilisé comme matrice, après lyse préalable des bactéries, pour réaliser une PCR. Pour ce faire, les bactéries sont donc lysées par chauffage (1h, 80°C) dans du PBS avant amplification par PCR d'un gène d'intérêt sur 1 µl de lysat. Nous avons utilisé cette technique pour confirmer la délétion des gènes *ptsP*, *ptsO*, *ptsN*, *ptsM* et *hprk*. La taille du produit PCR amplifié est en effet différente si la souche est délétée ou non. Les primers utilisés sont les suivants :

Gène	Amorce	Séquence	Gène	Amorce	Séquence
<i>ptsP</i> (E1 <sup>Ntr</sup> )	Amont	CCATCACCACGTCGGAAA	<i>ptsM</i> (EIIA <sup>Man</sup> )	Amont	GAGCGCTGGATATTGAA
	Aval	AAAAGCGCATCGCGGTGC		Aval	AAACTGCAATCGGGCAGC
<i>ptsO</i> (NPr)	Amont	GCACGCGACGGGAGCTTT	<i>hprk</i> (HprK)	Amont	CGAAGTGCGGCGCAACAA
	Aval	ATTAGCCTGGCCGATTGG		Aval	ATAGCGGCAGGGGCGTGA
<i>ptsN</i> (EIIA <sup>Ntr</sup> )	Amont	GACCCGGCTTCGCCGTTA			
	Aval	TTCAGAGCTTCATTGTCC			

## 2. Analyse de l'expression de gènes par real time PCR (RT PCR)

### A. Principe

La RT PCR est une technique dérivée de la PCR classique qui diffère notamment au niveau de la matrice utilisée pour l'amplification. Cette dernière est en effet de l'ADN complémentaire (cDNA) généré à partir d'ARN dans le cas de la RT PCR. Un court segment (60 pb) d'un gène d'intérêt est amplifié en présence d'un fluorochrome se fixant à l'ADN (SybrGreen). Ainsi, au cours des cycles, l'intensité de fluorescence augmente parallèlement à la quantité d'ADN. A la fin du programme d'amplification, l'intensité de fluorescence pour un gène testé est normalisée par rapport à un contrôle endogène (la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase dans notre cas). Ces valeurs sont ensuite normalisées par rapport à une condition standard qui était l'expression des gènes du PTS chez la souche sauvage dans notre cas. Il est ainsi possible de déterminer si l'expression d'un gène dans une souche délétée varie par rapport à la souche sauvage.

### B. Méthode :

#### Extraction d'ARN total et traitement à la DNase

Une remarque générale par rapport au travail avec de l'ARN est qu'il est nécessaire de se trouver en conditions RNase free (des solutions sont disponibles à cet effet). Des précultures de chaque souche (WT, *ΔptsO*, *ΔptsN*, *Δhprk*) sont lancées la veille dans 5 ml de 2YT à 37°C. Ces précultures sont mises à même DO, et centrifugée. Chaque culot est resuspendu dans 20 µl de SDS 10% et 4µl de protéinase K (20mg/ml, Invitrogen) avant d'être mis à incuber 1 h à 37°C sous agitation. 1 ml de réactif Tripure est ajouté à chaque tube et le mélange est homogénéisé au vortex et incubé 10 min à 65°C. 200 µl de chloroforme sont ajoutés avant homogénéisation, incubation 10 min à température ambiante et centrifugation à 12 000 RPM, 15 min à 4°C. Deux phases se sont alors créées, une phase colorée et une phase aqueuse qui contient l'ARN. Cette seconde phase est récoltée délicatement et l'ARN est précipité en ajoutant 500 µl d'isopropanol et en incubant toute la nuit à -20°C. Le lendemain, les tubes sont centrifugés à 14000 RPM, 30 min à 4°C afin de culoter l'ARN. Les culots sont resuspendus dans 200 µl d'éthanol 75% avant une centrifugation à 8500 RPM pendant 5 min à 4°C afin de reculoter l'ARN. Le surnageant est éliminé, le culot est séché à température ambiante avant d'être finalement resuspendu dans 50 µl d'eau RNase free. Les extraits d'ARN subissent alors un traitement à la DNase (kit Fermentas) afin de réduire la contamination de l'ADN. Ce traitement implique l'ajout de la DNase-I sur 1 à 5 µg d'ARN à

traiter (mix à réaliser : 1 µg de tampon de réaction avec MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de DNase-I, l'ARN et mettre à un volume de 10 µl avec de l'eau RNase free). Le mélange est incubé à 37°C durant 30 min pour permettre l'hydrolyse de l'ADN. La DNase-I est alors inactivée par chauffage à 65°C durant 10 min. 1 µl d'EDTA 25 mM est préalablement ajouté afin de limiter l'hydrolyse de l'ARN durant ce chauffage qui en fin de traitement est prêt pour la reverse transcription.

#### Reverse transcription

Une même quantité d'ARN (1 à 5 µg) est traitée pour chaque test à réaliser. 2 µl d'amorces aléatoires (600 nM) et de l'eau sont ajoutés à chaque échantillon pour un volume final de 13 µl. Les ARNs sont alors chauffés 10 min à 65°C avant d'être mis sur glace durant 5 min. 7 µl du kit (Roche) contenant notamment la reverse transcriptase sont ajoutés, le mélange est homogénéisé et incubé 10 min à température ambiante. Les échantillons sont chauffés 30 min à 55°C puis 5 min à 85°C avant d'être conservés à -20°C jusqu'à l'étape suivante.

#### RT PCR

Les échantillons de cDNA traités sont déposés en triplicats dans une plaque 96 puits « Optical Reaction Plate » (AB Applied Biosystems) à 4°C. Pour chaque échantillon, un contrôle négatif (ARN qui n'a pas été rétrotranscrit) est testé. Les plaques sont élaborées de sorte à toujours disposer du gène de référence pour chaque souche, ainsi que la condition de référence (souche sauvage) pour chaque gène analysé. Un mélange contenant la sonde fluorescente SybrGreen est ajouté à chaque puits (composition décrite ci-dessous), un film protecteur est déposé sur la plaque avant que celle-ci soit centrifugée (1000 RPM, 2 min) afin que le mélange soit culoté au fond du puits. La plaque est alors introduite dans le dispositif à RT PCR (StepOne plus, AB Applied Biosystem) qui elle-même est configurée pour le SybrGreen. Les séquences des primers utilisés sont reprises ci-dessous.

Mix RT PCR	
cDNA	1 µl
SYBR <sup>®</sup> Green PCR Master Mix (AB Applied Biosystems)	10 µl
Primer amont (10 µM)	1 µl
Primer aval (10 µM)	1 µl
H <sub>2</sub> O	8 µl

Gène	Amorce	Séquence	Gène	Amorce	Séquence
<i>sahH</i>	Amont	CAAGCCAAGATTTTGTGTCAA	<i>bvrR</i>	Amont	TTATCGCGTCGAAACCTATACC
	Aval	GCATTCGTTCTCTCGCAT		Aval	TCGAAGATCGCAAGATTGG
<i>ptsO</i> (NPr)	Amont	ATAATTATAACGCCATGTCCG	<i>bvrS</i>	Amont	CCATGAGCTGAAGAACCCC
	Aval	CAAGCATCATCAAGCCCAT		Aval	TTGCGTGATTCTGTCGGT
<i>ptsM</i> (EIIA <sup>Man</sup> )	Amont	AATCTGCCATTTCCGTG	<i>pckA</i>	Amont	TTCGTTCAAGATCTCATCGG
	Aval	CGACAGCTTGATGAGCATAGG		Aval	CGAATGCCAAGCATATTCG
<i>hprk</i> (HprK)	Amont	AAGAGCGCTGGATTTGAAGA	<i>gapdh</i>	Amont	GGAAGGAAGAAAACGTCGATATC
	Aval	GCGCATTGGAATCACCAT		Aval	AGGCAGCACTTCATCTTGAAG

## V. Mise au point d'un protocole d'infection par *Brucella*, de lyse et de fractionnement

Le protocole à mettre au point comprend trois parties distinctes : (i) l'infection de cellules, (ii) la lyse des cellules infectées et (iii) l'isolement de *Brucella* des composants cellulaires. Ce protocole devait permettre la collecte d'1 mg de matière sèche bactérienne après infection pour pouvoir réaliser l'analyse GC/MS. La matière sèche a été estimée sur base de comptages de CFU's (Colony Forming

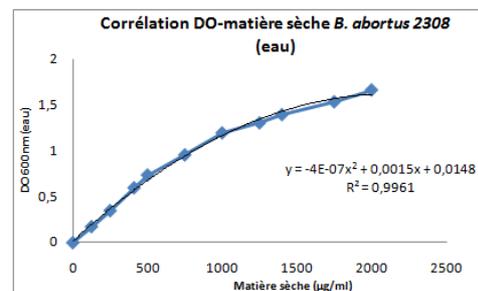


Figure M2. Courbe de corrélation DO-masse sèche (µg) chez *B. abortus* 2308.

Unit<sup>1</sup>), d'une corrélation DO-CFU ( $DO_{600} 1 = 3.10^9$  *Brucella*/ml) et d'une courbe de corrélation DO- masse sèche (Fig. M2 ci-jointe).

## 1. Adaptation du protocole d'Eylert et al.

Ce protocole initialement adapté pour *L. monocytogenes* a subi des modifications dont les plus importantes sont reprises dans le tableau suivant :

**Tableau 1:** Résumé des paramètres successivement modifiés au cours des expériences d'infection (les modifications par rapport à l'expérience précédente sont rapportées)

Expérience	Paramètres principaux <sup>2</sup>
Infection I	-Etape 1: Infection de 10 T175 contenant $2.10^5$ cellules HeLa par <i>B. abortus 2308</i> exprimant la protéine RicA tagée avec 3 FLAG en C-terminal (R3F), à une modalité d'infection <sup>3</sup> (MOI) de 50 dans 20ml de DMEM sans sérum contenant 20µg/ml d'EGF <sup>4</sup> , durant 1h. -Etape 2: Lavage des cellules avec 10ml de DMEM sans FBS. -Etape 3: Ajout de 20 ml de DMEM sans FBS contenant 50µg/ml de gentamycine, 1h. -Etape 4: Ajout de 20 ml de DMEM contenant 10% de FBS et 10µg/ml de gentamycine, 1h. -Etape 5: Incubation 5h à 37°C, 5% CO <sub>2</sub> . -Etape 6: Lavage avec 10ml/flacon de PBS. -Etape 7: Ajout de 10ml/flacon d'eau bidistillée. -Etape 8: Incubation 20 min à -80°C. -Etape 9: Fractionnement : centrifugation des lysats à 1000 RPM, 10 min, 4°C (fractions C1/S1) avant centrifugation du surnageant à 4000 RPM durant 15 min à 4°C (fractions C2/S2). Le culot obtenu est lavé avec du tampon RIPA avant d'être centrifugé à 4000 RPM durant 15 min à 4°C de nouveau (fraction finale/S3). -Etape 10: Resuspension des culots dans du tampon RIPA.
Infection II	-Etape 5: Incubation 22h à 37°C, 5% CO <sub>2</sub> . -Etape 7: Ajout de 10ml de PBS triton 0,1% par flacon. -Etape 8: Incubation 5-10 min avec une étape de ratissage.
Infection III	-Etape 1: Infection à une MOI de 300 -Etape 5: Incubation 46h à 37°C, 5%CO <sub>2</sub>
Infection IV	-Etape 1: Infection de 7 T175 à MOI 300 bactéries par cellules dans 20 ml de DMEM sans FBS et sans EGF par flacon. - Etape 3: Ajout de 20 ml de DMEM contenant 10% de FBS et 50 µg/ml de gentamycine -Etape 4: Ajout de 50 ml de DMEM contenant 10% de FBS et 10 µg/ml de gentamycine Addition
Infection V	-Etape 1: Infection de 7 T175 par <i>B. abortus 2308</i> WT

Suite aux faibles quantités de matière sèche obtenues, nous avons changé de type cellulaire optant pour les macrophages murins RAW qui permettent un rendement d'infection de 2 à 100 fois supérieur par rapport aux cellules HeLa. Les T175 ont été substitués par des T25 qui permettent des collectes de masse sèche similaires pour autant qu'une étape de centrifugation supplémentaire (1000 RPM, 10 min) soit réalisée en début d'infection.

