Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Identification et caractérisation d'effecteurs putatifs de Brucella melitensis et de leurs cibles

David, Blandine

Award date:
2006

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.

Download date: 02. May. 2026

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION D'EFFECTEURS PUTATIFS DE *BRUCELLA MELITENSIS* ET DE LEURS CIBLES

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de

licencié en Sciences biologiques

Blandine DAVID
Juin 2006

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

Identification d'effecteurs putatifs de *Brucella melitensis* et de leurs cibles

DAVID Blandine

Résumé

Brucella melitensis est un pathogène intracellulaire qui se multiplie dans un compartiment dérivé du reticulum endoplasmique après un détournement de trafic vacuolaire et de la voie phago-lysosomale. À l'instar de nombreuses bactéries pathogènes, des mécanismes complexes conduisent *Brucella melitensis* à entrer dans la cellule hôte, pour en détourner les processus physiologiques dédiés à la destruction des intrus, et afin d'y établir progressivement sa niche de réplication. Ceci suggère l'action coordonnée de protéines dites effectrices qui, sécrétées dans la cellule, peuvent interagir physiquement avec des constituants cellulaires impliqués dans les processus ciblés, et en modifier la fonctionnalité. À ce jour, aucun effecteur de *Brucella* n'a pu être identifié. La présence et l'importance dans la virulence d'un appareil de sécrétion de type IV renforcent l'hypothèse selon laquelle *Brucella melitensis* injecte des effecteurs favorisant sa progression, comme chez d'autres bactéries pathogènes.
Un crible de double-hybride en levure, testant les interactions des protéines humaines du phagosome et de l'apoptose avec le protéome de *Brucella melitensis*, avait été réalisé au laboratoire, mettant en évidence des protéines bactériennes constituant des candidats effecteurs et notre base de travail.
Le but de ce mémoire est de caractériser des effecteurs putatifs de *Brucella melitensis* et leurs cibles cellulaires.
Les effecteurs putatifs ont été exprimés en levure, en fusion à la GFP. L'analyse du phénotype de croissance et de la localisation subcellulaire de ces protéines en levure a permis d'identifier deux protéines (codées par les ORFs BMEI1974 et BMEII0410) toxiques pour la levure, la seconde étant localisée en périphérie membranaire.
Le plasmide construit, le pBD01/02, possède un tag lumio fusionné en amont ou en aval d'une cassette Gateway (permettant un clonage aisé des ORFs issues de l'ORFéome de *Brucella melitensis*), qui permet de marquer la protéine étiquettée avec un réactif fluorescent.

Au cours de ce mémoire, deux approches complémentaires, qui ont conduit à identifier et caractériser deux effecteurs potentiels de Brucella melitensis, ont donc été utilisées. En outre, un vecteur réplicatif dans Brucella melitensis, permettant de visualiser la sécrétion d'une protéine bactérienne dans la cellule hôte, a été construit.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2006

Promoteur: X. De Bolle

Co-promoteur: J.-J. Letesson

Remerciements

Cette page est le seul emplacement, dans cet ouvrage, où il est permis de répéter un grand nombre de fois un mot, et encore il ne sera pas assez répété.

Premièrement je tenais à remercier les professeurs X. De Bolle, JJ. Letesson, et J. Vandenhaute pour m'avoir éveillée aux joies de la microbiologie et de la génétique au cours de ces années d'études et surtout de m'avoir acceuillie au sein de leur unité dans le cadre de ce mémoire. Merci aussi pour leurs conseils avisés et leur soutien professionnel.

Je voudrais remercier tout particulièrement les membres de la « Ht*Bm* », qui, tout au long de ce mémoire, m'ont légué une partie de leur connaissance et qui m'ont soutenue (encouragée, conseillée, corrigée, …) dans mon labeur. Je tenais aussi à les remercier pour leur confiance et leur amitié.

Je voudrais remercier aussi tout les membres de l'URBM autant pour leur conseils professionnels que pour leur bonne humeur et bon humour.

Un tout grand merci aux mémorants URBMiens pour leur amitié et leur présence quotidienne.

Et encore merci à mes proches pour leur soutien et leur confiance débordante.

Abréviations courantes

AD (Activating Domain) : domaine de transactivation du facteur de transcription Gal4p
ADN : Acide désoxyribonucléique
BD (Binding Domain) : domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4p
C-terminal : extrémité carboxy-terminale
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
dH_2O : eau désionisée
D. O. : densité optique
EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique
GFP : Green Fluorescent Protein
GW : Gateway
pb : paires de bases
N-terminal : extrémité amino-terminale
PEG : polyéthylèneglycol
rpm : rotations par minute
SC (synthetic complete) : synthétique complet
SD (synthétique dropout) : synthétique minimal
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
T4SS (Type 4 Secretion System) : appareil de sécrétion de type quatre
TTSS (Type Three Secretion System) : appareil de sécrétion de type trois
U.V. : Ultraviolet

Table des matières

1. AVANT PROPOS 1

2. INTRODUCTION 1

2.1. Détournement des processus physiologiques et cellulaires par les bactéries intracellulaires 1
2.1.1. L'internalisation 1
2.1.1.1. Le « triggering » 2
2.1.1.2. Le « zippering » 2
2.1.2. Survivre et se multiplier 3
2.1.2.1. Echappement rapide du phagosome 4
2.1.2.2. Survie dans un environnement lysosomal 4
2.1.2.3. Arrêt de la maturation du phagosome 5
2.1.2.4. Détournement de la voie classique de phagocytose 5
2.1.3. Sortir de la cellule 6

2.2. Brucella melitensis, un pathogène intracellulaire 7
2.2.1. Brucella spp. 7
2.2.2. De l'invasion à la multiplication 7
2.2.3. Le système de sécrétion de type IV 9
2.2.3.1. L'appareil de sécrétion de type IV d'Agrobacterium tumefaciens 10
2.2.3.2. Le système Cag de Helicobacter pylori 10
2.2.3.3. Le Dot/Icm de Legionella et son équivalent chez les bactéries intracellulaires 11
2.2.3.4. Le système Ptl de Bordetella pertussis 11
2.2.3.5. L'appareil de sécrétion de type IV de Bartonella henselae 12
2.2.3.6. Le système de sécrétion de type IV de Brucella melitensis 12

2.3. Recherche d'effecteurs 13
2.3.1. Capacité d'interaction avec des protéines hôtes 13
2.3.2. Sécrétion dans la cellule hôte 14
2.3.3. Cytotoxicité en levure 14

3. OBJECTIFS 15

4. RESULTATS ET DISCUSSION 16

4.1. Test de survie en levure 18
4.1.1. Principe et Stratégie 18
4.1.2. Résultats 19
4.1.2.1. Construction des plasmides pGG-ORFs 19
4.1.2.2. Transformation de la levure et test de survie 22
4.1.2.3. Résultats du test de survie 23
4.1.3. Discussion 24
4.1.3.1. Saccharomyces cerevisiae, un modèle eucaryote 24
4.1.3.2. Limites de l'approche 24
4.1.3.3. Exploitation des phénotypes de croissance des levures 26

4.2. Localisation cellulaire microscopique 27
4.2.1. Principe et Stratégie 27
4.2.2. Résultats 28
4.2.3. Discussion 31

4.3. Vérification de la sécrétion des effecteurs putatifs 34
4.3.1. Principe et stratégie 34
4.3.2. Construction des plasmides pLUM-N/C. 35

5. CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES 37

6. MATERIEL ET METHODES 39

6.1. Matériel **39**
6.1.1. Souches et plasmides 39
6.1.1.1. Plasmides 39
6.1.1.2. Souches de E. coli. 39
6.1.1.3. Souche de Saccharomyces cerevisiae 40
6.1.2. Milieux 40
6.1.2.1. Milieux pour levure. 40
6.1.2.1.2. Milieu sélectif SD – LEU 40
6.1.2.1.3. Milieux non-sélectifs (YEPD, *y*east *e*xtract bacto-*p*eptone *D*-glucose) 40
2.2.1.1. Milieu LB (Luria Bertani) pour bactéries 41
6.1.3. Solutions et Réactifs 41
6.1.3.1. Tampon TE 10X : 41
6.1.3.2. Solution d'acétate de lithium (LiAc) 10X : 41
6.1.3.3. Poly éthylène glycol (PEG) 50% : 41
6.1.3.4. LiAc/TE 1X : 41
6.1.3.5. Mélange LiAc/TE/PEG 40% : 41
6.1.3.6. Glucose, Raffinose, Galactose 40% (w/v) : 42
6.1.3.7. Solutions concentrées d'acides aminés 42
6.1.3.8. Poudre d'acides aminés 42
6.1.3.9. Tampons pour miniprep 42
6.1.3.9.1. P1 : 42
6.1.3.9.2. P2 : 42
6.1.3.9.3. P3 : 42
6.1.3.10. Tampon TAE (stock concentré 50X) 42

6.2. Méthodes **43**
6.2.1. Techniques de biologie moléculaire 43
6.2.1.1. Techniques relatives à l'ADN 43
6.2.1.1.1. Miniprep et maxiprep 43
6.2.1.1.2. Restriction d'ADN plasmidique 43
6.2.1.1.3. Electrophorèse sur gel d'agarose 43
6.2.1.1.4. Extraction et purification d'ADN sur gel d'agarose 44
6.2.1.1.5. Ligation 44
6.2.1.1.6. Réaction LR 44
6.2.1.2. Transformations 45
6.2.1.2.2. Transformation de bactéries $CaCl_2$ compétentes 45
6.2.1.1.2. Transformation levure 45

6.3. Technique de microscopie **46**
6.3.1. Microscope 46
6.3.2. Préparation d'échantillons de microscopie à fluorescence 46
6.3.3. Molécule fluorescente 46

7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 47

1. Avant propos

La colonisation d'une niche écologique est fondamentale pour la pérennité de l'espèce. Au cours de l'évolution, les bactéries se sont adaptées à de nombreuses niches écologiques. Celles-ci sont très diversifiées et se retrouvent dans le monde animal, végétal et minéral. Une des niches écologiques bactérienne est la cellule eucaryote. Les bactéries intracellulaires pathogènes se sont adaptées à leurs hôtes en établissant des stratégies moléculaires pour contourner le système immunitaire et les processus cellulaires à leur avantage. Cette adaptation bactérienne est favorisée par une coévolution avec l'hôte. En effet, constituant l'environnement bactérien majeur, l'hôte exerce une pression de sélection importante sur le pathogène modulant sa persistance cellulaire.

2. Introduction

2.1. Détournement des processus physiologiques et cellulaires par les bactéries intracellulaires

Dans de nombreux tissus, les macrophages constituent la première ligne de défense de la réponse immunitaire. Un de leurs rôles est d'éliminer les particules étrangères par phagocytose. Celle-ci commence par l'internalisation de la particule qui donne lieu à la formation d'un compartiment membranaire, le phagosome. Ce dernier fusionne séquentiellement avec les endosomes précoces, les endosomes tardifs et enfin les lysosomes (Jutras et Desjardins, 2005). Les macrophages disposent d'une mécanistique de dégradation variée intégrant des actions microbicides, des enzymes de dégradation, le choc oxydatif ou encore des peptides cationiques antimicrobiens. Malgré l'efficacité de ces stratégies, un grand nombre de bactéries réussissent à détourner la phagocytose à leur avantage (Colombo, 2005).

Les paragraphes qui suivent évoquent les différentes étapes conduisant la bactérie à entrer, éviter la voie de dégradation phago-lysosomale, se diviser, puis sortir de la cellule pour réaliser une nouvelle invasion.

2.1.1. L'internalisation

La situation intracellulaire confère aux bactéries pathogènes un espace confiné à l'abri du système immunitaire ainsi que la possibilité d'exploiter les fonctions cellulaires pour survivre et se répliquer (Alonso et García-del Portillo, 2004). Deux types cellulaires peuvent être ciblés, les phagocytes professionnels (macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques et monocytes) et les phagocytes non professionnels.

La première étape consistant à entrer dans la cellule et à rejoindre le lieu de réplication implique un contact entre la bactérie et la cellule hôte. Des complexes moléculaires bactériens permettent l'adhésion à la cellule, induisant l'invasion. Ainsi, les bactéries possèdent des protéines telles que les adhésines et les invasines, ou des macromolécules multimériques comme le pilus rétractif de type IV (Pizarro-Cerda et Cossart, 2006).

Alors que les ions et les petites molécules passent au travers de canaux et de pompes, macromolécules ou complexes macromoléculaires sollicitent des processus d'internalisation

comme la phagocytose ou l'endocytose. C'est cette dernière machinerie qui est majoritairement exploitée par les pathogènes.

Il existe deux grands types d'entrée bactérienne : le « triggering » et le « zippering » (Alonso et García-del Portillo, 2004). Ces deux processus induisent le réarrangement du cytosquelette d'actine ; le « triggering », par injection de protéines dans la cellule, le « zippering », par activation de récepteurs membranaires de la cellule (Fig. 2-1).

2.1.1.1.Le « triggering »

Le mécanisme de « triggering » est activé par des protéines bactériennes effectrices directement injectées dans le cytosol par un appareil de sécrétion de type III (Type Three Secretion System, TTSS). L'appareil de sécrétion de type III, considéré comme une seringue moléculaire, est utilisé chez beaucoup de pathogènes à Gram négatifs (Johnson *et al.*, 2005). Les effecteurs ainsi injectés ciblent notamment des protéines jouant un rôle clé dans la dynamique du cytosquelette et dans la régulation du relargage de molécules immunomodulatrices et de survie ou de mort cellulaire. L'activation de Rho GTPases par les protéines injectées enclenche des changements drastiques dans la dynamique du cytosquelette, provoquant l'entrée de la bactérie. Les Rho GTPases sont des interrupteurs moléculaires qui interviennent dans une grande variété de fonctions cellulaires, allant de la régulation du cytosquelette d'actine à l'expression génique (Etienne-Manneville et Hall, 2002). Liée au GTP, la GTPase active des effecteurs situés en aval. L'hydrolyse du GTP induit un retour à la forme GDP (Fig. 2-2).

Salmonella et *Shigella* sont des exemples de bactéries pathogènes qui pénètrent la cellule par « triggering ».

Lors du contact avec son hôte, *Salmonella enterica* injecte, *via* son appareil de sécrétion, une série d'effecteurs : SopE, SopE2, SopB, SipA, SipC et SptP (Patel et Galan, 2003). SopE/E2 et SopB induisent l'activation de Rho GTPases telles que Cdc42 et Rac1 provoquant la polymérisation de l'actine et la formation de crêtes membranaires, ce qui favorise l'internalisation. SipA et SipC, favorisent la polymérisation d'actine G en actine F ce qui va contribuer à l'internalisation. Une fois à l'intérieur de la cellule hôte, SptP, une GTPase activating protein (GAP) inactive Cdc42 et Rac1 afin de rétablir la situation initiale. À ce stade, la bactérie peut alors rejoindre sa niche de réplication (Fig. 2-3A).

L'injection d'effecteurs (IpaC, VirA, IpgD et IpaA) par le TTSS de *Shigella* provoque des réarrangements du cytosquelette et l'internalisation de la bactérie (Pizarro-Cerda et Cossart, 2006). En effet, IpaC provoque la polymérisation de l'actine ; VirA stimule indirectement Rac-1 ce qui favorise la polymérisation de l'actine ; enfin, IpgD affecte le métabolisme du phosphoinositol et favorise l'extension membranaire en diminuant les interactions existant entre la membrane et le cytosquelette. Ces trois effecteurs contribuent ainsi à l'entrée de la bactérie. On constate également, dans le cas de *Shigella*, un rétablissement de la situation initiale, puisqu'un effecteur supplémentaire, IpaA, active une protéine cellulaire, la vinculine, qui induit la dépolymérisation d'actine et le recouvrement de la structure de la membrane plasmique après l'internalisation de *Shigella* (Fig. 2-3B).

2.1.1.2.Le « zippering »

Le « zippering » diffère du « triggering » par plusieurs paramètres. Du point de vue du contact entre l'hôte et le pathogène, la surface de la zone de contact qui s'établit est plus importante que dans le cas du triggering. Du point de vue du mécanisme moléculaire responsable de l'internalisation proprement dite, une reconnaissance faisant intervenir des interactions

ligands-récepteurs s'effectue de manière spécifique. L'activation des récepteurs membranaires cellulaires par la liaison de protéines de surface bactériennes induit des cascades de signalisation dans la cellule, provoquant des modifications du cytosquelette et l'internalisation de la bactérie (Alonso et García-del Portillo, 2004). Les récepteurs ciblés par les pathogènes se situent généralement dans des confinements membranaires riches en sphingolipides et stérols appelés radeaux lipidiques ou « lipid rafts ». *Yersinia* et *Listeria* constituent deux exemples de ce type d'invasion.

L'entrée de *Yersinia* dans les cellules non-phagocytaires dépend de l'action d'une protéine bactérienne, l'invasine, capable de lier avec une haute affinité des membres de la famille β-1 des intégrines (Pizarro-Cerda et Cossart, 2006). La partie cytoplasmique de l'intégrine induit le recrutement de « protéines relais » associées à des éléments du cytosquelette. La liaison à l'intégrine par l'invasine induit l'activation d'une Rho GTPase régulatrice de la dynamique du cytosquelette d'actine, Rac-1, et de Arf6 impliquée dans le trafic membranaire. Rac-1 et Arf6 favorisent l'entrée bactérienne par l'activation de la voie du phophoinositol favorisant le réarrangement du cytosquelette d'actine. Des protéines kinases de la cellule hôte, comme FAK et Src, participent aussi à l'internalisation (Fig. 2-3C).

Chez *Listeria monocytogenes*, deux protéines sont principalement responsables de l'infection des macrophages : l'internaline A (InlA) et l'internaline B (InlB). Ces deux effecteurs bactériens provoquent, par des voies distinctes, des réarrangements au niveau du cytosquelette conduisant à l'internalisation de la bactérie (Cossart *et al.*, 2003 ; Bonazzi et Cossart, 2006). InlA cible un récepteur cellulaire, la E-cadhérine, sur laquelle elle vient se lier. La E-cadhérine est une molécule impliquée notamment dans les jonctions cellulaires ; son activation par InlA induit le recrutement de protéines interagissant avec l'actine. L'InlB, quant à elle, interagit avec Met, le récepteur aux facteurs de croissance des hépatocytes. Des petites GTPases de la famille des Rho et des Rac sont activées par la phosphorylation de ce récepteur faisant suite à sa dimérisation. Cette activation induit des réorganisations du cytosquelette, permettant ainsi l'entrée de la bactérie (Fig. 2-3D, E).

Dans le cadre de ces deux modalités d'entrées, il est important de signaler que non seulement la reconnaissance joue un rôle central, mais également que les pathogènes ont réussi à détourner les activités cellulaires en produisant des effecteurs qui miment des ligands ou des protéines hôtes, telles que les petites GTPases.

2.1.2. Survivre et se multiplier

La phagocytose conduit à la formation d'un compartiment très dynamique, le phagosome, qui sera continuellement modifié le long de la voie phago-lysosomale qui se termine par la fusion avec les lysosomes. La voie phago-lysosomale permet la dégradation des particules internalisées (Vieira *et al.*, 2002). Les cellules phagocytaires ont développé différentes techniques pour éliminer les pathogènes, dont la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, et l'acidification du phagosome. Ces événements ont lieu suite à la fusion des phagosomes avec les lysosomes et les endosomes et s'accompagnent de la libération de peptides antimicrobiens et d'enzymes bactéricides, provoquant la dégradation du pathogène (Hackstadt *et al.*, 2000). Une fois à l'intérieur des cellules eucaryotes, les pathogènes doivent donc éviter les mécanismes de défense existants, avant de pouvoir détourner les processus cellulaires pour créer une niche favorable à leur multiplication.

Les pathogènes disposent, suite à des mécanismes de sélections et à leur coévolution avec l'hôte, de différents processus pour échapper à la dégradation (Fig. 2- 4). En fonction de l'espèce bactérienne, la survie et la multiplication ont lieu dans le cytosol ou dans le phagosome, influençant donc le « parcours » intracellulaire qui sera suivi pour éviter la fusion avec certains

compartiments et, *a posteriori,* la destruction. A titre d'exemples sont citées ci-dessous différentes stratégies bactériennes conduisant à la survie en dépit de la voie classique de destruction des intrus mise en place dans la cellule :

- Echappement rapide du phagosome (*Listeria, Shigella* et *Rickettsia*)
- Survie dans un environnement lysosomal (*Coxiella*)
- Arrêt de la maturation du phagosome (*Salmonella* et *Mycobacterium*)
- Ségrégation de la voie classique de phagocytose (*Legionella, Brucella* et *Chlamydia*)

Un point important pour l'invasion du pathogène est donc le détournement des mécanismes de défense et des mécanismes cellulaires favorisant sa croissance et son développement, mais également la capacité d'intégrer les processus physiologiques complexes de la cellule hôte. Les exemples qui suivent illustrent la diversité des mécanismes élaborés par des bactéries pathogènes au cours de l'invasion et les relations profondes établies avec la physiologie de l'hôte.

Certaines protéines situées en membrane vacuolaire sont des marqueurs moléculaires, c'est-à-dire des protéines spécifiques à un compartiment donné. Il est donc possible de déterminer de quel compartiment cellulaire dérive celui dans lequel se trouve le microorganisme, et son stade de maturation (Tableau 2-1). Ainsi des vacuoles marquées par des protéines telles que Rab5, EEA1 et la transferrine indiquent la fusion avec des endosomes précoces ; Rab7, Rab9 et le récepteur au mannose-6-phosphate, la fusion avec les endosomes tardifs ; les protéines associées à la membrane des lysosomes (LAMPs) et la cathepsine D mature, la fusion lysosomale.

2.1.2.1.Echappement rapide du phagosome

Des pathogènes tels que *Listeria, Shigella* et *Rickettsia* se retrouvent rapidement propulsés dans le cytosol à l'aide d'enzymes altérant la membrane phagosomale et par la formation d'une queue d'actine à l'un des pôles bactériens.

Listeria sécrète différentes enzymes (listeriolysine-O ou LLO, phosphatidyl-inositol-spécifique phospholipase ou PI-PLC et phosphatidyl-choline phospholipase ou PC-PLC) agissant de manière orchestrée pour aboutir à la lyse de la membrane vacuolaire (Cossart *et al.*, 2003). L'optimum d'activité de l'une de ces enzymes, la LLO, est à un pH acide de 5,9. Cette acidité est acquise au cours de la maturation de la vacuole contenant *Listeria.* Une fois libre dans le cytosol, la bactérie se multiplie rapidement. Elle est capable d'induire l'expression d'un transporteur d'hexose (Hpt), détournant des composés cytosoliques à son profit. L'ensemble du cycle de *Listeria* est représenté par la figure 2-5.

2.1.2.2.Survie dans un environnement lysosomal

L'environnement acide du phagolysosome est toléré et exploité par certaines bactéries dont le pathogène *Coxiella burnetii* est un exemple. Les vacuoles contenant *Coxiella* dérivent de la fusion d'endosomes tardifs avec les lysosomes (Gutierrez *et al.*, 2005). *Coxiella* se crée une large vacuole dans laquelle elle se divise. Ce type de compartiment est acidifié (pH compris entre 4,7 et 5,2), enrichi en hydrolases lysosomales, marqué par des glycoprotéines lysosomales et Rab7, par une protéine autophagosomale Atg8/LC3, et par une protéine impliquée dans les radeaux lipidiques, la flotilline-1 (Zamboni *et al.*, 2003 ; Colombo, 2005 ; Howe et Heinzen, 2006).

2.1.2.3.Arrêt de la maturation du phagosome

Pour certaines bactéries, une manière de survivre est de bloquer l'arrêt de la maturation du phagosome à différentes étapes de la voie phago-lysosomale. La maturation de la vacuole contenant *Salmonella* (*Salmonella* containing vacuole, SCV) s'arrête à un stade antérieur à la fusion phago-lysosomale (Knodler et Steele-Mortimer, 2003). La fusion avec les endosomes précoces est suggérée par l'acquisition des marqueurs Rab5, EEA1 et de la transferrine, première étape qui est suivie de la fusion avec les endosomes tardifs marquée par l'échange de Rab5 par Rab7. La fusion avec les lysosomes est évitée. Tout au long de ce parcours, les effecteurs sécrétés par l'appareil de sécrétion de type III sont d'une importance capitale. Certains de ces effecteurs assurent l'intégrité de la membrane vacuolaire (SifA et SseJ), l'inhibition de la fusion lysosomale (SpiC), ainsi que la localisation de la bactérie dans le Golgi et sa réplication (SseG) (Alonso et Garcìa-del Portillo, 2004 ; Waterman et Holden, 2003 ; Salcedo et Holden, 2005).

Le parcours du phagosome de *Mycobacterium tuberculosis* est bloqué à l'étape de fusion avec les endosomes précoces. La vacuole contenant la bactérie est caractérisée par une acidification incomplète et une absence d'hydrolases lysosomales actives. Le marquage par Rab5 de ces vacuoles suggère la fusion avec les endosomes précoces. Celle-ci semble être assurée par la présence de phosphatidylinositol mannoside au niveau de la paroi bactérienne. La maturation du phagosome est bloquée à un stade antérieur à la fusion avec les endosomes tardifs. Elle est mise en évidence par l'absence de Rab7, un marqueur des endosomes tardifs, ainsi que celle de la pompe à protons vacuolaire permettant l'acidification du contenu du phagosome (Deretic *et al.*, 2004).

2.1.2.4.Détournement de la voie classique de phagocytose

Le dernier type de stratégie mis en place par les pathogènes pour échapper à la destruction lysosomale est le détournement de la voie de phagocytose. Les pathogènes tels que *Chlamydia*, *Legionella* et *Brucella* (sur laquelle nous nous attarderons plus loin) entrent dans cette catégorie.

La voie suivie par *Chlamydia* est un exemple extrême. Cette bactérie réside dans un compartiment membranaire appelé inclusion, qui n'interagit pas avec les compartiments d'endocytose, mais celle-ci semblent être alimentée par des vésicules d'exocytose d'origine golgienne (Rzomp *et al.*, 2003). Ceci est vérifié par la présence de petites GTPases impliquées dans le recyclage de récepteurs (Rab4 et Rab11) et dans le trafic du réticulum endoplasmique (RE) au Golgi (Rab1). Son parcours, jusqu'à la région périnucléaire à proximité de l'appareil de Golgi, est aiguillé grâce à une protéine hôte détournée, la dynéine, qui permet le déplacement de l'inclusion. La capacité de rediriger complètement le trafic intravacuolaire de la cellule semble provenir de la présence d'un appareil de sécrétion de type III sécrétant des effecteurs (IncA, IncB et IncC) qui, par leurs interactions avec les constituants cellulaires, permettent à la bactérie de se créer sa niche réplicative optimale.