## 2. Adaptation du protocole de Lamontagne et al.

L'adaptation du protocole de l'étude de protéomique de *Lamontagne et al.* a conduit à des modifications importantes au niveau du protocole de lyse et de fractionnement précédent. Le protocole d'infection a été conservé et implique : l'infection de 10 T25 contenant  $2.10^5$  cellules RAW/ml par *B. abortus 2308* WT à une MOI de 300 dans un volume de 3 ml de DMEM sans sérum. Les flacons sont centrifugés 10 min à 1000 RPM à 4°C avant d'être

<sup>1</sup> Une CFU est une colonie bactérienne viable issue théoriquement de la multiplication d'une unique bactérie. Le comptage de ces colonies macroscopiques permet donc une estimation aisée du nombre initial de bactéries viables.

<sup>2</sup> Etapes 1-5 : infection, étapes 6-8 : lyse et étapes 9-10 : fractionnement

<sup>3</sup> MOI = dose infectante soit, le nombre de bactéries par cellules à infecter

<sup>4</sup> EGF : Epidermal Growth Factor, permet d'augmenter l'efficacité d'infection

incubés 1 h à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Les flacons sont ensuite lavés avec 3ml de DMEM sans sérum avant d'ajouter 5 ml par T25 de DMEM avec FBS et contenant 50µg/ml de gentamycine. Les flacons sont ensuite incubés 1 h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> avant que le milieu soit remplacé par 7 ml/ T25 de DMEM contenant 10% de FBS, 10 µg/ml de gentamycine. Les T25 sont alors finalement mis à incuber 46h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Les modifications testées pour les protocoles de lyse et de fractionnement sont reprises dans le suivant :

**Tableau 2:** Résumé des paramètres successivement modifiés au niveau des protocoles de lyse et de fractionnement (les modifications par rapport à l'expérience précédente sont rapportées)

Expérience	Paramètres principaux
Infection VI	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Etape 1: Lavage avec 3 ml de PBS/T25</li> <li>-Etape 2: Lyse au PBS triton 1% (3 ml/T25), 7,5 min à température ambiante</li> <li>-Etape 3: Centrifugation du lysat sur un coussin (1ml) de sucrose 0,8 M à pH 7,4 ; 1600 RPM durant 5 min à 4°C</li> <li>-Etape 4: Collecte du culot cellulaire et centrifugation du surnageant sur un gradient discontinu de sucrose, à 4000 RPM, durant 15 min, 4°C. Ce gradient est composé de trois phases de 1 ml chacune : sucrose 1,5 M contenant 3 mM d'imidazole, pH 7,4 (culot)/ sucrose 1 M contenant 3 mM d'imidazole, pH 7,4 (phase intermédiaire)/ sucrose 0,8 M contenant 3 mM d'imidazole, pH 7,4 (surface sur laquelle est déposée le lysat).</li> <li>-Etape 5: Collecte des bactéries dans le culot contenant la phase la plus concentrée de sucrose.</li> <li>-Etape 6: Traitement des culots cellulaires et bactériens pour analyse GC/MS.</li> </ul>
Infection VII	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Etape 2: Lyse au PBS triton 1%, 7,5 min à température ambiante. Le lysat est collecté et une seconde lyse est réalisée en ajoutant 3 ml de PBS Triton 0,1% par T25 durant 7,5 min. Les flacons sont alors ratissés, le lysat est collecté et chaque flacon est rincé par 3 ml de PBS qui sont ajoutés aux solutions collectées.</li> </ul>
Infection VIII	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Etape 2: Les cellules sont collectées dans 3 ml de PBS par ratissage avant d'être centrifugées à 1250 RPM, 5 min à 4°C. Le culot est resuspendu dans 1 ml de sucrose 0,3 M contenant 3 mM d'imidazole, pH 7,4. La solution est lysée mécaniquement avec un homogénéiseur de Dounce.</li> </ul>

Le protocole finalement conservé est le protocole de double lyse chimique aux PBS Triton 1% et 0,1% (Infection VII).

## VI. Procédures de marquage isotopique

### 1. Principe

Le marquage isotopique s'opère en fournissant un substrat marqué qui va être métabolisé. Les métabolites et macromolécules synthétisées sur base de ce substrat vont alors avoir incorporé un ou plusieurs isotopes stables (<sup>13</sup>C). L'incorporation d'un <sup>13</sup>C génère une modification d'une unité de masse par isotope stable qui peut alors être analysée par spectrométrie de masse (GC/MS).

Trois expériences de marquage par isotopes stables ont été réalisées avec du glucose uniformément marqué au <sup>13</sup>C ([U-<sup>13</sup>C6]) avant analyse de la distribution de marquage au niveau des acides aminés protéinogéniques par GC/MS.

**1.** La première implique l'incubation de macrophages non infectés avec le substrat marqué. Elle permet l'identification des acides aminés synthétisés *de novo*, sur base du glucose [U-<sup>13</sup>C6] par les cellules en conditions classiques de culture. Elle constitue ainsi une situation de « contrôle » du métabolisme cellulaire.

**2.** La seconde comprend un marquage durant le processus d'infection. Cette expérience permet l'identification des acides aminés prélevés à la cellule hôte par *Brucella* et ceux étant synthétisés *de novo*.

**3.** La troisième comprend un prémarquage des composants cellulaires avant infection. Le milieu avec le substrat marqué est remplacé par du milieu classique pendant l'infection. Ainsi, les acides aminés bactériens marqués ne peuvent provenir que des acides aminés cellulaires ou d'une synthèse *de novo* sur base de sources carbonées prélevées à la cellule.

## **2. Méthode**

### **A. Marquage des macrophages non infectés (expérience 1)**

Afin d'identifier les acides aminés synthétisés *de novo* par les macrophages murins RAW non infectés, 10 flacons T25 contenant  $2 \cdot 10^5$  cellules/ml ont été cultivées pendant 6 h à 37°C (5% CO<sub>2</sub>) dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) complété avec:

- 1% d'acides aminés non-essentiels (NEAA, Gibco),
- 1% de pyruvate de sodium (Gibco),
- 10% de sérum fœtal bovin (FBS),
- et du glucose [U-<sup>13</sup>C6] pour une concentration finale de 10,7mM.

Les cellules ont ensuite été collectées dans 3 ml de DMEM avec FBS en ratissant. La suspension a été centrifugée afin de culoter les cellules. Ce culot cellulaire a été traité pour analyse du marquage au niveau des acides aminés par GC/MS (le traitement est décrit par la suite).

### **B. Marquage isotopique en cours d'infection (expérience 2)**

Les macrophages sont cultivés dans du milieu classique et sont infectés selon le protocole final qui a été décrit précédemment. Les cellules sont cultivées dans du milieu complété et contenant le substrat marqué (DMEM + 10,7 mM glucose [U-<sup>13</sup>C6]) au cours de l'étape d'incubation de 46h à 37°C, dans une atmosphère avec 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont ensuite lysées et les fractions bactérienne et cellulaire sont séparées comme décrit précédemment avant d'être traitées pour analyse GC/MS.

### **C. Prémarquage des cellules (expérience 3)**

Les macrophages sont cultivés durant 10 jours, soit 4 passages de cellules, dans du DMEM complété et contenant 10,7 mM de glucose [U-<sup>13</sup>C6]. Au neuvième jour, 10 T25 sont ensemencés à  $2 \cdot 10^5$  cellules/ml avant d'être infectés le lendemain. Les protocoles d'infection, lyse et fractionnement sont ceux décrits précédemment.

## **VII. Techniques relatives à la spectrométrie de masse (adapté de la thèse de C. Nicolas)**

### **1. Traitement des échantillons pour analyse GC/MS**

Les bactéries collectées post-infection se trouvent dans 1ml de solution hautement concentrée de sucrose et sont culotées par centrifugation à 12000 RPM durant 15 min à 4°C. Chaque culot (10 par infection) est resuspendu dans 100 µl de tampon RIPA afin de réduire la contamination par les protéines cellulaires. Les 10 échantillons sont rassemblés avant de subir une seconde centrifugation à 12000 RPM durant 15 min à 4°C. Les culots bactériens obtenus, ainsi que les fractions cellulaires préalablement collectées, sont lavés à deux reprises avec 1ml d'eau bidistillée stérile.

50 et 500  $\mu\text{l}$  d'HCl 6M sont ajoutés respectivement aux culots bactérien et cellulaire avant d'être incubé 12h sur plaque chauffante à 110°C. Cette étape d'hydrolyse permet de libérer les acides aminés des protéines. Les hydrolysats sont ensuite neutralisés avec du NaOH 6M. Les échantillons sont alors congelés et conservés à -80°C avant envoi dans un laboratoire extérieur (en collaboration avec C. Wittman, Université Technique de Braunschweig). Ce laboratoire s'est alors chargé de lyophiliser les échantillons et de dériver les acides aminés. Cette dernière étape permet de former des dérivés volatiles pouvant être séparés par chromatographie en phase gazeuse. Dans notre cas, les acides aminés ont été dérivatisés par du N-(tert-butyldimethylsilyl)-N-méthyl-trifluoroacétamide (MBDSTFA) générant des dérivés tert-butyldimethylsilyl (TBDMS) dont le marquage isotopique peut être déterminé par GC/MS.

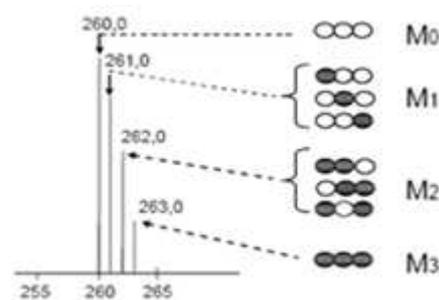
## 2. L'analyse du marquage isotopique des acides aminés protéinogéniques par GC/MS

Les analyses de marquage isotopique ont été réalisées sur un spectromètre de masse couplé à un module de chromatographie en phase gazeuse. Ces analyses ainsi que la lyophilisation préalable des échantillons ont été menées à Braunschweig, en collaboration avec C. Wittmann.