Une fois dans la cellule, *Legionella* forme un phagosome se mettant à l'écart de la voie phago-lysosomale. Les phagosomes naissants acquièrent rapidement les caractéristiques du réticulum endoplasmique en recrutant des vésicules précoces en provenance de la voie d'exocytose (Salcedo et Holden, 2005). Une fusion avec ces vésicules issues des sites de sorties du RE semble essentielle à la division de la bactérie. Cette interaction avec la voie d'exocytose nécessite l'appareil de sécrétion Dot/Icm de type IV, système d'exportation de protéines effectrices dans le cytosol de la cellule hôte infectée. Encore peu d'effecteurs de *Legionella* ont été caractérisés à ce jour. Néanmoins il a été montré que RalF, sécrétée par le système Dot/Icm, joue un rôle dans la multiplication de la bactérie, en recrutant en membrane et en activant Arf1, petite GTPase du trafic vésiculaire entre le RE et le Golgi (Nagai, 2002). En effet, si Arf1 est inhibée, la réplication bactérienne n'a pas lieu.

Un aspect essentiel pour la survie du pathogène intracellulaire est la survie de la cellule hôte. En effet si cette cellule vient à entrer en apoptose, il ne sera plus question ni d'évitement de la route phagocytaire, ni de multiplication bactérienne, la mort de la cellule mettant un terme à l'invasion et à la propagation du pathogène. Les bactéries intracellulaires semblent moduler l'apoptose (Häcker et Fischer, 2002). L'inhibition bactérienne de l'apoptose peut se faire, notamment, par l'action d'une protéine bactérienne menant directement ou non à l'activation d'un mécanisme inhibiteur de l'apoptose cellulaire. *Chlamydia* possède les mécanismes d'action anti-apoptotiques les plus clairs : ceux-ci agissent en amont de la libération du cytochrome *c* mitochondrial. Une fois dans le cytosol, le cytochrome *c* active une protéase, la caspase-9, qui active à son tour une deuxième caspase induisant l'apoptose. L'inhibition de ce processus par Chlamydia conduit à empêcher le suicide défensif de a cellule hôte.

2.1.3. Sortir de la cellule

Lorsque les bactéries intracellulaires sont entrées et se sont répliquées, elles doivent sortir de la cellule puis coloniser d'autres cellules ou encore de nouveaux organismes hôtes. Les bactéries envahissent les cellules hôtes à proximité du lieu de primo-infection.

Remarquons toutefois que certaines bactéries Gram négatives peuvent libérer des facteurs de virulence contenus dans des vésicules formées à partir de leur membrane externe (aussi appelées « blebs ») dans le but de favoriser leur dissémination au sein de l'organisme infecté et la colonisation de leur niche de réplication (Kuehn and Kesty, 2005). Ces facteurs de virulence peuvent agir au niveau de la régulation des défenses de l'hôte et de sa réponse, du relargage de toxines menaçant la survie du pathogène, de la production de composés toxiques visant à diminuer la concurrence bactérienne pour une niche réplicative, ainsi que pour accéder à des environnements particuliers de l'organisme hôte difficilement accessibles par la bactérie elle-même (Kuehn and Kesty, 2005). Ainsi, une telle vésicule peut contenir des adhésines, des toxines, des composés immunomodulatoires et des protéases, ainsi que présenter en surface des composés tels que le LPS. C'est le cas chez de nombreuses bactéries telles que *Escherichia coli* (Hoekstra *et al.*, 1976), *Shigella* spp. (Kadurugamuwa et Beveridge, 1999), *Helicobacter pylori* (Fiocca *et al.*, 1999) et *Brucella melitensis* (Gamazo et Moriyon, 1987).

Certaines bactéries ont développé la formation d'une queue d'actine à l'un des pôles bactériens, ce qui leur permet de se déplacer dans le cytosol de l'hôte ainsi que d'envahir les cellules jouxtant celles infectées. C'est le cas de *Listeria*, *Shigella* et *Rickettsia* (Gouin *et al.*, 1999).

Lors de cette première partie, il a été question des stratégies mises en place par les pathogènes intracellulaires pour envahir l'hôte, éviter la dégradation lysosomale et réussir à se répliquer. Un moyen communément utilisé par les pathogènes, dans le détournement des processus physiologiques, est d'imiter certains comportements cellulaires qui fournissent une réponse pro-invasive. Les facteurs de virulence y contribuent en ciblant des récepteurs membranaires, la dynamique du cytosquelette ou encore le trafic vésiculaire (endo- ou exocytaire) par adhésion ou encore par sécrétion d'effecteurs.

2.2.Brucella melitensis, un pathogène intracellulaire

Alors que nous avons évoqué les différentes stratégies d'internalisation, de survie et de multiplication d'une manière générale chez les bactéries intracellulaires, cette deuxième partie ciblera plus précisément *Brucella melitensis*. Nous aborderons tout d'abord ses caractéristiques générales puis, plus précisément, ses mécanismes d'invasion.

2.2.1. Brucella spp.

D'un point de vue morphologique, *Brucella* est un coccobacille mesurant 0,6-1,5 µm de long et 0,5-0,7 µm de diamètre (Fig. 2-6). Elle doit son nom à Sir David Bruce, qui en 1887, isola pour la première fois l'agent de la fièvre de Malte, appelé alors *Micrococcus melitensis*. Certaines espèces se développent mieux en atmosphère contenant 5 à 10 % de CO_2. Il s'agit d'un pathogène Gram négative ayant un lippopolysaccharide (LPS) faiblement immunogène (Bundle *et al.*, 1989). Le génome de *Brucella melitensis* est formé de deux réplicons de 1,15 et 2,1 Mb, tandis que celui de *B. suis* ne possède qu'un seul réplicon de 3,2 Mb ; tous deux ont un pourcentage en G+C de 58-59 % (Maurin, 2004).

Brucella melitensis est une bactérie intracellulaire facultative qui survit et se réplique dans les cellules phagocytaires et non-phagocytaires, parmi lesquelles les macrophages constituent les cibles majoritaires (Celli, 2006). La manière dont *Brucella* parvient à contrôler le trafic intracellulaire pour éviter la dégradation lysosomale, à se multiplier largement sans restreindre les fonctions cellulaires de base ou sans induire les processus de mort cellulaire programmée, montre une adaptation certaine à l'environnement intracellulaire.

Brucella appartient à la subdivision des α-protéobactéries et à l'ordre des Rhizobiales. Les α-protéobactéries regroupent de nombreuses bactéries pathogènes dont *Brucella* spp., *Agrobacterium tumefaciens*, *Rickettsia* spp., *Bartonella* spp., ou mutualistes comme *Sinorhizobium meliloti*. Elles sont caractérisées par une large diversité dans la taille des génomes, les modes de développement et les niches réplicatives (Batut *et al.*, 2004). Dans un arbre phylogénétique basé sur les homologies entre ARN ribosomal 16S (Sallstrom et Andersson, 2005), le genre le plus proche de *Brucella* est *Bartonella* , un pathogène de l'homme et des animaux (Fig 2-7). A ce jour, 8 espèces de *Brucella* sont répertoriées, composées en biovars (notion liée à la spécificité d'un hôte animal naturel). Le tableau 2-2 représente les différentes espèces de *Brucella* et leurs biovars respectifs.

Les *Brucellae* sont responsables d'une zoonose contagieuse à caractère mondial, la brucellose, qui touche un large panel d'animaux, principalement le bétail (ovins, bovins, caprins, suidés) et de manière accidentelle l'homme (Corbel, 1997). Les espèces pathogènes pour l'homme sont les suivantes : *Brucella melitensis, Brucella abortus, Brucella suis* et plus rarement *Brucella canis*. La transmission chez l'homme peut se faire par contact cutané direct avec l'animal infecté, par ingestion d'aliments contaminés comme les produits laitiers, ou encore par inhalation des produits de litières ou d'aérosols (Kozukeev *et al.*, 2006).
La brucellose animale est une maladie chronique responsable d'avortements répétés restant malgré tout assez bien tolérée (Maurin, 2005).

2.2.2. De l'invasion à la multiplication

Brucella possède des gènes de virulence qui sont importants dans l'interaction hôte-pathogène et produit des facteurs de virulence qui modifient la voie phago-lysosomale, la sécrétion de cytokines et l'induction de l'apoptose (Celli, 2006).

Il existe deux types d'interaction macrophage-bactérie intracellulaire (Jimenez de Bagues *et al.*, 2005). La première interaction est dite agressive et correspond à des pathogènes

(*Salmonella, Listeria*) qui pénètrent activement, se disséminent, bloquent la phagocytose et parfois éliminent le macrophage. Dans le second cas, les bactéries sont moins agressives (*Mycobacteria*, *Chlamydia*), désactivent ou n'induisent pas l'activation des actions microbicides du macrophage et favorisent la prolifération intracellulaire en rendant les macrophages plus permissifs et les protégeant de la mort cellulaire. Le comportement moins agressif de *Brucella* la fait rentrer dans la seconde catégorie d'interactions. En effet, lors de son infection, *Brucella* contrôle les actions microbicides mises en place par le macrophage et le maintient en vie afin de s'y multiplier.

Brucella pénètre activement dans la cellule au niveau des radeaux lipidiques par « zippering » pour former un phagosome qui fusionne avec les endosomes précoces aboutissant à une vacuole contenant *Brucella* ou BCV (*Brucella* Containing Vacuole). Une fois acidifiée, la BCV évite la fusion phago-lysosomale et se dirige vers les sites de sortie du réticulum endoplasmique (ERES, Endoplasmic Reticulum Exit Sites) où elle forme une vacuole possédant les caractéristiques nécessaires à la multiplication de *Brucella*. La BCV se diviserait en deux BCVs filles alimentées par des membranes issues du RE (Gorvel et Moreno, 2002, Celli et Gorvel 2004).
Le trafic intracellulaire de *Brucella* peut être mis en évidence par l'acquisition transitoire de protéines caractéristiques des compartiments cellulaires impliqués lors de la maturation de la BCV (Fig. 2-8). En effet, la BCV précoce possède les marqueurs de l'endosome précoce, Rab5 et EEA-1 (Early Endosome Antigen-1). La vacuole intermédiaire est caractérisée par l'accumulation d'un des marqueurs de l'endosome tardif, LAMP-1 mais pas Rab7. Enfin, la niche de réplication de *Brucella* est marquée par les protéines typiques du RE : calnexine, calréticuline, sec61β et PDI (Celli, 2006).

L'entrée active de *Brucella* dans le macrophage et le contrôle du trafic phago-lysosomal sont modulés par plusieurs facteurs de virulence : le système à deux composants BvrR/S, le lipopolysaccharide (LPS) atypique, le β-1,2-glucan cyclique et le système de sécrétion de type IV, VirB (Jimenez de Bagues *et al.*, 2005).

Le système à deux composants BvrR et BvrS est impliqué dans le maintien de l'intégrité de la membrane externe de *Brucella* et dans le contrôle de la virulence associée à la survie intracellulaire (Lopez-Goni *et al.*, 2002). Un système à deux composants est un système où un senseur perçoit un stimulus environnemental activateur et vient activer, à son tour, un régulateur qui contrôle l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stimulus. Dans ce cas-ci, BvrR est le régulateur et BvrS le senseur. Une mutation dans le gène *bvrR* ou *bvrS* empêche la pénétration de la bactérie dans les cellules non-phagocytaires par un non-recrutement de Cdc42 et rend la souche sensible aux peptides cationiques. De plus, le disfonctionnement de ce système altère l'intégrité de la membrane externe bactérienne.

Le LPS lisse est nécessaire pour assurer à *Brucella* une entrée active, c'est-à-dire non-phagocytaire, une résistance aux composés microbicides et à la modulation de la réponse immune (Cardoso *et al.*, 2006). Lors de l'entrée de la bactérie, le LPS interagit avec des radeaux lipidiques, nécessaires à l'internalisation. Ceux-ci sont de petits domaines (10-200 nm) membranaires hétérogènes, très dynamiques, enrichis en cholestérol et sphingolipides, qui servent de zone charnière entre l'environnement cellulaire et la cellule, activant des voies de signalisation cellulaires dans certaines conditions stimulantes (Pike, 2006). La nécessité de ces microdomaines lipidiques fonctionnels suggère la présence de récepteurs impliqués dans l'internalisation de *Brucella*.

Brucella possède un LPS atypique en comparaison au LPS classique des entérobactéries telle que *Escherichia coli* (Fig. 2-9). Le LPS possède trois domaines : le lipide A, le polysaccharide O et l'antigène O, ou chaîne O. La particularité du LPS de *Brucella* vient de la

structure de la chaîne O et de celle du lipide A. La chaîne O protège *Brucella* des peptides cationiques cellulaires, des espèces réactives de l'oxygène et de la lyse induite par le complément. Les souches de *Brucellae* qui possèdent un LPS sans chaîne O, appelées souches rugueuses, sont phagocytées et leurs phagosomes suivent la voie de dégradation par fusion avec les lysosomes. Le lipide A est le composé majoritaire du feuillet externe de la membrane externe et est responsable de beaucoup des propriétés exotoxiques attribuées au LPS. Le lipide A de *Brucella* est atypique et est composé d'un squelette disaccharidique dans une configuration β1-6 (Moreno *et al.*, 1990 ; Rojas *et al.*, 1994).

Le β-1,2-glucan cyclique est un composé périplasmique produit classiquement par les α-protéobactéries et impliqué dans des phénomènes d'osmorégulation et de suppression des défenses mises en place par la cellule hôte (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005). Chez *Brucella*, l'enzyme responsable de sa synthèse, codée par le gène *cgs*, lui permet d'éviter la fusion des BCVs avec les lysosomes. Lors de l'entrée de *Brucella*, le β-1,2-glucan cyclique interagit avec les radeaux lipidiques et modifie leur composition en extrayant le cholestérol. Les mutants *cgs* présentent une cytotoxicité atténuée en modèle d'infection murin et sont incapables d'empêcher la fusion phago-lysosomale. Les radeaux lipidiques seraient importants dans l'aiguillage du trafic intracellulaire vers la voie de dégradation, les désignant comme cibles potentielles par les pathogènes intracellulaires. La modification de la structure de ces microdomaines lipidiques par le β-1,2-glucan cyclique empêcherait la fusion de la BCV avec les lysosomes.