### A. Principe général

La spectrométrie de masse permet la discrimination de molécules en fonction de leur masse. Dans le cadre de ce travail, les molécules ont été séparées par chromatographie en phase gazeuse. Cette séparation se fait essentiellement en fonction de leur température d'ébullition. En sortie de colonne, les molécules sont ionisées par impact électronique (EI) dans une chambre d'ionisation. Cet impact génère des charges au niveau des molécules suite à la perte d'un électron et provoque également la fragmentation des molécules en ions de plus petite taille. Ces ions sont alors transmis vers un détecteur de masse de type quadrupôle. Ce dispositif permet la séparation des ions obtenus dans un champ électrique oscillant. Seuls les ions avec un rapport masse/charge ( $m/z$ ) précis sont alors transmis vers une chambre de détection. Dans notre cas, le détecteur de masse était calibré afin de ne sélectionner que des ions précis (mode SIM pour Selected Ion Monitoring). Cette méthode est plus sensible mais ne peut s'appliquer que si l'on connaît *a priori* les ions étudiés.

Pour un ion de masse  $m/z$ , le spectre de masse génère un ensemble de pics constituant le massif isotopique (un exemple avec l'alanine est illustré à la figure M3). L'analyse de ce massif isotopique permet, dans le cadre d'expériences de marquage au  $^{13}\text{C}$ , d'analyser le marquage de la molécule en termes de nombre d'isotopes incorporés. Il est ainsi possible de distinguer les différentes « formes de marquage » (molécule ayant incorporé un isotope, deux isotopes, etc.) indépendamment de la position des isotopes. Il est également possible de déterminer l'abondance relative de chaque forme marquée. Ces « formes de marquage » sont des isotopomères de masse et une forme est dénommée « fraction isotopique ». L'ensemble des fractions isotopiques d'un acide aminé constituent le profil de marquage isotopique global de celui-ci.

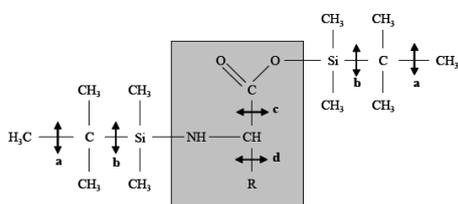


**Figure M3. Massif isotopique de l'alanine.** Les cercles blancs représentent des  $^{12}\text{C}$  tandis que les noirs indiquent un  $^{13}\text{C}$ .

## B. Caractéristiques techniques générales des analyses GC/MS

Chromatographie en phase gazeuse	Spectromètre de masse quadrupôle
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonne capillaire HP5MS (5% phényl-méthyl-siloxane diphénylsiloxane, 30m x 0,25 mm)</li> <li>- Injection de 0,1µl d'échantillon dans un flux de gaz vecteur (hélium) fixé à 1,5 ml/min (chambre d'injection à 300°C)</li> <li>- Augmentation progressive de température (4°C/min) jusqu'à 270°C pour séparer les acides aminés (après élimination préalable des composés volatiles à 120°C)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Impact électronique (EI) à 70 eV au niveau de la source du spectromètre.</li> <li>- Mode de détection d'ions sélectionnés (SIM)</li> <li>- Suite à l'EI, un acide aminé peut générer plusieurs types de fragments différents. Les fragments considérés dans ce travail sont les fragments [M-57]<sup>+</sup> car ils contiennent l'ensemble des carbones de l'acide aminé (les différents fragments existants et ceux ayant été considérés sont illustrés à la Fig. M4 et la table 3 respectivement).</li> </ul>

**Fig. M4. Fragments les plus abondants des dérivés TBDMS.** L'acide aminé avec sa chaîne R spécifique est grisé. En fonction du site de cassure, les fragments générés sont : a = [M-15]<sup>+</sup>, b = [M-57]<sup>+</sup>, c = [M-159]<sup>+</sup> et d = [f302]<sup>+</sup>.



**Table 3: Ions sélectionnés pour analyse de marquage par GC/MS**

TBDMS-acide aminé	Fragments	Masses sélectionnées (m/z)
Ala	[M-57] <sup>+</sup>	260, 261, 262, 263
Val	[M-57] <sup>+</sup>	288, 289, 290, 291, 292, 293
Ser	[M-57] <sup>+</sup>	390, 391, 392, 393
Thr	[M-57] <sup>+</sup>	404, 405, 406, 407, 408
Phe	[M-57] <sup>+</sup>	336, 337, 338, 339, 340, 342, 342, 343, 344, 345
Asp	[M-57] <sup>+</sup>	418, 419, 420, 421, 422
Glu	[M-57] <sup>+</sup>	432, 433, 434, 435, 436, 437
Tyr	[M-57] <sup>+</sup>	466, 467, 468, 469, 470, 471, 471, 473, 474, 475

## C. Traitement des résultats

### Valeurs d'excédent de marquage isotopique (VEM)

Ces valeurs représentent le marquage global d'un acide aminé et ne prennent en compte que les fractions d'acides aminés ayant incorporé un minimum de deux isotopes stables. Les valeurs d'excédent de marquage, ou VEM, sont donc calculés selon l'équation suivante :  $[2*(M+2) + 3*(M+3) + \dots n*(M+n)]/n$ . M+n représente l'abondance relative de la fraction isotopique comprenant n <sup>13</sup>C.

Le taux de contamination peut être estimé par comparaison des VEM entre les fractions cellulaire et bactérienne. Selon nos résultats, ces comparaisons indiquent un taux inférieur à 10%.

### Indices d'origine des acides aminés (IOAA)

Certaines fractions isotopiques renseignent sur l'origine métabolique du précurseur de l'acide aminé. Ainsi, les rapports de ces fractions informatives permettent de déterminer la contribution d'une voie par rapport à une autre. Les fractions considérées sont : l'alanine M+3 (EMP) et M+2 (PP), la sérine M+3 (EMP) et M+2 (PP), l'aspartate M+3 (voie anaplérotique de carboxylation du pyruvate) et M+2 (TCA) tandis que celles considérées pour le glutamate sont les M+4 (voie anaplérotique de carboxylation du pyruvate et TCA) et M+2 (TCA). Les indices d'origines des acides aminés, ou IOAA, sont ainsi calculés par les rapports M+3/M+2 ou M+4/M+2.

Ces IOAA permettent d'autre part de déterminer si un acide aminé synthétisé *de novo* est d'origine cellulaire ou bactérienne. Si les IOAA d'un acide aminé sont similaires entre fractions bactérienne et cellulaire, cela atteste d'une origine de synthèse commune qui n'est autre que la cellule hôte. Cet acide aminé aurait donc été prélevé tel quel par la bactérie. A l'inverse, deux IOAA distincts attestent de deux origines différentes et indiquent donc qu'une synthèse *de novo* sur base d'une source carbonée marquée existe et est spécifique d'une des deux fractions, la fraction bactérienne.

## VIII. Test de croissance

### 1. Principe

La croissance d'une souche bactérienne sur un milieu défini peut être suivie au cours du temps à l'aide d'un bioscreen. Cet appareil permet de mesurer à intervalles réguliers la densité optique de 200 échantillons en parallèle. Il est ainsi possible de tester plusieurs souches et plusieurs milieux simultanément.

### 2. Méthode

Une préculture liquide de chaque souche est lancée sur milieu riche 2YT liquide est lancée au cours de la nuit (37°C). Les bactéries sont ensuite centrifugées et le culot est lavé avec du PBS. La solution obtenue est diluée afin de lancer de nouvelles précultures sur le(s) milieu(x) défini(s) testé(s) à DO<sub>600</sub> de 0,1. En fonction du milieu considéré, les précultures sont mises à incuber 1 ou 2 jours à 37°C sous agitation. Cette étape permet l'adaptation des bactéries au milieu. Les précultures sont ensuite diluées dans le milieu à tester afin d'obtenir une DO<sub>600</sub> de 0,1 de nouveau avant d'être déposée dans la plaque multipuits adaptée au bioscreen. Les tests sont réalisés en triplicats dans 200 µl. Un échantillon « blanc », ne contenant que du milieu, est réalisé pour chaque milieu testé.

## IX. Techniques relatives à la microscopie

### 1. Evaluation de l'efficacité d'infection de cellules HeLa par *B. melitensis* 16M mCherry

Nous avons utilisé une souche de *B. melitensis* 16M qui exprime constitutivement le fluorochrome mCherry afin d'évaluer la fréquence de cellules HeLa infectées et la charge bactérienne dans ces cellules. Pour ce faire, une plaque 24 puits a été préparée la veille avec des cellules HeLa à 2.10<sup>5</sup> cellules/ml. Ces cellules ont ensuite été infectées selon le protocole classique, soit durant 48h avec une MOI de 300 (protocole d'infection V). Les cellules ont ensuite été fixées au paraformaldéhyde (2%) avant observation avec le microscope à fluorescence (Nikon 80i model). La fluorescence mCherry est observée avec le filtre Texas Red (λ excitation: 465-495 nm).

### 2. Test de viabilité Live/dead

Le test de viabilité bactérienne (kit Invitrogen) également appelé test live/dead repose sur l'intégrité des membranes bactériennes. En cas de mort, la membrane est perméabilisée et permet le marquage de la bactérie en rouge tandis que les bactéries vivantes apparaissent colorées en vert. Le marquage a été réalisé sur la fraction finale de *Brucella* récoltée après infection selon le protocole adapté d'Eylert *et al.* (protocole d'infection V). Les observations ont été réalisées avec le même microscope à fluorescence (Nikon 80i) avec les filtres Texas Red filter (λ excitation: 465-495 nm) et FITC (λ excitation: 450-490 nm).

### 3. Observations de *B. abortus* 2308

Afin d'observer les souches *B. abortus* 2308 WT et *ΔptsN*, des précultures ont été lancées dans les milieux testés de sorte à être en phase exponentielle de croissance lors des observations. Pour réaliser les observations, 1 µl de culture a alors été déposé sur une couche d'agarose avant protection par une lame couvre objet.

---

# Bibliographie

---

- Akira, S., S. Uematsu, *et al.* (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
- Al Dahouk, S., V. Jubier-Maurin, *et al.* (2008). "Quantitative analysis of the intramacrophagic *Brucella suis* proteome reveals metabolic adaptation to late stage of cellular infection." Proteomics **8**(18): 3862-70.
- Arellano-Reynoso, B., N. Lapaque, *et al.* (2005). "Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival." Nat Immunol **6**(6): 618-25.
- Barabote, R. D. and M. H. Saier, Jr. (2005). "Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system." Microbiol Mol Biol Rev **69**(4): 608-34.
- Barquero-Calvo, E., E. Chaves-Olarte, *et al.* (2007). "*Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection." PLoS One **2**(7): e631.
- Batut, J., S. G. Andersson, *et al.* (2004). "The evolution of chronic infection strategies in the alpha-proteobacteria." Nat Rev Microbiol **2**(12): 933-45.
- Billard, E., J. Dornand, *et al.* (2007). "Interaction of *Brucella suis* and *Brucella abortus* rough strains with human dendritic cells." Infect Immun **75**(12): 5916-23.
- Boschiroli, M. L., V. Foulongne, *et al.* (2001). "Brucellosis: a worldwide zoonosis." Curr Opin Microbiol **4**(1): 58-64.
- Boschiroli, M. L., S. Ouahrani-Bettache, *et al.* (2002). "The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1544-9.
- Brown, G. M. (1962). "The biosynthesis of folic acid. II. Inhibition by sulfonamides." J Biol Chem **237**: 536-40.
- Brown, S. A., K. L. Palmer, *et al.* (2008). "Revisiting the host as a growth medium." Nat Rev Microbiol **6**(9): 657-66.
- Canning, P. C., J. A. Roth, *et al.* (1986). "Release of 5'-guanosine monophosphate and adenine by *Brucella abortus* and their role in the intracellular survival of the bacteria." J Infect Dis **154**(3): 464-70.
- Cardoso, P. G., G. C. Macedo, *et al.* (2006). "*Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system." Microb Cell Fact **5**: 13.
- Castaneda-Roldan, E. I., S. Ouahrani-Bettache, *et al.* (2006). "Characterization of SP41, a surface protein of *Brucella* associated with adherence and invasion of host epithelial cells." Cell Microbiol **8**(12): 1877-87.
- Chang, D. E., D. J. Smalley, *et al.* (2004). "Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(19): 7427-32.
- Collier, D. N., P. W. Hager, *et al.* (1996). "Catabolite repression control in the *Pseudomonads*." Res Microbiol **147**(6-7): 551-61.
- Comerci, D. J., M. J. Martinez-Lorenzo, *et al.* (2001). "Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole." Cell Microbiol **3**(3): 159-68.
- Conde-Alvarez, R., M. J. Grillo, *et al.* (2006). "Synthesis of phosphatidylcholine, a typical eukaryotic phospholipid, is necessary for full virulence of the intracellular bacterial parasite *Brucella abortus*." Cell Microbiol **8**(8): 1322-35.
- Corbel, M. J. (1997). "Brucellosis: an overview." Emerg Infect Dis **3**(2): 213-21.
- D. L. Nelson, M. M. C. (2005). Lehninger: Principles of biochemistry Freeman.
- David L. Nelson, M. M. C. (2005). Lehninger: Principles of biochemistry Freeman.
- Delrue, R. M., P. Lestrade, *et al.* (2004). "*Brucella* pathogenesis, genes identified from random large-scale screens." FEMS Microbiol Lett **231**(1): 1-12.

- DelVecchio, V. G., V. Kapatral, *et al.* (2002). "The genome of *Brucella melitensis*." Vet Microbiol **90**(1-4): 587-92.
- DelVecchio, V. G., V. Kapatral, *et al.* (2002). "The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 443-8.
- Deutscher, J., C. Francke, *et al.* (2006). "How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria." Microbiol Mol Biol Rev **70**(4): 939-1031.
- Dozot, M., R. A. Boigegrain, *et al.* (2006). "The stringent response mediator Rsh is required for *Brucella melitensis* and *Brucella suis* virulence, and for expression of the type IV secretion system virB." Cell Microbiol **8**(11): 1791-802.
- Dozot M., P. S., Copin R., Danese Isabelle, Mazé A., Depiereux E., Deutscher J., Letesson J.J., De Bolle X. "Unpublished data."
- Eisenreich, W., J. Slaghuis, *et al.* (2006). "<sup>13</sup>C isotopologue perturbation studies of *Listeria monocytogenes* carbon metabolism and its modulation by the virulence regulator PrfA." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(7): 2040-5.
- Eisenschenk, F. C., J. J. Houle, *et al.* (1999). "Mechanism of serum resistance among *Brucella abortus* isolates." Vet Microbiol **68**(3-4): 235-44.
- Essenberg, R. C., R. Seshadri, *et al.* (2002). "Sugar metabolism by *Brucellae*." Vet Microbiol **90**(1-4): 249-61.
- Exley, R. M., J. Shaw, *et al.* (2005). "Available carbon source influences the resistance of *Neisseria meningitidis* against complement." J Exp Med **201**(10): 1637-45.
- Eylert, E., J. Schar, *et al.* (2008). "Carbon metabolism of *Listeria monocytogenes* growing inside macrophages." Mol Microbiol **69**(4): 1008-17.
- Fronzes, R., P. J. Christie, *et al.* (2009). "The structural biology of type IV secretion systems." Nat Rev Microbiol **7**(10): 703-14.
- Goering, R. V., R. M. Shawar, *et al.* (2008). "Molecular epidemiology of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from global clinical trials." J Clin Microbiol **46**(9): 2842-7.
- Gorvel, J. P. (2008). "Brucella: a Mr "Hide" converted into Dr Jekyll." Microbes Infect **10**(9): 1010-3.
- Gorvel, J. P. and E. Moreno (2002). "Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication." Vet Microbiol **90**(1-4): 281-97.
- Gutknecht, R., R. Beutler, *et al.* (2001). "The dihydroxyacetone kinase of *Escherichia coli* utilizes a phosphoprotein instead of ATP as phosphoryl donor." Embo J **20**(10): 2480-6.
- Guzman-Verri, C., E. Chaves-Olarte, *et al.* (2001). "GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes: direct activation of Cdc42." J Biol Chem **276**(48): 44435-43.
- Halling, S. M., B. D. Peterson-Burch, *et al.* (2005). "Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*." J Bacteriol **187**(8): 2715-26.
- Hawkey, P. M. and A. M. Jones (2009). "The changing epidemiology of resistance." J Antimicrob Chemother **64** Suppl 1: i3-10.
- Hong, P. C., R. M. Tsolis, *et al.* (2000). "Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice." Infect Immun **68**(7): 4102-7.
- Jacob, J., G. M. Hort, *et al.* (2006). "In vitro and in vivo characterization of smooth small colony variants of *Brucella abortus* S19." Microbes Infect **8**(2): 363-71.

- Karniol, B. and R. D. Vierstra (2004). "The HWE histidine kinases, a new family of bacterial two-component sensor kinases with potentially diverse roles in environmental signaling." J Bacteriol **186**(2): 445-53.
- Kruger, S., S. Gertz, *et al.* (1996). "Transcriptional analysis of bglPH expression in *Bacillus subtilis*: evidence for two distinct pathways mediating carbon catabolite repression." J Bacteriol **178**(9): 2637-44.
- Lamontagne, J., H. Butler, *et al.* (2007). "Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*." J Proteome Res **6**(4): 1519-29.
- Lamontagne, J., A. Forest, *et al.* (2009). "Intracellular Adaptation of *Brucella abortus*." J Proteome Res.
- Lesley, J. A. and L. Shapiro (2008). "SpoT regulates DnaA stability and initiation of DNA replication in carbon-starved *Caulobacter crescentus*." J Bacteriol **190**(20): 6867-80.
- Lestrade, P., R. M. Delrue, *et al.* (2000). "Identification and characterization of in vivo attenuated mutants of *Brucella melitensis*." Mol Microbiol **38**(3): 543-51.
- Lestrade, P., A. Dricot, *et al.* (2003). "Attenuated signature-tagged mutagenesis mutants of *Brucella melitensis* identified during the acute phase of infection in mice." Infect Immun **71**(12): 7053-60.
- Letesson, J. J., P. Lestrade, *et al.* (2002). "Fun stories about *Brucella*: the "furtive nasty bug"." Vet Microbiol **90**(1-4): 317-28.
- Levy, S. B. and B. Marshall (2004). "Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses." Nat Med **10**(12 Suppl): S122-9.
- Mantur, B. G., S. K. Amarnath, *et al.* (2007). "Review of clinical and laboratory features of human brucellosis." Indian J Med Microbiol **25**(3): 188-202.
- Mao, X. J., Y. X. Huo, *et al.* (2007). "Interplay between CRP-cAMP and PII-Ntr systems forms novel regulatory network between carbon metabolism and nitrogen assimilation in *Escherichia coli*." Nucleic Acids Res **35**(5): 1432-40.
- Masters, J. R. (2002). "HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly." Nat Rev Cancer **2**(4): 315-9.
- Mertins, S., B. Joseph, *et al.* (2007). "Interference of components of the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system with the central virulence gene regulator PrfA of *Listeria monocytogenes*." J Bacteriol **189**(2): 473-90.
- Moreno, E., A. Cloeckert, *et al.* (2002). "*Brucella* evolution and taxonomy." Vet Microbiol **90**(1-4): 209-27.
- Moreno, E. M., I. (2006). "The Genus *Brucellae*." The Prokaryotes, Springer-Verlag, New York **5**: 315-456.
- Munoz-Elias, E. J. and J. D. McKinney (2006). "Carbon metabolism of intracellular bacteria." Cell Microbiol **8**(1): 10-22.
- Naroeni, A. and F. Porte (2002). "Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages." Infect Immun **70**(3): 1640-4.
- Pappas, G., P. Papadimitriou, *et al.* (2006). The new global map of human brucellosis. Lancet Infect Dis. **6**: 91-9.
- Paulsen, I. T., R. Seshadri, *et al.* (2002). "The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 13148-53.
- Pinedo, C. A., R. M. Bringhurst, *et al.* (2008). "*Sinorhizobium meliloti* mutants lacking phosphotransferase system enzyme HPr or EIIA are altered in diverse processes, including carbon metabolism, cobalt requirements, and succinoglycan production." J Bacteriol **190**(8): 2947-56.