VirB est un des premiers facteurs de virulence identifié chez *Brucella* (Delrue *et al.*, 2001). C'est un homologue du système VirB d'*Agrobacterium tumefaciens* chez qui il sert à injecter des complexes nucléo-protéiques à l'intérieur de la cellule infectée. L'acidification des BCVs intermédiaires est nécessaire à la survie de la bactérie et entraîne l'expression des gènes *virB* (Boschiroli *et al.*, 2002). Un mutant *virB* n'est pas capable d'interagir de manière soutenue avec le RE et est redirigé vers la fusion lysosomale entraînant la destruction de la bactérie. Les effecteurs injectés par le système de sécrétion de type IV restent non-identifiés.

Jusqu'à présent la description des facteurs de virulence de *Brucella* se base essentiellement sur des interactions membranaires. La façon dont la BCV s'oriente vers sa niche de réplication évitant la fusion avec les lysosomes est peu détaillée. L'identification d'effecteurs sécrétés par l'appareil de sécrétion de type IV, qui interagiraient avec des protéines impliquées dans le trafic intracellulaire constitue une étape importante dans la compréhension du cycle invasif de *Brucella*.

2.2.3. Le système de sécrétion de type IV

Les pathogènes intracellulaires et bactéries symbiotiques utilisent les appareils de sécrétion de type III ou de type IV (ou T4SS, Type IV Secretion System) pour exporter des protéines dans leurs cellules hôtes.

Le système de sécrétion de type IV permet le transport de protéines et d'ADN simple brin d'un grand nombre de bactéries dans des cellules eucaryotes ou d'autres bactéries (Llosa et O'Callaghan, 2004). De nombreuses bactéries possèdent un appareil de sécrétion de type IV.

Les membres de la famille du T4SS ont été classifiés en quatre sous-groupes (Backert et Meyer, 2006). Chacun d'entre eux est spécialisé pour une fonction spécifique : conjugaison d'ADN plasmidique ou chromosomique, prise d'ADN du milieu extracellulaire et transformation, relargage d'ADN dans le milieu extracellulaire, et transfert de molécules effectrices dans la cellule hôte. Il contribue à des processus importants tels que l'échange de matériel génétique, la dissémination de plasmides conjugatifs, la formation de biofilms, ainsi que l'injection de facteurs de virulence dans le cytosol des cellules hôtes (Fig. 2-10).

2.2.3.1.L'appareil de sécrétion de type IV d'Agrobacterium tumefaciens

Le modèle de l'appareil de sécrétion de type IV est celui d'*Agrobacterium tumefaciens* qui délivre un complexe nucléoprotéique dans la cellule végétale et provoque le développement d'une galle. *Agrobacterium* est une bactérie du sol qui peut s'attacher et transformer les cellules végétales par l'induction de l'expression (par des composés végétaux) des gènes de virulence codés sur un plasmide spécifique, le Ti plasmid (Tumor inducing), et dont une portion constitue l'ADN de transfert (T-DNA). Ces protéines de virulence ont des rôles variés allant de l'activation transcriptionnelle de gènes végétaux au traitement et à l'exportation du T-DNA accompagné de certaines protéines ayant des fonctions spécifiques à l'intérieur de l'hôte. Le T-DNA d'*Agrobacterium* code des hormones végétales qui stimulent la croissance d'une tumeur, et des enzymes métaboliques responsables de la production d'opines (composés azotés) uniquement métabolisables par *Agrobacterium* (Valentine, 2003). La galle constitue un environnement propice au développement et à la multiplication de la bactérie. Les protéines de virulence et le T-DNA sont transférés *via* l'appareil de sécrétion de type IV assemblé au pôle cellulaire (Judd *et al.*, 2005). Les protéines du T4SS impliquées dans le transfert d'ADN sont celles codées par les gènes *virB1-virB11* et la protéine de couplage VirD4 (Christie *et al.*, 2005 ; Lavigne *et al.*, 2006). Les protéines VirB participent à la formation de l'appareil de sécrétion, et ce à divers niveaux : les protéines formant le canal (VirB6- VirB10), les composants énergétiques (VirB4 et VirB11), et les composants associés au pilus (VirB2 et sans doute VirB3 et VirB5). La protéine VirB1 est une transglycosylase nécessaire à la lyse localisée du peptidoglycan au site d'insertion du T4SS et permettrait le déclenchement de la formation du pilus (Fig. 2-11). La protéine de couplage VirD4 aurait une fonction de connexion entre les protéines devant être sécrétées et le conduit de sécrétion (Gomis-Ruth *et al.*, 2004). Le transfert du complexe nucléoprotéique (T-DNA lié de manière covalente à la relaxase VirD2) dans la cellule est accompagné de la sécrétion de quatre protéines effectrices : VirE2, VirE3, VirF et VirD5 (Tzfira et Citovsky, 2002). Ces protéines possèdent un signal d'adressage leur permettant de transiter par le T4SS. VirE2 interagit avec de nombreuses protéines hôtes et favorise l'intégration chromosomique de l'ADN de transfert chez l'hôte. La fonction des autres effecteurs reste peu comprise, bien que VirE3 et VirF semblent favoriser l'infection de certaines espèces végétales.

Les systèmes de sécrétion de type IV transportant des effecteurs dans les cellules eucaryotes sont retrouvés chez de nombreuses bactéries. Ceux-ci sont impliqués dans la délivrance de facteurs de virulence favorisant la prolifération du pathogène. Plusieurs systèmes se retrouvent dans cette catégorie : le système Cag de *Helicobacter pylori*, le système Dot/Icm de *Legionella pneumophila*, le système PtI de *Bordetella pertussis* et le système de sécrétion de type IV de *Bartonella henselae* (Llosa et O'Callaghan, 2004 ; Backert et Meyer, 2006).

2.2.3.2.Le système Cag de Helicobacter pylori

Le système Cag de *Helicobacter pylori* délivre un effecteur, CagA, encodé sur un îlot de pathogénicité *cag*, dans les cellules de l'épithélium gastrique (Bourzak et Guillemin, 2005). Cette protéine, ainsi que d'autres effecteurs encore non-identifiés, interfèreraient avec des éléments impliqués dans la dynamique du cytosquelette d'actine, déstabiliseraient les jonctions cellulaires et induiraient l'expression de protéines pro-inflammatoires. Les cellules infectées sont allongées et dispersées suite à l'induction d'une certaine mobilité. Le phénomène de dispersion cellulaire est indépendant de CagA et implique la rupture des jonctions cellulaires et l'activation de petites Rho GTPases Rac-1 et Cdc42 (Bagnoli *et al.*, 2005 ; Churin *et al.*, 2001). L'élongation de la cellule dépend de la sécrétion et de la phosphorylation de CagA. À l'intérieur de la cellule épithéliale, CagA est phosphorylée par des kinases de la famille Src (ou SFKs pour Src Family

Kinase). Une fois activée CagA interagit avec différentes protéines cellulaires dont Src elle-même. L'inactivation de Src par CagA provoque la redistribution de la cortactine dans les régions riches en actine et l'induction du phénotype allongé (Selbach, *et al.*, 2004). De plus, *H. pylori* est capable de réguler son infiltration dans les neutrophiles de la muqueuse gastrique, cette infiltration est dépendante de l'induction de la réponse inflammatoire, par l'activation des facteurs de transcription AP-1 (Activating Protein 1) et NF-κB (Nuclear Factor) et la libération d'IL-8 (Brandt *et al.*, 2005 ; Naumann *et al.*, 1999 ; Fischer *et al.*, 2001). L'induction de IL-8 dépend de l'ilôt de pathogénicité *cag* fonctionnel et est ciblée par au moins deux voies de signalisation. La première, qui a été décrite récemment, est dépendante de la présentation de peptidoglycan sécrété à la protéine Nod1 qui active NF-κB (Viala *et al.*, 2004). L'induction massive d'IL-8 par Erk1 et Erk2 constitue la seconde voie. L'activation d'un récepteur tyrosine kinase comme celui pour l'EGF (Epidermal Growth Factor) par un effecteur encore non identifié ou l'activation de Ras par CagA non phosphorylé permettrait d'activer Erk1/2 (Keates *et al.*, 2001 ; Brandt *et al.*, 2005).

2.2.3.3.Le Dot/Icm de Legionella et son équivalent chez les bactéries intracellulaires

Une meilleure connaissance du système de sécrétion Dot/Icm de *Legionella pneumophila* donne une idée des stratégies de survie chez les bactéries intracellulaire telles que *Brucella* et *Coxiella* qui utilisent le T4SS pour survivre à l'intérieur de la cellule hôte. Lors de l'infection, *Legionella* transporte de nombreux effecteurs (RalF, LidA, DotA, LepA, LepB, SidA-SidH,…) dans la cellule via un T4SS fonctionnel appelé Dot/Icm (pour Defective in Organelle Trafficking/IntraCellular Multiplication). Ces effecteurs jouent un rôle dans l'entrée, la multiplication et la propagation de la bactérie. Comme nous l'avons mentionnée plus haut, RalF recrute et active la petite GTPase Arf1 (ADP ribosylation factor 1) en membrane du phagosome contenant *Legionella* (Nagia *et al.*, 2002). Arf1 est importante pour la multiplication de la bactérie sans être pour autant essentielle, suggérant l'action d'effecteurs complémentaires. LidA est constitutivement sécrétée dans le cytosol et est supposée impliquée dans le recrutement des vésicules de sécrétion précoces vers le phagosome (Derre et Isberg, 2005). Deux effecteurs sécrétés par Dot/Icm, LepA et LepB, ont été récemment identifiés comme favorisant la libération non lytique de *Legionella* de son hôte protozoaire en commandant la voie d'exocytose (Chen *et al.*, 2004). Chez *Brucella*, l'équivalent de cet appareil de sécrétion, que nous décrirons plus loin, a été identifié et caractérisé comme essentiel à la multiplication bactérienne et à l'évitement de la fusion phago-lysosomale, mais les effecteurs doivent encore être identifiés. *Coxiella* évolue dans des vacuoles semblables à celles de *Legionella* et utilise un appareil de sécrétion homologue à Dot/Icm nécessaire à la survie intracellulaire (Zamboni *et al.*, 2003).

2.2.3.4.Le système Ptl de Bordetella pertussis

Le système Ptl (Pertussis toxin liberation), de *Bordetella pertussis* diffère des précédents par le fait que la toxine pertussique (ou Ptx pour Pertussis toxin) est délivrée dans le milieu extracellulaire (Weiss *et al.*, 1993, Covacci *et al.*, 1993). Elle est composée de 5 sous-unités possédant une séquence signal en N-terminal leur permettant de traverser la membrane interne et de se retrouver dans le périplasme. L'assemblage des sous-unités de la toxine se fait dans le périplasme. Une fois assemblée, elle serait éjectée dans le milieu extracellulaire par le système Ptl en formant un pore autour de la toxine. Cette structure est semblable à celle du système de sécrétion VirB d'*Agrobacterium tumefaciens* (Burns *et al.*, 2004). Dans le milieu extracellulaire la Ptx se lie à la membrane cellulaire et injecte la sous-unité catalytique S1 directement dans le cytosol de la cellule hôte. Cette exotoxine est donc sécrétée en 2 étapes (Burns, 2003). L'activité de ribosylation de la sous-unité S1 permet de lever l'inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase intracellulaire. Une intoxication à Ptx résulte en une modification de la sécrétion

d'insuline, l'inhibition de la prolifération cellulaire, la sécrétion d'histamine et l'induction de la lymphocytose.

2.2.3.5.L'appareil de sécrétion de type IV de Bartonella henselae

Le T4SS de *Bartonella henselae* contribuerait à une invasion efficace de cellules eucaryotes, dont les érythrocytes, par la bactérie. Il sécrète des effecteurs, les Beps (*Bartonella*-translocated effector proteins), qui viennent interférer avec le cytosquelette induisant la prise bactérienne collective, stimulant une réponse proinflammatoire par activation de la voie NF-κB, ainsi que désensibilisant la cellule aux signaux proapoptotiques (Schröder et Dehio, 2005). Jusqu'à présent, 7 effecteurs putatifs ont été identifiés (Schulein *et al.*, 2005). Pour un de ces effecteurs, BepD, il a été montré qu'une fois sécrété dans la cellule hôte il était phosphorylé comme CagA chez *Helicobacter pylori*. La fonction de ces effecteurs reste à déterminer.

2.2.3.6.Le système de sécrétion de type IV de Brucella melitensis

L'analyse du génome complet de la souche 16M de *Brucella melitensis*[1] a permis l'identification d'un homologue du système de sécrétion de type IV d'*A. tumefaciens*. Les protéines VirB1-VirB11 sont codées par les gènes *virB1-virB11* qui se trouvent sur un même opéron. Aucun homologue de VirD4 n'a cependant été identifié chez *Brucella* (Delvecchio *et al.*, 2002).

L'importance du T4SS dans la croissance et le trafic intracellulaire a été mise en évidence par des travaux de mutagenèse transpositionelle (Foulogne *et al.*, 1999 ; Delrue *et al.*, 2001). La disruption de chacun des gènes *virB2, virB4, virB6, virB8, virB9* ou *virB11* rend la bactérie incapable de se multiplier dans la cellule. De plus, le système VirB de *Brucella* montre une très haute homologie de séquence avec le système Ptl de *Bordetella pertussis* (O'Callhagan *et al.*, 1999). L'analyse des mutants transpositionnels *virB* indique que les premiers événements de l'invasion ne sont pas liés au T4SS, contrairement à l'évitement de la fusion avec les lysosomes. Les mutants *virB* résident dans un compartiment vacuolaire marqué par la protéine endosomale LAMP-1, et une protéine du RE, Sec61β, qui est aussi présente dans les vacuoles autophagiques originaires du RE. Ces mutants sont incapables de se multiplier dans ces vacuoles mais évitent la fusion phago-lysosomale, mettant en évidence l'importance de VirB dans la multiplication bactérienne (Delrue *et al.*, 2001).

La présence de ce système de sécrétion suggère l'injection de facteurs de virulence dans la cellule. Bien que le T4SS soit nécessaire pour que la bactérie accède à sa niche réplicative, l'implication d'effecteurs, sécrétés par ce système, dans la redirection du trafic intracellulaire reste à prouver. Aucun effecteur de *Brucella* n'a été identifié à ce jour. Leur identification, ainsi que celles de leurs cibles fourniraient des précisions dans le mécanisme d'invasion de la bactérie.

[1] Le choix du séquençage de la souche virulente 16M de *Brucella melitensis* a été réalisé vu le grand nombre d'études dont elle fait l'objet et sa virulence en souris, le modèle d'étude de la brucellose.

2.3. Recherche d'effecteurs

Comme déjà précisé précédemment, on considère un effecteur, dans le cadre de ce travail, comme une protéine bactérienne qui, une fois sécrétée, peut interférer avec une ou des protéines de l'hôte en modulant leur fonction. La recherche d'effecteurs putatifs de *Brucella* se module actuellement autour de leurs capacités d'interactions physiques avec des protéines de la cellule hôte, de la perturbation de fonctions des protéines eucaryotes, et de leur sécrétion.

2.3.1. Capacité d'interaction avec des protéines hôtes

Puisqu'on considère que les modulations diverses effectuées au niveau de l'action de certaines protéines hôtes peuvent être dépendantes, directement ou non, d'interactions physiques entre protéines, une première approche consiste à déterminer de telles interactions entre des protéines de *Brucella* et de l'hôte. Ceci peut se réaliser, notamment, *via* l'utilisation d'un crible double hybride en levure (Y2H). Cette technique permet de mettre en évidence une interaction protéique par la reconstitution d'un facteur de transcription scindé (Field et Song, 1989). Un facteur de transcription est composé notamment de deux domaines fonctionnels séparables : le domaine de liaison à l'ADN (BD, Binding Domain) et le domaine transactivateur (AD, Activating Domain). Dans le double hybride, ces domaines sont séparés et chacun fusionné à une protéine d'intérêt X, l'appât, ou Y, la proie, respectivement. L'interaction physique entre BD-X et AD-Y reconstitue le facteur de transcription qui vient activer la transcription du gène rapporteur régulé par les sites de liaisons au BD situés en amont. Le BD et l'AD communément utilisés sont ceux du facteur de transcription de levure Gal4p et les gènes rapporteurs utilisés *HIS3*, *lacZ* et *URA3*, ce dernier gène pouvant être utilisé pour une sélection positive ou négative. Le génome de la souche de levure utilisée en double-hybride doit donc être modifié en conséquence (*GAL1::HIS3*, *GAL1::lacZ* et *SPAL10::URA3*). En général, une interaction double hybride est jugée positive quand au moins deux gènes rapporteurs sont activés (Fig. 2-12).

La façon dont *Brucella* arrive à détourner la phagocytose suggère l'existence d'interactions entre les protéines exposées en surface du phagosome et potentiellement celles sécrétées. L'étude protéomique à large échelle de Garin et ses collaborateurs (Garin *et al.*, 2001) a mis en évidence plus de 140 protéines associées au phagosome murin. Celle-ci a permis de réaliser un criblage d'interactions protéiques à haut débit entre les orthologues humains des protéines retrouvées sur le phagosome et celles codées par la totalité du génome de *Brucella melitenis*. Ainsi, en collaboration avec Marc Vidal à Boston, un crible double hybride à haut débit a été réalisé testant les interactions entre les protéines codées par la totalité du génome de *Brucella* avec celles exposées en surface du phagosome humain, celles impliquées dans l'apoptose, ainsi que les protéines de *Brucella* liées aux systèmes de sécrétion putatifs (A. Jamet, communication personnelle). La disponibilité, dans un format aisément manipulable, des séquences codantes (ORFs, Open Reading Frame) humaines issues de l'ORFéome (Rual *et al.*, 2004) et de la disponibilité de l'ORFéome de *Brucella* (Box) a rendu ce crible possible. Les résultats de ce crible double hybride ont permis d'identifier 17 effecteurs putatifs de *Brucella melitensis* (Tableau 2-3). Parmi ceux-ci, quatre interagissent avec des protéines de la superfamille Ras, des interrupteurs moléculaires impliqués dans la régulation de vastes fonctions cellulaires (prolifération cellulaire, différenciation, expression génique, organisation de l'actine, progression du cycle cellulaire, transport vésiculaire, trafic intracellulaire de protéines, assemblage du fuseau mitotique, …)

2.3.2. Sécrétion dans la cellule hôte

Une deuxième approche pour identifier un effecteur est de tester s'il est sécrété dans la cellule hôte. La translocation de protéine peut être mise en évidence par plusieurs techniques.

Une première technique consiste à utiliser l'adénylate cyclase CyaA, une des toxines majeures de *Bordetella pertussis*. Cette enzyme, normalement sécrétée par la bactérie, peut entrer dans la cellule eucaryote où, activée par la calmoduline (CaM), elle catalyse la synthèse à forte concentration d'AMPc qui vient altérer la physiologie de l'hôte (Mock et Ullmann, 1993). L'activité du domaine catalytique de CyaA, l'AC (ATP-cyclizing Catalytic domain), est dépendante de la CaM eucaryote, la cellule bactérienne n'en n'exprimant pas. Cette caractéristique peut être utilisée en vue d'identifier des protéines bactériennes sécrétées dans la cellule eucaryote en créant une protéine hybride AC-protéine bactérienne (Ladant et Ullmann, 1999). Si la bactérie transfère la protéine hybride dans le cytosol de la cellule eucaryote, sa présence sera décelée par une forte augmentation de l'AMPc cellulaire (Fig. 2-14).

Une technique alternative à l'utilisation de la CyaA, est la fusion d'un motif facilement détectable (Tag) à une protéine d'intérêt. Les inconvénients de l'utilisation de tags dans l'identification d'effecteurs putatifs sont les risques de modification de la conformation protéique, suite à l'ajout d'acides aminés, et les risques de dissimulation d'un motif terminal impliqué dans la sécrétion de la protéine. La création récente d'un motif tétracystéine de 6 acides aminés (Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys), le « tag Lumio », permet vu sa petite taille de minimiser les modifications de conformations de la protéine d'intérêt. Les cystéines de ce motif sont capables de coordonner les deux groupes arsenic du réactif Lumio® par la formation de liaisons coordinatives. L'excitation à 508 nm du réactif complexé permet l'obtention d'un signal de fluorescence à 528 nm (Fig. 2-15). Cette nouvelle technique permet une visualisation directe de la sécrétion. Elle a été utilisée avec succès dans une expérience de détection de la sécrétion en temps réel des effecteurs IpaB et IpaC de *Shigella flexneri* (Enninga *et al.*, 2005).

2.3.3. Cytotoxicité en levure

Un troisième paramètre permettant d'identifier des effecteurs bactériens est lié à leur action cyctotoxique. En effet, certains effecteurs bactériens provoquent des dégâts cellulaires importants, ou effets cytotoxiques, affectant la survie de la cellule eucaryote.

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un modèle couramment utilisé pour examiner la fonction de facteurs de virulence individuels. Beaucoup de mécanismes affectés durant l'infection bactérienne sont relativement bien conservés de la levure aux mammifères, incluant le métabolisme de l'ADN, la mort cellulaire programmée, le contrôle du cycle cellulaire, la dynamique du cytosquelette et le trafic membranaire (Valdivia, 2004).

L'expression de protéines de virulence bactériennes en levure est une approche simple pour l'identification de fonctions, ainsi que leur localisation cellulaire. L'expression d'effecteurs bactériens dans la levure affecte sa survie, donnant lieu à des phénotypes de croissance exploitables (Valdivia, 2004). Un test de survie en levure permet d'identifier des protéines bactériennes cytotoxiques et potentiellement effectrices. L'utilisation du phénotype de retard de croissance ou de létalité permet de caractériser l'effet de la protéine bactérienne sur la levure.

Ainsi, une étude a montré que la toxicité de YopE, un effecteur de *Yersinia*, était liée à l'hydrolyse du GTP des Rho GTPases, Rac1, Cdc42 et RhoA, impliquées dans la phagocytose (Lesser et Miller, 2000). Lesser et Miller (2001) ont exprimé la protéine bactérienne, sous le contrôle d'un promoteur inductible GAL10, dans la levure et observé le phénotype de croissance. La croissance de la levure est affectée par la production de GFP-YopE donnant donc lieu à un phénotype de cytotoxicité. L'observation de la localisation cellulaire de la protéine bactérienne fusionnée à la GFP (Green Fluorescent Protein), leur a permis de corréler positivement la localisation cellulaire de YopE à sa cible cellulaire, le cytosquelette d'actine.

3. Objectifs

Brucella melitensis se multiplie à l'intérieur de la cellule dans un compartiment semblable au réticulum endoplasmique. Pour atteindre sa niche de réplication, elle pénètre activement la cellule, redirige le trafic vacuolaire, et inhibe la fusion phago-lysosomale. La présence de facteurs de virulence comme son lipopolysaccharide peu endotoxique, le β-1,2-glucan cyclique essentiel pour l'inhibition de la fusion lysosomale, et VirB, l'appareil de sécrétion de type IV nécessaire à la création d'une niche réplicative, y contribuent.
Néanmoins, le cycle invasif de *Brucella* reste peu compris. Une meilleure compréhension de ces mécanismes moléculaires pourrait être obtenue par l'identification et la caractérisation d'effecteurs de *Brucella*. En effet, beaucoup de bactéries pathogènes possèdent un appareil de sécrétion de type III ou de type IV et sécrètent des protéines bactériennes, qui ciblent des processus cellulaires, favorisant leur développement au sein de la cellule (voir partie 1.2.3 de l'introduction). La présence de VirB, appareil de sécrétion de type IV, chez *Brucella*, suggère un comportement semblable. À ce jour aucun effecteur de *Brucella* n'a été identifié. L'objectif de ce mémoire est de contribuer à l'identification d'effecteurs de *Brucella melitensis*.

Au cours d'un crible double hybride, l'identification de protéines de *Brucella* interagissant avec des protéines de l'hôte a permis de proposer des candidats effecteurs, dont la fonctionnalité devra être validée par des approches complémentaires. Au cours de ce mémoire, plusieurs expériences se référant aux caractéristiques évoquées de l'effecteur bactérien seront réalisées de manière complémentaire. Il s'agira de tester la survie de levures exprimant ces protéines de *Brucella*, de les localiser, toujours en levure, par microscopie à fluorescence, et enfin de contribuer à vérifier leur sécrétion dans la cellule hôte.

4. Résultats et Discussion

Plusieurs approches permettent d'identifier un effecteur bactérien, notamment des approches mettant en évidence une interaction avec une protéine de l'hôte, un effet cytotoxique, une localisation cellulaire particulière et la sécrétion dans la cellule hôte. Au cours de ce mémoire, les deux premières approches ont pu être appliquées afin d'identifier des effecteurs du pathogène intracellulaire *Brucella melitensis*, et la construction plasmidique de la dernière a été réalisée.

Avant la réalisation de ce mémoire, un crible de double hybride à haut débit testant les interactions éventuelles entre, d'une part, 250 protéines humaines (orthologues humains des protéines retrouvées sur les phagosome murin et les protéines de l'apoptose), des protéines de *Brucella* (protéines du flagelle et du T4SS) et, d'autre part, les protéines codées par les 3100 ORFs de *Brucella*, a été réalisé en collaboration avec le laboratoire de Marc Vidal à Boston. Etant donné la déviation de la voie phago-lysosomale par *Brucella melitensis* lors de son invasion, les protéines humaines sélectionnées sont des orthologues humains des protéines retrouvées sur le phagosome murin (Garin *et al.*, 2001). De plus, vu l'effet anti-apoptotique supposé de *Brucella* sur les cellules infectées, l'ensemble des protéines impliquées dans l'apoptose humaine (et dont les ORFs sont disponibles dans l'ORFéome humain), ont été introduites dans le crible. Enfin, des protéines de *Brucella* impliquées dans la structure de l'appareil de sécrétion de type IV et du flagelle ont également été utilisées dans ce crible parce que certains effecteurs interagissent avec le flagelle ou le T4SS avant d'être sécrétés. Dans ce crible, l'identification de candidats effecteurs se base sur les interactions de ceux-ci avec les protéines de l'hôte lors de l'invasion bactérienne. Une vingtaine d'interactions ont pu être mises en évidence dans ces conditions expérimentales dont quatre interagissant avec des protéines appartenant à la superfamille Ras.