- Pinedo, C. A. and D. J. Gage (2009). "HPrK regulates succinate-mediated catabolite repression in the gram-negative symbiont *Sinorhizobium meliloti*." J Bacteriol **191**(1): 298-309.
- Pizarro-Cerda, J., S. Meresse, *et al.* (1998). "Brucella abortus transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes." Infect Immun **66**(12): 5711-24.
- Poncet, S., E. Milohanic, A. Mazé, J. Nait Abdallah, F. Aké, M. Larribe, A.E. Deghmane, M.K. Taha, M. Dozot, X. de Bolle, J.J. Letesson, J. Deutscher (2009). "Correlations between Carbon Metabolism and Virulence in Bacteria." Contrib Microbiol. Basel **16**( ): pp1-15.
- Porte, F., A. Naroeni, *et al.* (2003). "Role of the Brucella suis lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages." Infect Immun **71**(3): 1481-90.
- Powell, B. S., D. L. Court, *et al.* (1995). "Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the rpoN operon of Escherichia coli. Enzyme I<sub>Ntr</sub> affects growth on organic nitrogen and the conditional lethality of an erats mutant." J Biol Chem **270**(9): 4822-39.
- Rabus, R., J. Reizer, *et al.* (1999). "Enzyme I(Ntr) from Escherichia coli. A novel enzyme of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system exhibiting strict specificity for its phosphoryl acceptor, NPr." J Biol Chem **274**(37): 26185-91.
- Rasool, O., E. Freer, *et al.* (1992). "Effect of Brucella abortus lipopolysaccharide on oxidative metabolism and lysozyme release by human neutrophils." Infect Immun **60**(4): 1699-702.
- Reizer, J., C. Hoischen, *et al.* (1998). "A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria." Mol Microbiol **27**(6): 1157-69.
- Reizer, J., A. Reizer, *et al.* (1996). "Novel phosphotransferase-encoding genes revealed by analysis of the Escherichia coli genome: a chimeric gene encoding an Enzyme I homologue that possesses a putative sensory transduction domain." Gene **181**(1-2): 103-8.
- Robertson, D. C. and W. G. McCullough (1968). "The glucose catabolism of the genus Brucella. II. Cell-free studies with B. abortus (S-19)." Arch Biochem Biophys **127**(1): 445-56.
- Saier, M. H., Jr., S. Chauvaux, *et al.* (1996). "Catabolite repression and inducer control in Gram-positive bacteria." Microbiology **142** ( Pt 2): 217-30.
- Salcedo, S. P., M. I. Marchesini, *et al.* (2008). "Brucella control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1." PLoS Pathog **4**(2): e21.
- Shaikh, A. S., Y. J. Tang, *et al.* (2008). "Isotopomer distributions in amino acids from a highly expressed protein as a proxy for those from total protein." Anal Chem **80**(3): 886-90.
- Sola-Landa, A., J. Pizarro-Cerda, *et al.* (1998). "A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in Brucella abortus and controls cell invasion and virulence." Mol Microbiol **29**(1): 125-38.
- Sperry, J. F. and D. C. Robertson (1975). "Erythritol catabolism by Brucella abortus." J Bacteriol **121**(2): 619-30.
- Starr, T., T. W. Ng, *et al.* (2008). "Brucella intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment." Traffic **9**(5): 678-94.
- Stulke, J. (2007). "Regulation of virulence in Bacillus anthracis: the phosphotransferase system transmits the signals." Mol Microbiol **63**(3): 626-8.

- Stulke, J. and W. Hillen (1999). "Carbon catabolite repression in bacteria." Curr Opin Microbiol **2**(2): 195-201.
- Tumurkhuu, G., N. Koide, *et al.* (2006). "Characterization of biological activities of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide." Microbiol Immunol **50**(6): 421-7.
- Viana, R., V. Monedero, *et al.* (2000). "Enzyme I and HPr from *Lactobacillus casei*: their role in sugar transport, carbon catabolite repression and inducer exclusion." Mol Microbiol **36**(3): 570-84.
- Walsh, C. (2003). "Where will new antibiotics come from?" Nat Rev Microbiol **1**(1): 65-70.
- Wang, J. D. and P. A. Levin (2009). "Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle." Nat Rev Microbiol **7**(11): 822-7.
- Wu, Q., J. Pei, *et al.* (2006). "Mariner mutagenesis of *Brucella melitensis* reveals genes with previously uncharacterized roles in virulence and survival." BMC Microbiol **6**: 102.

---

# Annexe

---

Annexe 1. Recensement des mutations atténuantes identifiées chez *B. melitensis* 16M qui sont liées directement au métabolisme (adapté de Delrue, Lestrade *et al.* 2004).

Functional group	Gene	Putative or assessed function	<i>B. mel.</i> ORF	<i>B. suis</i> ORF	Models	
<b>a.a.metabolism</b>						
Synthesis	<i>lysA</i>	Lys. synthesis	BMEI0084	BR1983	Macrophages	
	<i>leuC</i>	Val., Leu. synthesis	BMEI0157	BR1906	Macrophages	
	<i>leuA</i>	Leu. synthesis	BMEI0451	BR1566	Macrophages	
	<i>carAB</i>	Glut. And pyr. synthesis	BMEI0526	BR1483	Macrophages	
	<i>serB</i>	Ser. synthesis	BMEI0615	BR1391	Macrophages	
	<i>ilvI*</i>	Val, Leu., Isoleu. synthesis	BMEI0617	BR1389	Macrophages, HeLa	
	<i>ilvC</i>	Val, Leu., Isoleu. synthesis	BMEI0624	BR1380	Mice, Macrophages, HeLa	
	<i>thrA</i>	Lys. synthesis	BMEI0725	BR1274	Macrophages	
	<i>cysK</i>	Cys. synthesis	BMEI0933	BR1053	Mice, Macrophages, HeLa	
	<i>thrC</i>	Thre. synthesis	BMEI1450	BR0484	Macrophages	
	<i>aroC</i>	Try. And Ubiquinone synth.	BMEI1506	BR0428	Mice, Macrophages	
	<i>hisD*</i>	His. synthesis	BMEI1668	BR0252	Macrophages, HeLa	
	<i>metH</i>	Met. synthesis	BMEI1759	BR0188	Mice, Macrophages, HeLa	
	<i>ilvD</i>	Val., Leu., Isoleu. synthesis	BMEI1848	BR0099	Macrophages	
	<i>hisF*</i>	His. synthesis	BMEI2041	BR02085	Macrophages, HeLa	
	<i>glt1</i>	Glut. sunthesis	BMEI0039	BRA0055	Mice	
	<i>gltD*</i>	Glut. sunthesis	BMEI0040	BRA0054	Macrophages, HeLa	
	Degradation	<i>glyA</i>	Lys. Degradation	BMEI1192	BR0765	Macrophages
		<i>xfp</i>	Ser. synthesis Lys. Degradation	BMEI0881	BRA0385	Mice, Macrophages, HeLa
	Transport	<i>livH</i>	Branched aa transport system	BMEI0258	BR1791	DFI
<i>dppA</i>		Dipeptide uptake	BMEI0433	BRA1012	Mice, Macrophages, HeLa	
<i>arl1</i>		Arginine transport system	BMEI1104	BR0955	DFI	
<i>bacA</i>		Peptide transport ?	BMEI1553	BR0372	Mice, Macrophages	
Unknown	<i>aspC</i>	Aminotransferase	BMEI0516	BR1495	HeLa, macrophage	
	<i>aspB</i>	Aminotransferase	BMEI0626	BR1378	Macrophages	
<b>Sugar metabolism</b>						
Catabolism	<i>pyc*</i>	Pyruvate carboxylase	BMEI0266	BR1781	Macrophages, HeLa	
	<i>gloA</i>	Lactoylglutathione lyase (pyruvate metabolism)	BMEI0730	BR1268	DFI	
	<i>cbbe*</i>	Ribulose-phosphate 3-epimerase	BMEI1116	BR0850	Macrophages, HeLa	
	<i>galE*</i>	UDP-glucose 4-epimerase	BMEI1237	BR0715	Macrophages, HeLa	
	<i>pgi</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	BMEI1636	BR0285	Macrophages, HeLa	
	<i>rbsK</i>	Ribokinase	BMEI0089	BRA0005	Macrophages	
	<i>eryC</i>	Erythritol metabolism	BMEI0428	BRA0866	Macrophages, Mice	
	<i>eryB</i>	Erythritol metabolism	BMEI0429	BRA0865	Macrophages	
	<i>galcD</i>	D-galactarate dehydratase	BMEI0485	BRA0806	Mice, Macrophages, HeLa	
	<i>zwf</i>	Glucose-6-P dehydrogenase	BMEI0513	BRA0778	Macrophages, HeLa	
	<i>mocC</i>	Rhizopine/inositol catabolism	BMEI0570	BRA0715	DFI, Mice, Macrophages, HeLa	
	<i>glpK</i>	Glycerol Kinase	BMEI0823	BRA0443	Mice, Macrophages, HeLa	
	<i>gnd</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase	BMEI1124	BRA0111	Macrophages, HeLa, Mice	
	<i>mosA</i>	Inosamine methylase	BMEI1301	BR0646	Mice, Macrophages, HeLa	
	<i>ndvB</i>	Synthesis of cyclic $\beta$ -(1,2)-glucan	BMEI1837	BR0111	Mice, HeLa	
	<i>gtrB</i>	glycosyl transferase	BMEI1101	BRA0135	Macrophages	

**Annexe 1 suite. Recensement des mutations atténuantes identifiées chez *B. melitensis* 16M qui sont liées directement au métabolisme (adapté de Delrue, Lestrade *et al.* 2004).**

<b>DNA/RNA metabolism</b>	Transport	<i>mosC</i>	Rhizopine transport	BMEI0267	BR1780 <sup>a</sup>	Mice, <b>Macrophages</b> , HeLa	
		<i>malK*</i>	Maltose transport	BMEI1713	BR0238	<b>Macrophages</b> , HeLa	
		<i>exsA</i>	ABC transporter	BMEI1742	BR0442	Mice	
		<i>dbaA*</i>	Ribose transport	BMEI0300	BRA0995	HeLa	
		<i>araG (gguA)</i>	L-arabinose transport	BMEI0361	BRA0936	DFI, <b>Macrophages</b>	
		<i>ugpA</i>	Sn-glycerol transport	BMEI0591	BRA0692	Mice, <b>Macrophages</b> , HeLa	
		<i>ugpA</i>	Sn-glycerol transport	BMEI0624	BRA0656	DFI, <b>Macrophages</b> , HeLa	
		<i>gluP</i>	glucose/galactose transport	BMEI1053	BRA0190 <sup>b</sup>	Mice	
		Synthesis	<i>hpt</i>	Purines synthesis	BMEI0082	BR1985	<b>Macrophages</b> , HeLa
	<i>purE</i>		Purines synthesis	BMEI0296	BR1744	Mice	
	<i>dut</i>		Pyrimidine synthesis	BMEI0358	BR1675	<b>Macrophages</b>	
	<i>pth</i>		Peptidyl-t-RNA hydrolase	BMEI0480	BR1536	<b>Macrophages</b> , HeLa	
	<i>miaA</i>		tRNA synthesis	BMEI0616	BR1390	<b>Macrophages</b>	
	<i>purL</i>		Purines synthesis	BMEI1127	BR0837	<b>Macrophages</b> , HeLa	
	<i>purM</i>		Purines synthesis	BMEI1240	BR0710	<b>Macrophages</b> , HeLa	
	<i>purN</i>		Purines synthesis	BMEI1241	BR0709	<b>Macrophages</b> , HeLa, mice	
	<i>pyrC</i>		dihydroorotase	BMEI1281	BR0668	<b>Macrophages</b> , HeLa, mice	
	<i>purF</i>		Purines synthesis	BMEI1488	BR0446	<b>Macrophages</b>	
	<i>purD</i>		Purines synthesis	BMEI1519	BR0414	<b>Macrophages</b>	
	<i>pyrD</i>		Pyrimidines synthesis	BMEI1611	BR0311	<b>Macrophages</b>	
	<i>pyrC</i>		dihydroorotase	BMEI0669	BRA0600	<b>Macrophages</b> , HeLa	
	<i>pyrB</i>		Pyrimidines synthesis	BMEI0670	BRA0599	<b>Macrophages</b>	
	<i>ndrI*</i>		Ribonucleotide reductase	BMEI0931	BRA0315	DFI, <b>Macrophages</b> , HeLa	
	<i>ndrH*</i>		Ribonucleotide reductase	BMEI0932	BRA0314	<b>Macrophages</b> , HeLa, mice	
Catabolism	<i>xseA</i>		Exodeoxyribonuclease	BMEI0527	BRA0764	Mice, <b>Macrophages</b> , HeLa	
	Repair		<i>xerD</i>	Site-specific recombinase	BMEI0040	BR2031	DFI
			<i>alkA</i>	HhH-GPD superfamily base excision DNA repair	BMEI0382	BR1646	Mice, <b>Macrophages</b> , HeLa
			<i>recA</i>	Recombinase A	BMEI0787	BR1202	Mice
		<i>rpsA</i>	Ribosomal protein S1	BMEI1915	BR0027	<b>Macrophages</b>	
		<i>mutM</i>	Recovery from mutagenesis by alkylating agents	BMEI1946	BR2183	DFI	
	<i>aidB</i>	protection against alkylation damage to DNA	BMEI0671	BRA0598	<b>Macrophages</b>		
	Regulation	<i>mgps</i>	RNA helicase family	BMEI0275	BR1770 <sup>a</sup>	Mice, <b>Macrophages</b> , HeLa	
		<i>rpoA</i>	RNA polymerase $\alpha$ -subunit	BMEI0781	BR1209	Mice, <b>Macrophages</b> , HeLa	
		<i>glnA (aa met.)</i>	Glutamine synthase	BMEI0979	BR1004	<b>Macrophages</b>	
<i>nifS (aa met.)</i>		nitrogenase cofactor synthesis protein nifS	BMEI1043	BR0930	<b>Macrophages</b>		
<i>glnD</i>		glnB regulatory protein	BMEI1804	BR0144	<b>Macrophages</b> , HeLa		
<b>Nitrogen metabolism</b>							

Annexe 2. Protéines différenciellement produites par *B. abortus* 2308 en cours d'infection (Lamontagne, Forest et al. 2009).