C'est avec ces 17 effecteurs putatifs repris dans le tableau 4-1 que nous avons travaillé suivant les différentes approches évoquées : tester leur toxicité en levure ; observer leur localisation en levure ; et construire des outils pour vérifier leur sécrétion dans la cellule eucaryote.

référence	ORF	Annotation de l'ORF dans GenBank
A1	BMEI1161	Hypothetical Protein
A2	BMEI0736	Ferripyochelin binding protein
A3	BMEI1974	Diacylglycerol kinase
A4	BMEI1120	phosphotyrosyl phosphatase activator
A6	BMEI1132	ATPases of the PP superfamily
A7	BMEI1244	Transporter
A8	BMEI1291	Transcriptional regulator, AraC family
A9	BMEI0686	transcriptional regulatory protein, LYSR family
A11	BMEI1395	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase
A12	BMEI0928	Acetate CoA-transferase alpha subunit
B1	BMEI0967	NAD-dependent malic enzyme
B2	BMEII0395	Transcriptional regulatory protein, ASNC family
B3	BMEII0410	Acetylglutamate kinase
B4	BMEII0690	FrnE protein
B5	BMEII0588	FdhD protein
B6	BMEII0900	Mannose-6-phosphate isomerase
B9	BMEII1037	Zinc protease

Tableau 4-1 : Références des 17 des ORFs de *Brucella melitensis* (colonne centrale) ainsi que l'annotation des protéines pour lesquelles elles codent (colonne de droite) et qui interagissent avec au moins une protéine humaine impliquée dans l'apoptose ou dans le phagosome, ou de *Brucella* impliquées dans la formation de l'appareil de sécrétion de type IV ou du flagelle, lors d'un test double hybride en levure. La colonne de gauche présente les numéros de référence des ORFs utilisées au cours de ce mémoire.

4.1. Test de survie en levure

4.1.1. Principe et Stratégie

Le principe de ce test est d'analyser un phénotype de croissance suite à l'induction de l'expression d'une protéine bactérienne mise sous le contrôle d'un promoteur inductible.

Lesser et Miller (2001) ont utilisé cet outil pour mettre en évidence et caractériser l'action cytotoxique de certains effecteurs sécrétés par *Yersinia pseudotuberculosis* : YopD, YopE, YopH, YopJ, YopM, YpkA et LcrV. Pour cela, ils ont construit un plasmide permettant de placer un gène donné en fusion avec la GFP et sous le contrôle du promoteur p*GAL10*. L'expression des protéines de fusion est induite en levure, après transformation des constructions, par la croissance sur milieu sélectif contenant du galactose. Les levures ont été diluées de 10 en 10 et déposées sous forme de gouttes sur milieu sélectif supplémenté de 1% de raffinose et de 2% de galactose. Après deux jours de croissance à 30°C, les phénotypes de croissance ont été observés. Les souches de levures exprimant les fusions protéiques GFP des effecteurs YopD, YopH, YopJ, YopM et LcrV poussent de la même manière que les souches exprimant la GFP seule. L'expression de GFP-YopM affecte modérément la croissance de la levure, et celle des GFP-YopE et GFP-YpkA l'affecte sévèrement (Fig. 4-1).

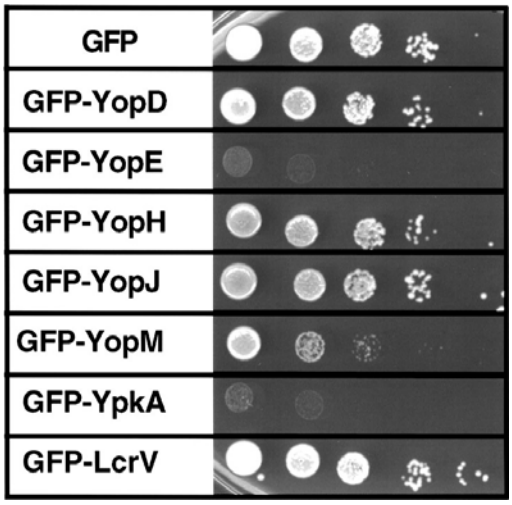


Fig. 4-1 : Photographie des gouttes de dilutions successives des cultures de levures exprimant la GFP seule, ou une fusion GFP-protéine de *Yersinia*, prises après 2 jours de croissance à 30° C sur milieu inducteur SD + raffinose 1% + galactose 2%. D'après Lesser et Miller, 2001.

Sur base de cette expérience de Lesser et Miller (2001), notre stratégie a donc été d'identifier, parmi les candidats effecteurs issus du crible double hybride, des protéines de *Brucella melitensis* qui provoqueraient un phénotype de retard de croissance similaire à celui provoqué par l'expression de YopE et YopM. Les plasmides de Lesser et Miller ont été modifiés précédemment au laboratoire, en remplaçant le gène codant un des effecteurs de *Yersinia* par une cassette Gateway (permettant le clonage aisé des ORFs de *Brucella melitensis*). Le plasmide obtenu a été appelé pGGG (pour p*GAL* GFP Gateway).

4.1.2. Résultats

4.1.2.1.Construction des plasmides pGG-ORFs

Les gènes codant pour les 20 effecteurs putatifs de *Brucella melitensis* sont sur un plasmide portant un gène de résistance à l'ampicilline, la cassette Gateway fusionnée à la GFP sous le contrôle de p*GAL10*, un promoteur inductible au galactose, et le gène *LEU2* (Fig.4-2). L'activité du promoteur *GAL10* est induite par le galactose, inhibée par le glucose et non-affectée par le raffinose.

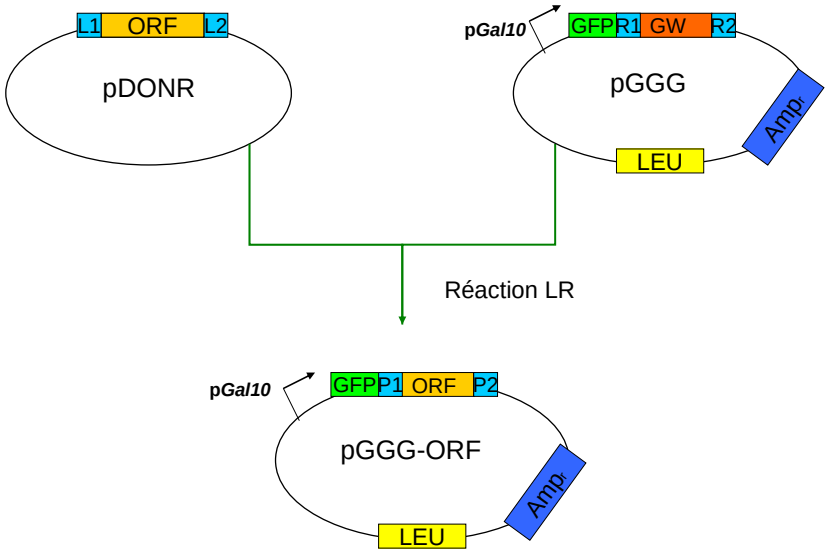


Fig. 4-2 : Représentation de la réaction LR permettant le clonage directionnel des ORFs en provenance de l'ORFéome dans le vecteur, le pGGG. L1, attL1 ; L2, attL2 ; R1, attR1 ; R2, attR2 ; P1, attP1 ; P2, attP2 : sites de recombinaison Gateway. ORF : Open Reading Frame, phase ouverte de lecture. GFP : Green Fuorescent Protein. p*Gal10* : promoteur du gène *GAL10*. GW : cassette Gateway

Ensuite, *Escherichia coli* a été transformée avec les produits de LR, les plasmides pGG-ORFs. Les pGG-ORFs des transformants sélectionnés ont été récupérés par minipréparation d'ADN plasmidique pour transformer la levure. Afin de vérifier que chaque pGGG contenait l'ORF prévue, les pGG-ORFs ont été restreints par *Eco*RI (Fig. 4-3). Deux bandes invariables de 3338 pb et de 1565 pb sont observées ainsi qu'une ou plusieurs bandes de taille variable (1700 + x pb, x étant fonction de la taille de l'ORF et de la présence ou non d'un site de restriction *Eco*RI dans celle-ci).

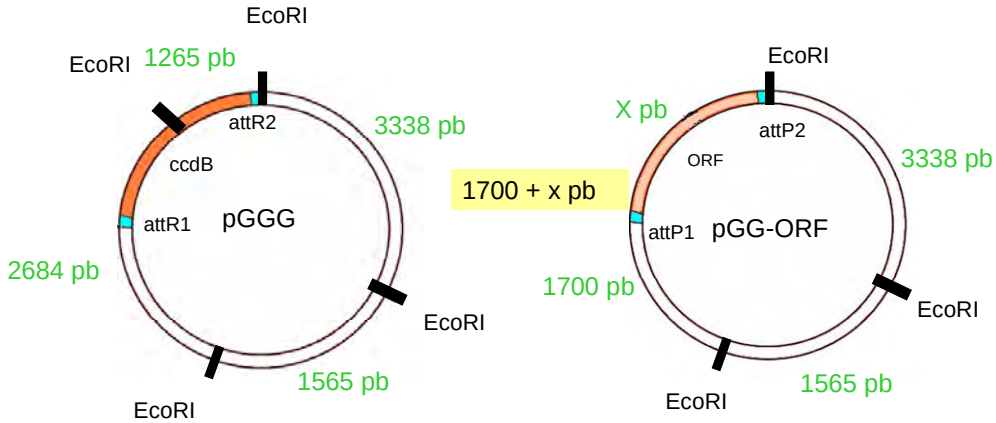


Fig. 4-3 : Représentation schématique des plasmide pGGG et pGG-ORF avec les sites de restriction de l'enzyme *Eco*RI et la taille des fragments d'ADN attendus après restriction. X représente la taille de l'ORF venue remplacer la cassette Gateway.

La figure 4-4 montre le profil de restriction sur gel d'agarose obtenu après la digestion des plasmides par l'enzyme de restriction *Eco*RI.

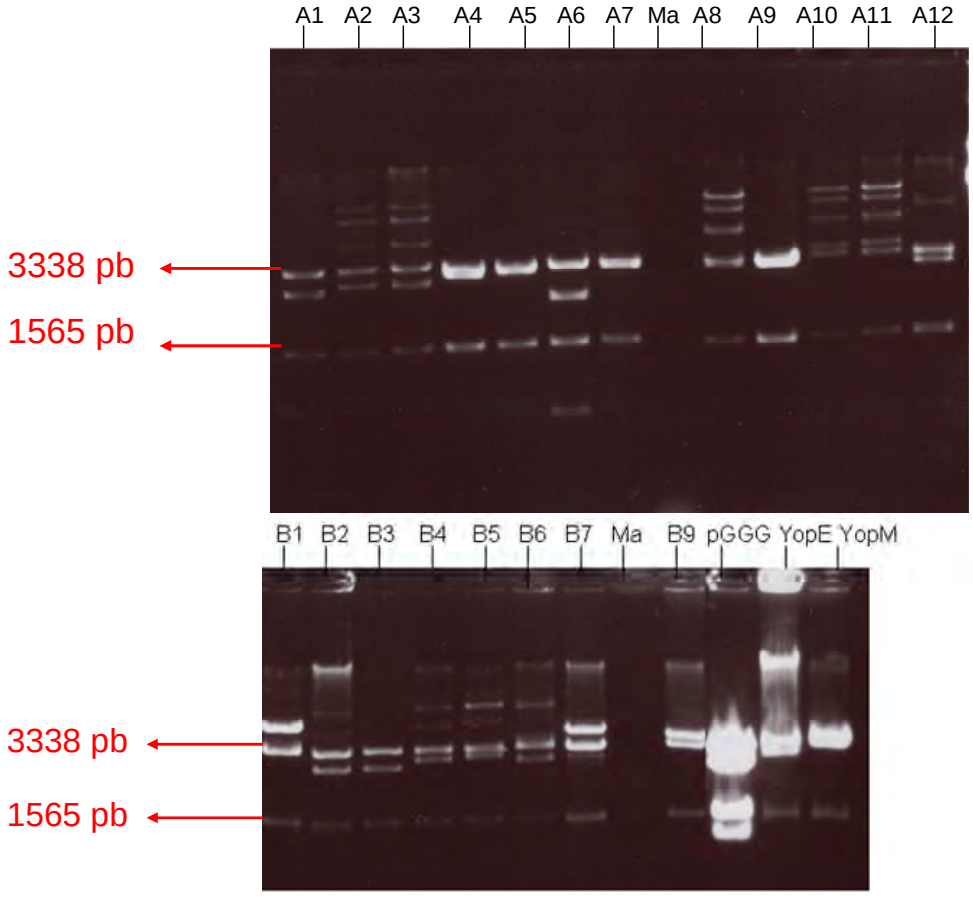


Fig. 4-4 : Photographie du profil d'électrophorèse obtenu après restriction des vecteurs pGG-ORFs, pGGG, pGG-YopE et pGG-YopM par *Eco*RI. Les numérotations des ORFs font référence au tableau 4-1. Ma correspond au marqueur de poids moléculaire smart ladder, un problème est survenu à ce niveau.

Le tableau 4-2 montre les tailles des fragments obtenus après digestion théorique par *Eco*RI. L'observation des deux tailles invariables sur les profils permet de déduire que chaque plasmide contient bien l'ORF attendue.

Vecteur	**Taille des fragments en pb**				
A1	3338	1564	2681		
A2	3338	1564	2814		
A3	3338	1564	2793		
A4	3338	1564	3054		
A5	3338	1564	3111		
A6	3338	1564	2342	820	
A7	3338	1564	3132		
A8	3338	1564	3126		
A9	3338	1564	3206		
A10	3338	1564	3615		
A11	3338	1564	3702		
A12	3338	1564	2981	347	442
B1	3338	1564	4611		
B2	3338	1564	2724		
B3	3338	1564	2708		
B4	3338	1564	2961		
B5	3338	1564	3023	70	
B6	3338	1564	2827	872	
B7	3338	1564	4148		
B9	3338	1564	3737		
pGGG	3338	1564	2684	1265	
pGG-yopE	3338	1564	4069		
pGG-yopM	3338	1564	3937		

Tableau 4-2 : Tableau reprenant la taille des fragments attendus après digestion des vecteurs pGG-ORFs, pGGG, pGG-YopE et pGG-YopM .