Locus tag	Functional group	Protein acronym	Locus tag	Functional group	Protein acronym
BAB1_1922	Central carbon metab	SucB	BAB1_1923	Central carbon metab	SucA
BAB1_1763	Central carbon metab	Fgase	BAB1_0545	Central carbon metab	Gmd
BAB1_0128	Central carbon metab	Adh-III	BAB1_1155	Central carbon metab	Eno
BAB1_1740	Central carbon metab	Tkt	BAB1_1925	Central carbon metab	SucD
BAB1_1927	Central carbon metab	MDH	BAB2_0377	Central carbon metab	RbsB
BAB2_0694	Central carbon metab	GnlE	BAB1_1149	Central carbon metab	LpdA-1
BAB1_0090	Central carbon metab	AcoA	BAB1_1150	Central carbon metab	Ace
BAB1_0248	Central carbon metab	Gdh	BAB2_0938	Central carbon metab	Xyl
BAB1_0980	Central carbon metab	Omp2b	BAB2_0547	Central carbon metab	P39
BAB1_1827	Central carbon metab	NAD-Gdh	BAB1_0247	Central carbon metab	Fah-like
BAB1_1151	Central carbon metab	PdhB	BAB1_0238	Central carbon metab	Trs-ABC S
BAB1_0638	Central carbon metab	GlnE	BAB2_0294	Central carbon metab	IivD
BAB1_1808	Respiration	AlpG	BAB1_1645	PTS system	DnaK-1
BAB2_0545	Respiration	RibH	BAB1_1646	PTS system	DnaK-2
BAB1_1901	Respiration	SdhA	BAB1_1648	PTS system	RbsB/Lact
BAB1_0136	Respiration	PirA	BAB2_0559	AA catab	D-Hyd
BAB1_1807	Respiration	AlpD	BAB1_1875	Respiration	UbiG
BAB1_1558	Respiration	PutB	BAB1_0851	Protein synthesis	SSU S4
BAB1_0924	Respiration	NuoC	BAB1_1239	Protein synthesis	LSU L18
BAB1_0328	Respiration	NuoG	BAB1_1263	Protein synthesis	RpoC
BAB1_0414	Respiration	AtpF	BAB1_0917	Protein synthesis	Tig
BAB1_1898	Respiration	UbiH	BAB1_1258	Protein synthesis	FusA
BAB1_1488	Protein synthesis	RpoD	BAB1_0433	Protein synthesis	GlyS
BAB1_2105	Protein synthesis	InlB	BAB1_2163	Protein synthesis	NusA
BAB1_1183	Protein synthesis	EF-Ts	BAB1_1250	Protein synthesis	LSU L22
BAB1_1268	Protein synthesis	LSU L11p	BAB1_1252	Protein synthesis	LSU L2
BAB1_1264	Protein synthesis	RpoB	BAB1_1184	Protein synthesis	SSU S2
BAB1_1255	Protein synthesis	LSU L3	BAB1_2124	Protein synthesis	LSU L20
BAB1_1161	Protein synthesis	Fr	BAB1_2063	Protein synthesis	TrmE
BAB1_1237	Protein synthesis	LSU L30	BAB2_0888	Nucleotide metab	Nrd
BAB1_1261	Protein synthesis	SSU S10	BAB1_1063	Nucleotide metab	NrdA
BAB1_0025	Protein synthesis	SSU S1	BAB1_1397	AA synthesis	AspB
BAB1_1271 /	Protein synthesis	EF-Tu	BAB2_0515	AA synthesis	Gcvp
BAB1_1257	Protein synthesis		BAB1_1699	AA synthesis	SerC
BAB1_1246	Protein synthesis	SSU S17	BAB1_1697	AA synthesis	SerA-1
BAB1_1230	Protein synthesis	LSU L15p	BAB1_1845	Stress response	CtpA
BAB1_1259	Protein synthesis	SSU S7	BAB1_2130	Stress response	DnaJ
BAB1_0911	Protein synthesis	LSU L13	BAB1_0521	Stress response	DebA
BAB1_1254	Protein synthesis	LSU L4	BAB1_0504	Stress response	AhpC-like 1
BAB1_1238	Protein synthesis	SSU S5	BAB2_0535	Stress response	SodC
BAB1_1243	Protein synthesis	LSU L5	BAB1_2107	Stress response	Trx-1
BAB2_0889	Nucleotide metab	NrdE	BAB2_0848	Stress response	KatB
BAB1_0715	Nucleotide metab	Ndk	BAB2_0080	Stress response	Pep
BAB2_0327	AA synthesis	Aldh	BAB1_1628	Transporters	Trs-ABC
BAB1_0701	AA synthesis	LeuA-like	BAB1_1216	Transporters	spermidine/putrescine
BAB1_1616	AA synthesis	Dgt	BAB1_1351	Transporters	BCSP31
BAB2_1125	AA synthesis	N-Trans II-like	BAB1_0214	Transporters	Trs-ABC
BAB2_2069	AA synthesis	AhcY			sulfate binding
BAB1_1369	AA synthesis	Iivc	BAB2_0023	Transporters	Trs-ABC
BAB1_2150	Stress response	Dps	BAB2_0493	Transporters	sulfonate/nitrate
BAB1_0962	Stress response	SAMbm	BAB2_0703	Transporters	Trs-ABC branched
BAB2_0531	Stress response	AhpC-like-2	BAB2_1011	Transporters	amino acid
BAB2_0189	Stress response	GroEL	BAB2_0321	Transporters	UgpC
BAB1_1532	Stress response	CspA	BAB2_0539	Iron metabolism	Trs-ABC ATP binding
BAB1_0449	Stress response	CspB	BAB2_0013	Iron metabolism	Trs-ABC ATP binding
BAB2_0690	Transporters	Trs-ABC oligopeptide	BAB1_1176	LPS synthesis	AcrB-like
BAB2_0700	Transporters	AgpA	BAB1_0055	LPS synthesis	FbpA
BAB1_1685	Transporters	HlyD-like	BAB2_0371	Lipid metabolism	DhbB
BAB1_1226	Transporters	OmpA	BAB1_0925	Lipid metabolism	Omp1
BAB2_0262	Transporters	Trs-ABC branched amino acid	BAB1_1109	Lipid metabolism	Pgm
BAB2_1055	Transporters	Trs-ABC peptide nickel	BAB1_1707	Omp	GDPH
BAB1_1214	Transporters	DetC-like	BAB1_0942	Omp	BocP
BAB1_1792	Transporters	BraF/BraG	BAB1_0046	Omp	GCDH
BAB1_0051	Transporters	DUF461	BAB2_0883	Cell division	Omp16
BAB1_1794	Transporters	BraF/BraG	BAB1_0490	Cell division	Omp90
BAB2_0940	Iron metabolism	Tp4-like	BAB1_2092	Regulation	Omp160K
BAB1_1679	Iron metabolism	ExbB	BAB1_0466	Unknown	MinD
BAB2_0075	Iron metabolism	Bfr	BAB2_0839	Unknown	TidD
BAB1_1367	Iron metabolism	TenB-CyrA type	BAB1_1729	Unknown	BvrR
BAB2_0564	Iron metabolism	FatB	BAB1_1029	Unknown	Conserved
BAB2_1150	Iron metabolism	BhuA	BAB2_0163	Unknown	Conserved
BAB2_0233	Iron metabolism	Ten B, Flz-like			Conserved
BAB2_0505	LPS synthesis	BA14 lectin like			Conserved
BAB1_0483	Lipid metabolism	FabG			Conserved
BAB1_0486	Lipid metabolism	FabF			Conserved
BAB1_2185	Lipid metabolism	Ech			Conserved
BAB1_2174	Lipid metabolism	FabA			Unknown
BAB2_0975	Lipid metabolism	FabC			
BAB2_1908	Cell division	MepA			
BAB1_1530	Cell division	UvrB			
BAB2_0475	Cell division	XeeA			
BAB1_0640	Cell division	PicC			
BAB1_0075	Unknown	Conserved			
BAB1_1612	Unknown	Conserved			
BAB1_0863	Unknown	Conserved			
BAB1_0771	Unknown	Conserved			
BAB2_0071	Unknown	Conserved			
BAB1_1830	Unknown	LamA			
BAB1_0729	Unknown	Conserved			
BAB1_1884	Unknown	Conserved			
BAB1_1419	Unknown	Conserved			

**Annexe 3. Abondances relative des fractions isotopiques de chaque acide aminé analysé.** Le profil de marquage est représenté en groupes de X-Y. Cette annotation illustre le marquage des carbones. Le premier symbole correspond au premier carbone. Le chiffre 1 représente un  $^{13}\text{C}$ , le chiffre 0 représente un  $^{12}\text{C}$ , X et Y représente soit un  $^{12}\text{C}$ , soit un  $^{13}\text{C}$ . Alors que le statut de X est inconnu, le nombre d'isotopes incorporé est connu pour Y et est annoté hors de l'accolade.

### Expérience 1

		<b>Expérience 1</b>	
		Protéine de macrophages non infectés	
	XY-Group		
Ala-260	{000}	0,90510403	± 0,00000877
	{YYY}1	0,03052854	± 0,00011867
	{YYY}2	0,00253859	± 0,000118135
	{111}	0,06182884	± 0,000117741
Arg-442	{00000}	0,92053377	± 0,00006
	{YYYYYY}1	0,05645127	± 0,0010396
	{YYYYYY}2	0,00448078	± 0,001024962
	{YYYYYY}3	0,00503473	± 0,001024979
	{YYYYYY}4	0,00689514	± 0,001025107
	{YYYYYY}5	0,00352386	± 0,001025109
	{111111}	0,00308045	± 0,001025099
Asp-418	{0000}	0,9264451	± 0,00004
	{YYYY}1	0,04657846	± 0,000787785
	{YYYY}2	0,02052699	± 0,000779475
	{YYYY}3	0,00550915	± 0,000778902
	{1111}	0,00094029	± 0,00077903
Glu-432	{00000}	0,91962434	± 0,00003
	{YYYYY}1	0,05235576	± 0,000485703
	{YYYYY}2	0,02263431	± 0,00047996
	{YYYYY}3	0,00294399	± 0,000479543
	{YYYYY}4	0,00193831	± 0,000479579
	{11111}	0,00050329	± 0,000479579
Gly-246	{00}	0,95866363	± 0,00001
	{YY}1	0,02292039	± 0,000290704
	{11}	0,01841598	± 0,000290035
His-440	{000000}	0,87013886	± 0,00025
	{YYYYYY}1	0,07554752	± 0,002983154
	{YYYYYY}2	0,01687078	± 0,00292963
	{YYYYYY}3	0,01070306	± 0,002925305
	{YYYYYY}4	0,0084389	± 0,002926407
	{YYYYYY}5	0,00952675	± 0,002926428
	{111111}	0,00877413	± 0,002926483

Ile-200	{X00000}	0,93536627	±	0,00001
	{XYYYYY}1	0,04996005	±	0,000130679
	{XYYYYY}2	0,01068974	±	0,000130101
	{XYYYYY}3	0,00211061	±	0,000130065
	{XYYYYY}4	0,00099041	±	0,000130066
	{X11111}	0,00088291	±	0,000130066
Leu-200	{X00000}	0,91940543	±	0,00001
	{XYYYYY}1	0,04966347	±	0,000139056
	{XYYYYY}2	0,02696056	±	0,000138444
	{XYYYYY}3	0,00216743	±	0,000138383
	{XYYYYY}4	0,00143678	±	0,000138383
	{X11111}	0,00036632	±	0,000138384
Lys-431	{000000}	0,90183743	±	0,000118019
	{YYYYYY}1	0,06439942	±	0,001687057
	{YYYYYY}2	0,00821672	±	0,001660201
	{YYYYYY}3	0,00645099	±	0,001659747
	{YYYYYY}4	0,00672833	±	0,001660026
	{YYYYYY}5	0,00627134	±	0,001660032
	{111111}	0,00609576	±	0,001660065
Met-320	{00000}	0,9335087	±	0,00004
	{YYYYY}1	0,05035397	±	0,00077341
	{YYYYY}2	0,00197558	±	0,000769831
	{YYYYY}3	0,00347397	±	0,000769863
	{YYYYY}4	0,00635422	±	0,000769884
	{11111}	0,00433356	±	0,000769923
Phe-336	{000000000}	0,89338661	±	0,00004
	{YYYYYYYYY}1	0,0878631	±	0,000438806
	{YYYYYYYYY}2	0,00346222	±	0,000433718
	{YYYYYYYYY}3	0,00153457	±	0,000433678
	{YYYYYYYYY}4	0,0018732	±	0,000433657
	{YYYYYYYYY}5	0,00345684	±	0,000433676
	{YYYYYYYYY}6	0,00227534	±	0,000433664
	{YYYYYYYYY}7	0,00223843	±	0,000433669
	{YYYYYYYYY}8	0,00200398	±	0,000433668
{111111111}	0,00190571	±	0,00043367	
Pro-286	-			
Ser-390	{000}	0,93139094	±	0,00004

	{YYY}1	0,03606981	±	0,000868007
	{YYY}2	0,00454235	±	0,000860547
	{111}	0,0279969	±	0,000859583
Thr-404	{0000}	0,96041247	±	0,00002
	{YYYY}1	0,03883407	±	0,000506807
	{YYYY}2	0,00000	±	0,000502322
	{YYYY}3	0,00000	±	0,00050242
	{1111}	0,00075346	±	0,000502401
Tyr-466	{000000000}	0,90033585	±	0,000130972
	{YYYYYYYYY}1	0,08383378	±	0,00140848
	{YYYYYYYYY}2	0,0008769	±	0,00138149
	{YYYYYYYYY}3	0,0011341	±	0,001382048
	{YYYYYYYYY}4	0,00251363	±	0,001382006
	{YYYYYYYYY}5	0,00168073	±	0,001382096
	{YYYYYYYYY}6	0,00196138	±	0,001382042
	{YYYYYYYYY}7	0,00198074	±	0,001382067
	{YYYYYYYYY}8	0,00273973	±	0,001382055
	{111111111}	0,00294317	±	0,001382081
Val-288	{00000}	0,94589511	±	6,67475E-06
	{YYYYY}1	0,05123139	±	0,000123343
	{YYYYY}2	0,00022814	±	0,000122431
	{YYYYY}3	0,0007469	±	0,000122442
	{YYYYY}4	0,00104933	±	0,000122443
	{11111}	0,00084912	±	0,000122444

**Expérience 2**

		Expérience 2: cell		Expérience 2: <i>B. abo</i>	
XY-Group		Label during infection 1		Label during infection 1	
Ala-260	{000}	0,49877041	± 0,00056309	0,46052848	± 0,0002745
	{YYY}1	0,02607268	± 0,00085206	0,05703353	± 0,00040738
	{YYY}2	0,02015432	± 0,00085159	0,04653613	± 0,00040691
	{111}	0,4550026	± 0,0006165	0,43590186	± 0,00028911
Arg-442	{000000}	0,93156705	± 0,00004	0,64667748	± 0,00102314
	{YYYYYY}1	0,05110045	± 0,00073873	0,09693515	± 0,0056378
	{YYYYYY}2	0,00775269	± 0,00072945	0,07766814	± 0,00548589
	{YYYYYY}3	0,00222154	± 0,00072944	0,05473488	± 0,0054589
	{YYYYYY}4	0,00398007	± 0,00072945	0,04645686	± 0,00546705
	{YYYYYY}5	0,00201263	± 0,00072946	0,04313418	± 0,00546485
	{111111}	0,00136557	± 0,00072946	0,03439331	± 0,00546317

Asp-418	{0000}	0,75625291	±	0,00008	0,65227735	±	0,0006342
	{YYYY}1	0,06414382	±	0,00056065	0,09340332	±	0,00278756
	{YYYY}2	0,11281294	±	0,00054943	0,1467784	±	0,00269241
	{YYYY}3	0,05271496	±	0,00054849	0,07884765	±	0,00269441
	{1111}	0,01407537	±	0,00054935	0,02869328	±	0,00270205
Glu-432	{00000}	0,77349877	±	0,00002	0,66178558	±	0,00055011
	{YYYYY}1	0,05374294	±	0,00016733	0,07292797	±	0,00265957
	{YYYYY}2	0,10768531	±	0,00016442	0,14114486	±	0,00257803
	{YYYYY}3	0,02932932	±	0,0001645	0,05578156	±	0,00259196
	{YYYYY}4	0,02659184	±	0,00016449	0,04722786	±	0,0025902
	{11111}	0,00915182	±	0,0001645	0,02113217	±	0,00259043
Gly-246	{00}	0,89047084	±	0,00000	0,85530159	±	0,00001
	{YY}1	0,02662984	±	0,00003	0,05550636	±	0,00006
	{11}	0,08289932	±	0,00003	0,08919205	±	0,00006
His-440	{000000}	0,98037707	±	0,00021807	-	±	-
	{YYYYYY}1	0,00854534	±	0,01954807	-	±	-
	{YYYYYY}2	5,5653E-37	±	0,02010615	-	±	-
	{YYYYYY}3	0,00000	±	0,0195703	-	±	-
	{YYYYYY}4	0,00075434	±	0,01960879	-	±	-
	{YYYYYY}5	0,00727125	±	0,0196538	-	±	-
{111111}	0,00305201	±	0,01964368	-	±	-	
Ile-200	{X00000}	0,93464989	±	0,00002	0,87679612	±	0,00014906
	{XYYYYY}1	0,05052886	±	0,00033116	0,05774567	±	0,00207114
	{XYYYYY}2	0,01090472	±	0,00032969	0,02611303	±	0,00206097
	{XYYYYY}3	0,00218282	±	0,00032959	0,01464401	±	0,00205949
	{XYYYYY}4	0,00102493	±	0,00032959	0,01053698	±	0,00205966
	{X11111}	0,00070879	±	0,00032959	0,0141642	±	0,00205946
Leu-200	{X00000}	0,91949426	±	0,00001	0,90943912	±	0,00006
	{XYYYYY}1	0,04974372	±	0,00017659	0,05204856	±	0,00102655
	{XYYYYY}2	0,02663688	±	0,00017582	0,02541162	±	0,00102192
	{XYYYYY}3	0,00235042	±	0,00017574	0,00606606	±	0,00102138
	{XYYYYY}4	0,00142676	±	0,00017574	0,00408739	±	0,00102141
	{X11111}	0,00034795	±	0,00017574	0,00294724	±	0,00102141
Lys-431	{000000}	0,90550966	±	0,00005	-	±	-
	{YYYYYY}1	0,06547999	±	0,00065538	-	±	-
	{YYYYYY}2	0,0082501	±	0,00064498	-	±	-
	{YYYYYY}3	0,00686376	±	0,00064478	-	±	-
	{YYYYYY}4	0,00599802	±	0,00064489	-	±	-