4.1.2.2.Transformation de la levure et test de survie

La souche GRF18 de *Saccharomyces cerevisiae*, a ensuite été transformée avec les pGG-ORFs. Quatre clones issus de chaque transformation ont été repiqués sur milieu glucose 2% SC-LEU (Fig.4-5). En effet, le risque de travailler avec une population polyclonale est important. Si, dans une population de levures exprimant une ORF devant affecter sa croissance, un des clones possède une ORF mutée dont la fonction est modifiée, celui-ci pourrait arriver à pousser normalement. Ainsi, le phénotype d'absence de croissance observé pourrait ne pas être observée. L'origine de cette mutation pourrait être liée aux étapes d'amplification lors de la construction de l'ORFéome.

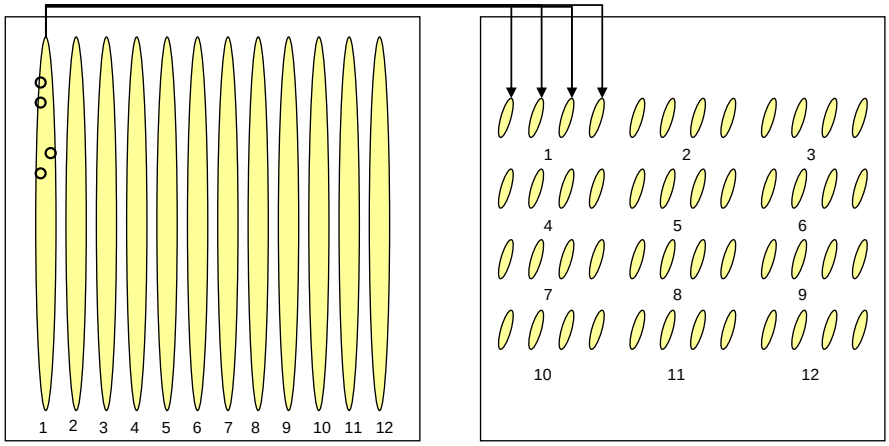


Fig. 4-4 : Représentation schématique des produits de transformation étalés sur SC-LEU glucose 2% (panneau de gauche) et du repiquage de 4 clones des levures transformées et striées sur un milieu sélectif et répresseur SC-LEU glucose 2% (panneau de droite).

Une fois les transformants sélectionnés, nous avons réalisé le test de survie proprement dit en faisant pousser des quantités décroissantes (dilutions 10^{0}, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}) des levures contenant les pGG-ORFs sur un milieu neutre raffinose 2% et sur un milieu inducteur raffinose 1% et galactose 2% .

Pour ce test un contrôle négatif a été réalisé, le pGGG vide[2], qui, exprimé en levure ne doit pas affecter sa croissance, et deux contrôles positifs exprimant des ORFs connues pour affecter la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*, pGG-YopE et pGG-YopM.

[2] Le pGGG vide, c'est-à-dire possédant toujours la cassette Gateway et donc le gène toxique *ccdB,* peut être utilisé comme contrôle de croissance, la toxicité de ce gène ayant été démontrée comme n'affectant pas la levure dans une précédente étude faite au laboratoire (Hosselet, 2005).

4.1.2.3.Résultats du test de survie

La figure 4-6 est une photographie des gouttes de dilutions successives des levures après une croissance de 4 jours à 30°C sur milieu neutre raffinose 2% (gauche de chaque double piste) et milieu inducteur raffinose 1% galactose 2% (droite de chaque double piste) pour certains des clones ainsi que pour les contrôles. Ces « spots » de levures sont issus d'une seule population monoclonale et représentent le phénotype de croissance majoritairement observé parmi les 4 populations monoclonales repiquées. Seuls les clones présentant un phénotype de croissance affectée sur milieu galactose et les contrôles sont présentés ici.

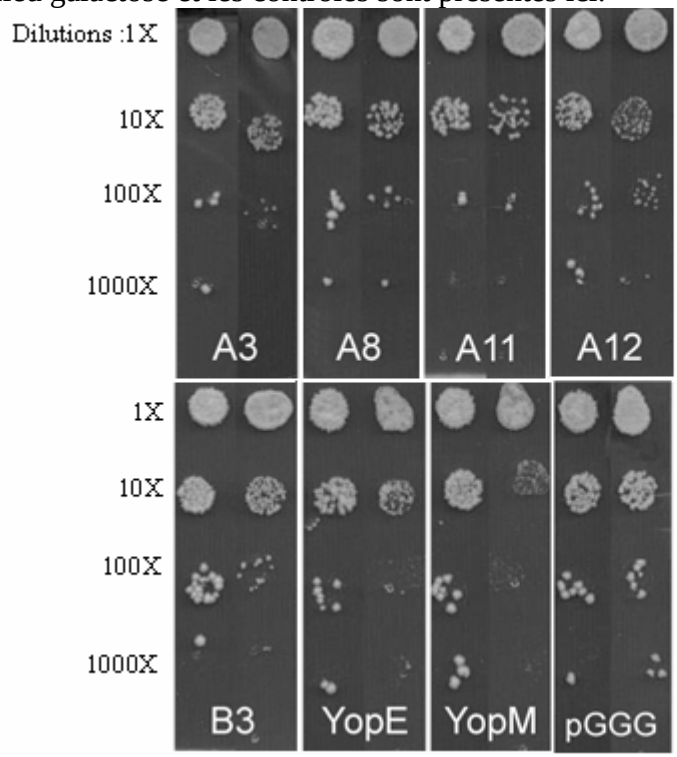


Fig. 4-6 : Photographie des levures possédant un plasmide pGG-ORF, pGG-YopE, pGG-YopM ou pGGG, ayant poussé pendant 4 jours sur raffinose (partie gauche de chaque double piste) et sur raffinose + galactose (partie droite de chaque double piste).

Comme attendu, le pGGG n'affecte pas la croissance de la levure lors de l'induction sur milieu galactose et constitue un bon contrôle positif de croissance sur ce type de milieu. Dès la dilution 10^{-1}, l'induction de l'expression de YopE en levure sur milieu galactose réduit sa croissance. L'expression de YopM provoque un effet similaire plus prononcé. Cette réduction de croissance s'observe par une diminution de la taille et du nombre des colonies. Ainsi, nous pouvons utiliser YopE et YopM comme référence de croissance négative.

Les levures contenant ces ORFs de *Brucella* correspondant à l'annotation A3, A8, A11, A12 et B3 (voir tableau 4-1) présentent un phénotype de croissance proche de celui des contrôles positifs YopE et YopM, quoique pas aussi prononcé. Les deux ORF montrant un phénotype de croissance le plus proche de YopE et YopM sont A3 et B3. A12 a été présentée par deux populations monoclonales de levures différentes, A12a et A12b, où seule A12b est affectée.

4.1.3. Discussion

4.1.3.1.Saccharomyces cerevisiae, un modèle eucaryote

Saccharomyces cerevisiae constitue un bon modèle eucaryote pour analyser différents facteurs de virulence bactériens vu la conservation de nombreux mécanismes cellulaires qui peuvent être affectés (métabolisme de l'ADN, mort cellulaire, contrôle du cycle cellulaire, dynamique du cytosquelette et trafic membranaire) durant une infection bactérienne.

L'avantage d'utiliser la levure comme modèle eucaryote est lié à sa manipulation génétique aisée, à la simplicité d'un modèle unicellulaire possédant des fonctions cellulaires variées, à l'abondance d'outils postgénomiques pour ce modèle, et à l'existence de banques de données génétiques et phénotypiques très fournies.

Beaucoup d'études ont été réalisées faisant exprimer diverses protéines bactériennes en levure afin de montrer qu'elle constitue un bon modèle et surtout en vue de caractériser la fonction de ces protéines. Ainsi Lesser et Miller (2001) ont pu montrer qu'une protéine de *Yersinia*, YopE, était une protéine activatrice de Rho GTPases (RhoGAP) qui inactivait RhoA, Rac1 et Cdc42, bloquant la polarisation du cytosquelette et la progression du cycle cellulaire de la levure et induisant des effets cytotoxiques. Hassane et ses collaborateurs (2001) ont pu démontrer que la toxine CdtB (cytolethal distending toxin), sécrétée par certaines bactéries comme *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* et *Shigella* spp., et connue pour bloquer la progression du cycle cellulaire dans les cellules mammaliennes au point de transition précédent la mitose, G_2/M , possède des actions génotoxiques dans la levure et ce par des dommages directs causés à l'ADN. L'équipe de Franck a utilisé la levure pour mieux comprendre la fonction d'une protéine sécrétée par *Pseudomonas aeruginosa*, ExoU, qui exprimée en levure affectait la viabilité de celle-ci (Sato *et al.*, 2003). Toutes ces études de caractérisation de protéines de virulence bactériennes sont basées sur l'assurance de l'implication et de la sécrétion de ces protéines lors de l'infection bactérienne.

Une étude récente (Campodonico *et al.*, 2005) a permis d'identifier et de caractériser un nouvel effecteur bactérien perturbant la croissance de la levure en criblant le génome bactérien en entier. Ainsi, la protéine YlfA a été caractérisée comme étant une protéine transférée par l'appareil Dot/Icm de *Legionella pneumophila* à partir de son caractère létal pour la levure. Sur base de cette étude et à plus petite échelle, notre méthode a été de cribler un pool d'ORFs, sélectionnées suite à un crible d'interactions protéiques en double hybride, en vue d'identifier des effecteurs bactériens putatifs *de novo*. Ainsi nous avons exprimé en levure des ORFs de *Brucella melitensis* qui pourraient coder des protéines effectrices et identifié certains phénotypes de croissance affectée. YopE et YopM ont été utilisés comme contrôles. Cette méthode a permis d'identifier des protéines effectrices candidates qui devront être soumises à des caractérisations supplémentaires pour affirmer qu'il s'agit bien d'effecteurs. Remarquons que le phénotype de croissance des levures contenant les ORFs bactériennes n'est jamais aussi altéré que celui des levures contenant YopE et YopM.

4.1.3.2.Limites de l'approche

Nous avons travaillé avec des protéines de *Brucella melitensis* ayant été mises en évidence comme interagissant avec certaines protéines humaines dans un crible double hybride en levure. Comme la technique du double hybride possède ses limites, cela implique l'existence potentielle de faux positifs dans les interactions protéiques relevées, et de faux négatifs non identifiés introduisant dès le départ un biais dans les expériences et les résultats futurs. En effet, dans le double hybride trois cas de faux positifs sont envisageables et correspondent à l'activation du gène rapporteur, indépendamment de toute interaction avec la seconde protéine testée (auto-activateur), par l'intermédiaire d'une protéine eucaryote interagissant avec celles

testées (« triple hybride »), ou encore ne se produisant que dans les conditions expérimentales, l'interaction protéique étant impossible dans les conditions réelles, les protéines étant exprimées dans des compartiments cellulaires différents ou à des moments différents. Les faux négatifs peuvent provenir d'une interaction protéique existant dans les conditions réelles mais n'ayant pas été mise en évidence dans les conditions expérimentales, ceci résultant, par exemple, d'une mauvaise conformation d'une des protéines d'intérêt par exemple due à l'absence d'un troisième acteur bactérien ou à la présence d'un troisième acteur eucaryote modifiant celle-ci à un niveau post-traductionnel. Un certain nombre de faux positifs peuvent être éliminés par des tests d'auto-activation ou « simple hybride », par contre les faux négatifs sont difficilement identifiables et évitables. Ainsi, la technique du double hybride ne donne qu'un échantillon des protéines de *Brucella melitensis* capables d'interagir avec des protéines humaines, mais permet d'avoir une liste de protéines susceptibles d'être des effecteurs potentiels bactériens, qui pourra servir de point de départ pour des manipulations ultérieures.

Le test de croissance en levure a aussi ses faux positifs et ses faux négatifs. Les faux positifs présentent une croissance altérée de la levure alors que la protéine bactérienne dont l'expression est induite ne devrait pas l'affecter. Ces faux positifs peuvent, par exemple, résulter de la surexpression d'une protéine bactérienne venant perturber la physiologie de la levure. Les faux négatifs correspondent à une croissance normale de la levure alors qu'elle devrait être affectée par l'induction de l'expression de la protéine bactérienne. Ils peuvent provenir, par exemple, d'une mauvaise conformation de la protéine bactérienne due à l'absence d'un second acteur bactérien venant normalement la modifier à un niveau post-traductionnel. Une autre source de faux négatifs est l'absence de production de la protéine bactérienne, par exemple en raison d'un biais des codons inadapté à la levure. Lors de l'application de ce test à l'identification d'effecteurs bactériens *de novo*, le nombre de faux positifs peut être réduit par élimination des protéines codées par des gènes qui trouvent des homologies chez de nombreuses bactéries. Quant à l'expression de la protéine en levure, elle peut être vérifiée par western blot en utilisant des anticorps anti-GFP ou encore en observant la fluorescence au microscope. Les résultats obtenus lors de la localisation des protéines de fusion en microscopie à fluorescence (voir figure 4-11) permettent également de détecter la production de celles-ci.

De plus, la construction plasmidique utilisée peut être la source de certaines complications. Pour rappel, les gènes codant les protéines bactériennes sont mis sous le contrôle d'un promoteur fort inductible au galactose et fusionnés au gène codant la GFP. La fusion à la GFP risque de déstabiliser la conformation initiale de la protéine et de masquer un effet toxique pour la levure.