	{YYYYYY}5	0,00424628	±	0,0006449	-	±	-
	{111111}	0,0036522	±	0,00064489	-	±	-
Met-320	{00000}	0,82647531	±	0,00017852	0,72800492	±	0,00041401
	{YYYYYY}1	0,0716477	±	0,00178039	0,08242544	±	0,00272188
	{YYYYYY}2	0,01627683	±	0,00176822	0,02939625	±	0,00270139
	{YYYYYY}3	0,01757137	±	0,00176492	0,04081566	±	0,00268989
	{YYYYYY}4	0,04450684	±	0,0017629	0,06973067	±	0,00268274
	{11111}	0,02352196	±	0,00176521	0,04962706	±	0,00268925
Phe-336	{000000000}	0,89921827	±	0,00009	0,74192251	±	0,00033933
	{YYYYYYYY}1	0,08765126	±	0,00095533	0,08510276	±	0,00264082
	{YYYYYYYY}2	0,00282597	±	0,00094421	0,02099379	±	0,00260812
	{YYYYYYYY}3	0,00173664	±	0,00094412	0,02116531	±	0,00260352
	{YYYYYYYY}4	0,0011664	±	0,00094414	0,01804237	±	0,00260472
	{YYYYYYYY}5	0,00205791	±	0,00094414	0,0336755	±	0,00260312
	{YYYYYYYY}6	0,00144681	±	0,00094414	0,0183989	±	0,00260462
	{YYYYYYYY}7	0,00143379	±	0,00094414	0,02326091	±	0,00260447
	{YYYYYYYY}8	0,00128218	±	0,00094414	0,01975729	±	0,00260451
	{111111111}	0,00118075	±	0,00094414	0,01768067	±	0,00260413
Pro-286	-						
Ser-390	{000}	0,76785167	±	0,00017639	0,6927262	±	0,00049484
	{YYY}1	0,09246041	±	0,00110467	0,10342479	±	0,00210236
	{YYY}2	0,03948596	±	0,00108137	0,05276382	±	0,00205505
	{111}	0,10020196	±	0,0010658	0,1510852	±	0,00198765
Thr-404	{0000}	0,95099969	±	0,00005	0,82508076	±	0,0001751
	{YYYY}1	0,04319575	±	0,00106212	0,0720152	±	0,00189451
	{YYYY}2	0,00231401	±	0,00105125	0,04771305	±	0,00186231
	{YYYY}3	0,0021616	±	0,00105151	0,03348897	±	0,00185597
	{1111}	0,00132896	±	0,00105157	0,02170201	±	0,00185761
Tyr-466	{000000000}	0,90121238	±	0,00012514	0,65113622	±	0,0004304
	{YYYYYYYY}1	0,08666025	±	0,00130423	0,07914628	±	0,00288535
	{YYYYYYYY}2	0,00097347	±	0,00127733	0,03461647	±	0,00282357
	{YYYYYYYY}3	0,00116015	±	0,00127795	0,03373805	±	0,00281226
	{YYYYYYYY}4	0,00216783	±	0,00127816	0,03672723	±	0,00281456
	{YYYYYYYY}5	0,00200499	±	0,00127806	0,03358884	±	0,00281539
	{YYYYYYYY}6	0,00150249	±	0,00127808	0,03117667	±	0,00281567
	{YYYYYYYY}7	0,00131137	±	0,00127807	0,03156427	±	0,00281535
	{YYYYYYYY}8	0,00134858	±	0,00127807	0,03262955	±	0,00281507
	{111111111}	0,0016585	±	0,00127807	0,03567643	±	0,00281269

Val-288	{00000}	0,92930888	±	0,00002	0,76262334	±	0,00013053
	{YYYYY}1	0,05274533	±	0,00033476	0,07210437	±	0,00105036
	{YYYYY}2	0,00540011	±	0,00033228	0,04673703	±	0,00103969
	{YYYYY}3	0,00504935	±	0,00033219	0,04606733	±	0,00103579
	{YYYYY}4	0,00276491	±	0,00033221	0,02725683	±	0,00103724
	{11111}	0,00473143	±	0,00033221	0,0452111	±	0,00103582

**Expérience 3**

XY-Group		Expérience 3: cell Macrophages prémarqués 10 jours 1			Expérience 3: <i>B. abo</i> Macrophages prémarqués 10 jours 1		
Ala-260	{000}	0,91512546	±	0,00003	0,96331107	±	0,00001
	{YYY}1	0,03072507	±	0,000407	0,02737964	±	0,0003825
	{YYY}2	0,00187879	±	0,00040518	5,1953E-25	±	0,00038126
	{111}	0,05227068	±	0,00040419	0,00930929	±	0,00038104
Arg-442	{000000}	0,8859311	±	0,00010	0,9298031	±	0,00004
	{YYYYYY}1	0,04933112	±	0,0013267	0,05856701	±	0,00067727
	{YYYYYY}2	1,1879E-25	±	0,0013115	0,00147616	±	0,00066745
	{YYYYYY}3	0,04852798	±	0,00130599	0,00204172	±	0,00066761
	{YYYYYY}4	0,00721503	±	0,0013103	0,00482153	±	0,00066766
	{YYYYYY}5	0,00602541	±	0,00131037	0,00225708	±	0,00066766
	{111111}	0,00296935	±	0,00131028	0,0010334	±	0,00066765
Asp-418	{0000}	0,93750292	±	0,00000	0,95484465	±	0,00001
	{YYYY}1	0,04141201	±	0,00000	0,04056888	±	0,00031576
	{YYYY}2	0,01316827	±	0,00000	0,00273531	±	0,00031279
	{YYYY}3	0,00620925	±	0,00000	0,00119685	±	0,00031287
	{1111}	0,00170754	±	0,00000	0,00065431	±	0,00031288
Glu-432	{00000}	0,93022839	±	0,00000	0,94585146	±	0,00004
	{YYYYY}1	0,04987275	±	0,00000	0,0481688	±	0,00074402
	{YYYYY}2	0,01339017	±	0,00000	0,00456361	±	0,00073561
	{YYYYY}3	0,00292491	±	0,00000	0,00053474	±	0,00073568
	{YYYYY}4	0,00251577	±	0,00000	0,00059188	±	0,00073571
	{11111}	0,001068	±	0,00000	0,00028951	±	0,00073571
Gly-246	{00}	0,96547291	±	0,00001	0,97557332	±	0,00000
	{YY}1	0,02167817	±	0,00031768	0,02088186	±	0,00009
	{11}	0,01284892	±	0,00031696	0,00354482	±	0,00009
His-440	{000000}	0	±	0	0,91480359	±	0,00021069
	{YYYYYY}1	0	±	0	0,06816452	±	0,00287363

	{YYYYYY}2	0	±	0	0,00432566	±	0,00282654
	{YYYYYY}3	0	±	0	0,00591648	±	0,00282638
	{YYYYYY}4	0	±	0	0,00292666	±	0,00282675
	{YYYYYY}5	0	±	0	0,00221645	±	0,0028268
	{111111}	0	±	0	0,00164663	±	0,00282681
Ile-200	{X00000}	0,88391128	±	0,00005	0,93680582	±	0,00001
	{YYYYYY}1	0,06786413	±	0,00059705	0,04867083	±	0,00028207
	{YYYYYY}2	0,03197584	±	0,00059368	0,01006448	±	0,00028085
	{YYYYYY}3	0,00989025	±	0,00059334	0,00236517	±	0,00028077
	{YYYYYY}4	0,00337666	±	0,00059336	0,00115402	±	0,00028077
	{X11111}	0,00298184	±	0,00059336	0,00093969	±	0,00028077
Leu-200	{X00000}	0,92241356	±	0,00003	0,92104665	±	0,00001
	{YYYYYY}1	0,04848616	±	0,0004554	0,04971636	±	0,00020802
	{YYYYYY}2	0,02432963	±	0,00045348	0,0255355	±	0,00020711
	{YYYYYY}3	0,0025992	±	0,00045327	0,00217793	±	0,00020701
	{YYYYYY}4	0,0014434	±	0,00045327	0,00124477	±	0,00020702
	{X11111}	0,00072805	±	0,00045327	0,00027878	±	0,00020702
Lys-431	{000000}	0,92567631	±	0,00001	0,92991589	±	0,00007
	{YYYYYY}1	0,06610533	±	0,00014837	0,06110163	±	0,00100088
	{YYYYYY}2	0,00640864	±	0,00014603	0,00066963	±	0,00098579
	{YYYYYY}3	0,00046903	±	0,00014602	0,00258228	±	0,00098615
	{YYYYYY}4	6,0176E-34	±	0,00014604	0,00173833	±	0,00098621
	{YYYYYY}5	3,4092E-35	±	0,00014605	0,00163428	±	0,00098622
	{111111}	0,00134069	±	0,00014602	0,00235794	±	0,00098621
Met-320	{00000}	0,92612592	±	0,0005219	0,94409444	±	8,8337E-05
	{YYYYYY}1	0,06802694	±	0,00707857	0,04788935	±	0,0017356
	{YYYYYY}2	8,9582E-31	±	0,00704425	6,3418E-28	±	0,00172908
	{YYYYYY}3	1,7662E-34	±	0,00710957	0,00138661	±	0,00172847
	{YYYYYY}4	3,4226E-30	±	0,00703433	0,00388136	±	0,00172856
	{11111}	0,00584714	±	0,00703118	0,00274824	±	0,00172871
Phe-336	{00000000}	0,87062598	±	0,00000	0,89985134	±	0,00008
	{YYYYYYYY}1	0,08747392	±	0,00000	0,08624645	±	0,00083018
	{YYYYYYYY}2	0,00652477	±	0,00000	0,00414318	±	0,0008206
	{YYYYYYYY}3	0,00553917	±	0,00000	0,00163182	±	0,00082041
	{YYYYYYYY}4	0,0038519	±	0,00000	0,00130449	±	0,0008204
	{YYYYYYYY}5	0,00729673	±	0,00000	0,00209917	±	0,00082042
	{YYYYYYYY}6	0,00469904	±	0,00000	0,00126624	±	0,00082041
	{YYYYYYYY}7	0,00559008	±	0,00000	0,00124531	±	0,0008204
	{YYYYYYYY}8	0,00433148	±	0,00000	0,00112128	±	0,00082041

	{111111111}	0,00406694	±	0,00000	0,00109073	±	0,00082041
Pro-286	-						
Ser-390	{000}	0,94861803	±	0,00000	0,96323988	±	0,00003
	{YYY}1	0,03552217	±	0,00000	0,03156306	±	0,00085185
	{YYY}2	0,00290118	±	0,00000	0,00063326	±	0,0008456
	{111}	0,01295862	±	0,00000	0,0045638	±	0,00084584
Thr-404	{0000}	0,95838729	±	0,00004	0,95906711	±	0,00002
	{YYYY}1	0,03913767	±	0,00100318	0,03940651	±	0,00036869
	{YYYY}2	1,7058E-28	±	0,000995	1,2168E-28	±	0,00036528
	{YYYY}3	0,00120624	±	0,00099427	0,00046202	±	0,00036541
	{1111}	0,00126881	±	0,0009945	0,00106437	±	0,00036542
Tyr-466	{000000000}	0,87248384	±	5,6141E-05	0,90636161	±	0,00003
	{YYYYYYYYY}1	0,08174794	±	0,0005868	0,08201012	±	0,00031899
	{YYYYYYYYY}2	5,894E-28	±	0,00057577	0,00184908	±	0,00031289
	{YYYYYYYYY}3	0,00597444	±	0,00057541	2,4483E-28	±	0,00031309
	{YYYYYYYYY}4	0,00259478	±	0,0005756	0,00169383	±	0,00031299
	{YYYYYYYYY}5	0,01031183	±	0,00057562	0,00115195	±	0,00031301
	{YYYYYYYYY}6	0,00200167	±	0,00057563	0,00062209	±	0,00031302
	{YYYYYYYYY}7	0,01583306	±	0,00057554	0,00402415	±	0,00031301
	{YYYYYYYYY}8	0,00333115	±	0,00057563	0,00087007	±	0,00031302
	{111111111}	0,00572127	±	0,00057562	0,0014171	±	0,00031302
Val-288	{00000}	0,93635518	±	0,00001	0,9454436	±	0,00002
	{YYYYY}1	0,05293604	±	0,0001739	0,05109196	±	0,00035187
	{YYYYY}2	0,00224689	±	0,00017258	0,0004243	±	0,00034928
	{YYYYY}3	0,00314393	±	0,00017257	0,00125313	±	0,00034929
	{YYYYY}4	0,00222414	±	0,00017258	0,00086631	±	0,0003493
	{11111}	0,00309383	±	0,00017258	0,0009207	±	0,0003493