4.1.3.3.Exploitation des phénotypes de croissance des levures

Nous avons vu que l'expression des ORFs correspondant à A3, A8, A11, A12 et B3 affectaient la croissance de la levure. La question est de savoir si celles-ci codent pour des effecteurs de *Brucella melitensis*. Rappelons que dans le cadre de ce mémoire un effecteur a été considéré comme étant une protéine qui une fois sécrétée dans la cellule eucaryote interagissait avec une protéine de l'hôte en modulant sa fonction. Il est important de noter que le test de survie ne permet que d'identifier des protéines bactériennes toxiques pour la levure et que tous les effecteurs bactériens ne sont pas toxiques. La figure 4-1 relative à l'expérience de Lesser et Miller montre que certains effecteurs de *Yersinia* (YopD, YopH, YopJ et LcrV) ne sont pas toxiques une fois exprimés en levure.

Parmi les résultats obtenus, l'analyse bioinformatique des séquences des protéines affectant la croissance de la levure permet de donner des informations supplémentaires quant à une fonction possible de ces protéines en levure. En effet, les protéines codées par les ORFs A8, A11 et A12 correspondent, selon l'annotation GenBank, à des protéines impliquées dans le métabolisme bactérien, respectivement dans le métabolisme de l'arabinose, le métabolisme du mannose et du fructose, et dans la synthèse des acides gras et du cholestérol. Ces protéines pourraient induire des altérations dans la physiologie de la levure, par exemple dues à des altérations de leurs flux métaboliques. De telles perturbations pourraient être provoquées par la surexpression d'enzymes métaboliques quelconques. Dès lors, les protéines A8, A11 et A12 peuvent ne pas constituer des effecteurs intéressants.

Les ORFs A3 et B3 sont annotées comme étant des kinases. Ces deux ORFs présentent une homologie de séquence avec des gènes présents chez des espèces bactériennes proches de *Brucella melitensis*, Le tableau 4-3 rappelle les protéines humaines avec lesquelles ces deux protéines interagissaient dans le crible double hybride.

référence	ORF *Brucella melitensis*	annotation de l'ORFéome	ORF humaines	annotation de l'ORFéome
A3	BMEI1974	Diacylglycérol kinase	11085@A12	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2
B3	BMEII0410	Acetylglutamate kinase	11077@A04	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)
			11003@E12	nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)
			11085@A12	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2
			11044@G08	PERP, TP53 apoptosis effector

Tableau 4-3 : Tableau reprenant les résultats du crible double hybride mettant en évidence les interactions, entre les protéines codées par les ORFs d'intérêt et certaines protéines humaines.

Ces protéines humaines sont soit des composants impliqués dans l'apoptose, soit une petite protéine G. Il est envisageable que ces kinases modifient l'activité d'une de ces protéines humaines par phosphorylation lors de l'invasion de *Brucella melitensis* dans la cellule eucaryote. Néanmoins il faut rester prudent quant à l'annotation des protéines de l'ORFéome. Une manière de vérifier si ces protéines sont des kinases est de réaliser un test enzymatique *in vitro*.

Afin de déterminer si ces deux protéines bactériennes sont des effecteurs de *Brucella melitensis* il faudrait vérifier leur sécrétion lors de l'infection en cellule. L'utilisation d'une technique comme le tag Lumio permet de visualiser cette sécrétion. La création de mutants des effecteurs putatifs permettrait de caractériser l'action de ceux-ci lors de l'infection, s'il n'y a pas de redondance dans les fonctions des divers effecteurs sécrétés.

4.2. Localisation cellulaire microscopique

4.2.1. Principe et Stratégie

Pour une première caractérisation d'une protéine de virulence bactérienne, et afin d'obtenir des indices quant à sa fonction potentielle, une stratégie est d'observer une éventuelle localisation subcellulaire de cette protéine exprimée en levure.

Lesser et Miller (2001) ont validé cette approche en levure, en comparant la localisation de protéines de *Yersinia* (YopD, YopE, YopH, YopJ, LcrV, YpkA et YopM), dans *Saccharomyces cerevisiae* avec celle qui est connue en cellule eucaryote. Pour cela, la construction plasmidique utilisée pour réaliser le test de survie en levure a à nouveau été utilisée pour transformer la levure. Après une heure d'induction de l'expression du gène fusionné ils ont observé les levures exprimant chaque protéine de fusion au microscope à fluorescence (Fig. 4-7). GFP-YopE, GFP-YopJ et GFP-LcrV se localisent dans le cytoplasme, tandis que GFP-YpkA se localise au niveau de la membrane plasmique et GFP-YopM dans le noyau de la levure (cette observation étant facilitée par le marquage de l'ADN au DAPI). Ainsi la localisation subcellulaire des protéines de fusion GFP-YopE, GFP-YopH, GFP-YopM et GFP-YpkA coïncidait avec celle mise en évidence après le transfert de ces protéines par *Yersinia* dans la cellule mammifère. Cette étude conclut que la levure pourrait constituer un modèle pour l'identification et/ou la caractérisation de la localisation subcellulaire de protéines de virulence bactériennes.

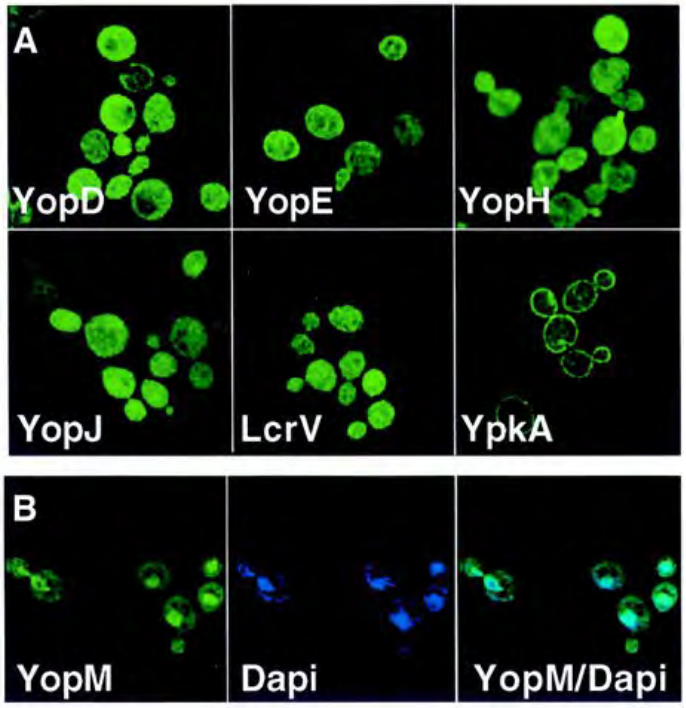


Fig. 4-7 : Photographie de microscopie à fluorescence montrant des levures exprimant les protéines fusionnées à la GFP (vert) après 1h d'induction (A et B). (B) Les levures ont été fixées et marquées au DAPI (Bleu) pour permettre la visualisation de l'ADN et la co-localisation Yop-M/Noyau. Lesser et Miller, 2001.

La stratégie abordée ici, est d'observer la localisation subcellulaire d'un effecteur putatif de *Brucella melitensis* fusionné à une protéine fluorescente, la GFP (Green Fluorescent Protein), dans la levure, en microscopie à fluorescence. Cette localisation nous renseignerait sur la fonction de l'effecteur bactérien lors de l'invasion de *Brucella*. Nous avons appliqué cette stratégie à la liste des 17 effecteurs putatifs de *Brucella melitensis*.

4.2.2. Résultats

Afin de localiser les protéines codées par des ORFs de *Brucella melitensis* dans la levure, les levures transformées avec les pGG-ORFs, utilisées pour le test de survie en levure, ont été utilisées.

Après une préculture en milieu SD raffinose 2%, une culture en milieu SD raffinose 2% (neutre) et en milieu SD raffinose 1% galactose 2% (inducteur) a été réalisée. Après 4h de croissance, nous avons observé les levures en phase exponentielle de croissance au microscope photonique et à fluorescence. Ces étapes sont représentées à la figure 4-9.

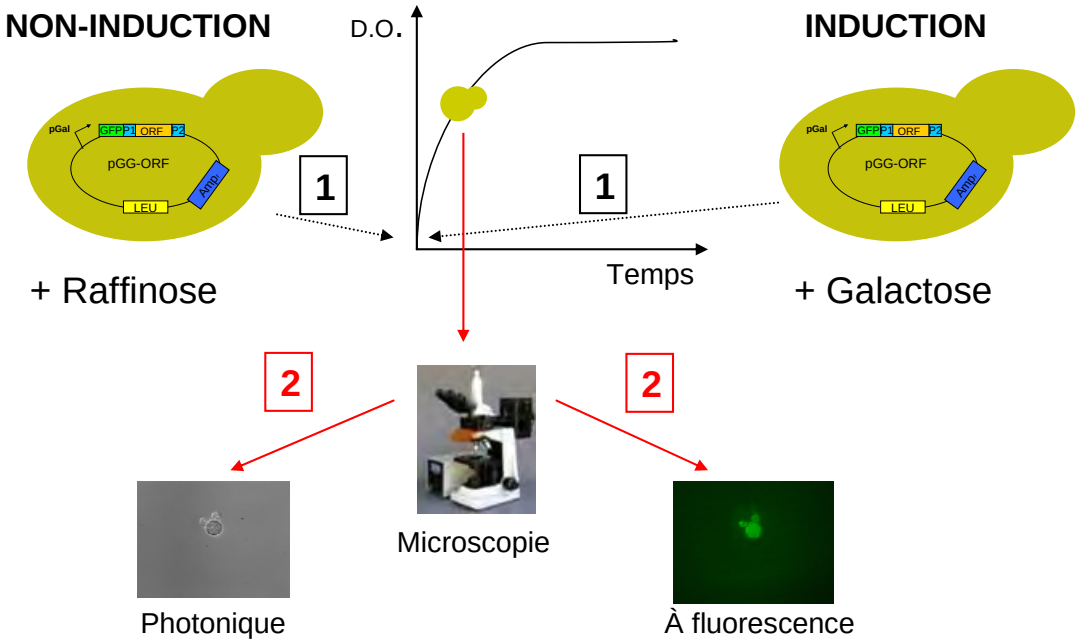


Fig. 4-8 : Représentation schématique de (1) la croissance des levures sur milieu neutre et inducteur et (2) de l'observation au microscope photonique et à fluorescence, après 4h de croissance des levures (se retrouvant en phase exponentielle).

Pour ce test un contrôle censé ne présenter aucune localisation particulière, le pGGG vide, un contrôle de localisation cytoplasmique, le GFP-YopE, et un contrôle de localisation nucléaire, le GFP-YopM ont été réalisés.

Dans les conditions non-induites un taux basal de fluorescence est observé, ce taux est lié à une expression minimale des GFP-ORFs, le raffinose ne bloquant pas l'activité du promoteur p*Gal10* (Fig. 4-10). La fluorescence observée dans ces conditions non-induites correspond à un petit échantillon de protéines GFP-ORFs exprimées, dont la localisation subcellulaire n'est pas distinctement observable. C'est pourquoi, seulement les résultats de microscopie relatifs à la croissance en milieu inducteur seront analysés

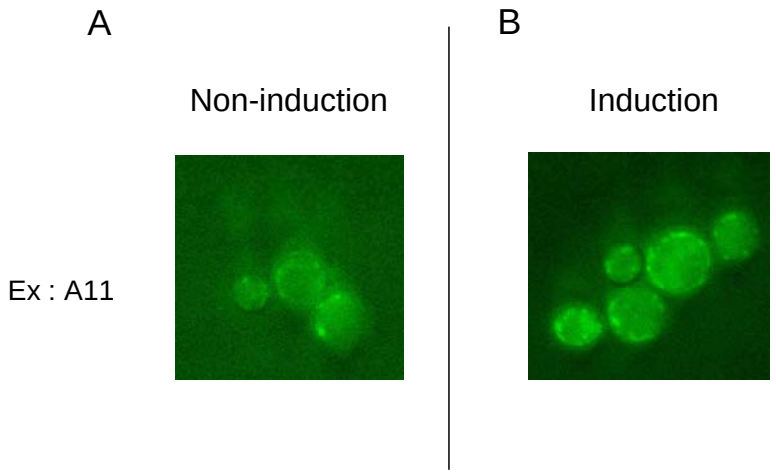


Fig. 4-9 : Représentation du taux de fluorescence observée en levure (A) en condition non-induite (raffinose) et (B) en condition induite (galactose) présenté par la levure contenant la construction GFP-A11. FT, facteur de transcription.

La figure 4-10 présente les photographies prises lors de l'observation au microscope des levures ayant poussé en condition induite.

La fluorescence observée dans la levure exprimant la GFP codée sur le pGGG vide, est soit localisée sous forme de granules, soit diffuse dans la levure. La localisation de la fluorescence GFP-YopE et GFP-YopM a été vérifiée comme localisant dans respectivement le cytoplasme et le noyau pour les constructions pGG-YopE/M.

D'une manière générale, la fluorescence observée dans les levures exprimant les GFP-ORFs est sous forme de points, est diffuse dans la levure, ou encore se trouve en périphérie membranaire. A part pour la fluorescence liée à l'expression de la GFP-A8, qui semble être localisée dans le cytoplasme, la comparaison aux contrôles (YopE et YopM) ne permet pas à elle seule d'identifier de localisation subcellulaire pour les protéines de fusion restantes. Cependant, d'autres méthodes, dont nous discuterons ci-après, sont envisageables et ce, toujours sur base des images obtenues en condition d'induction.

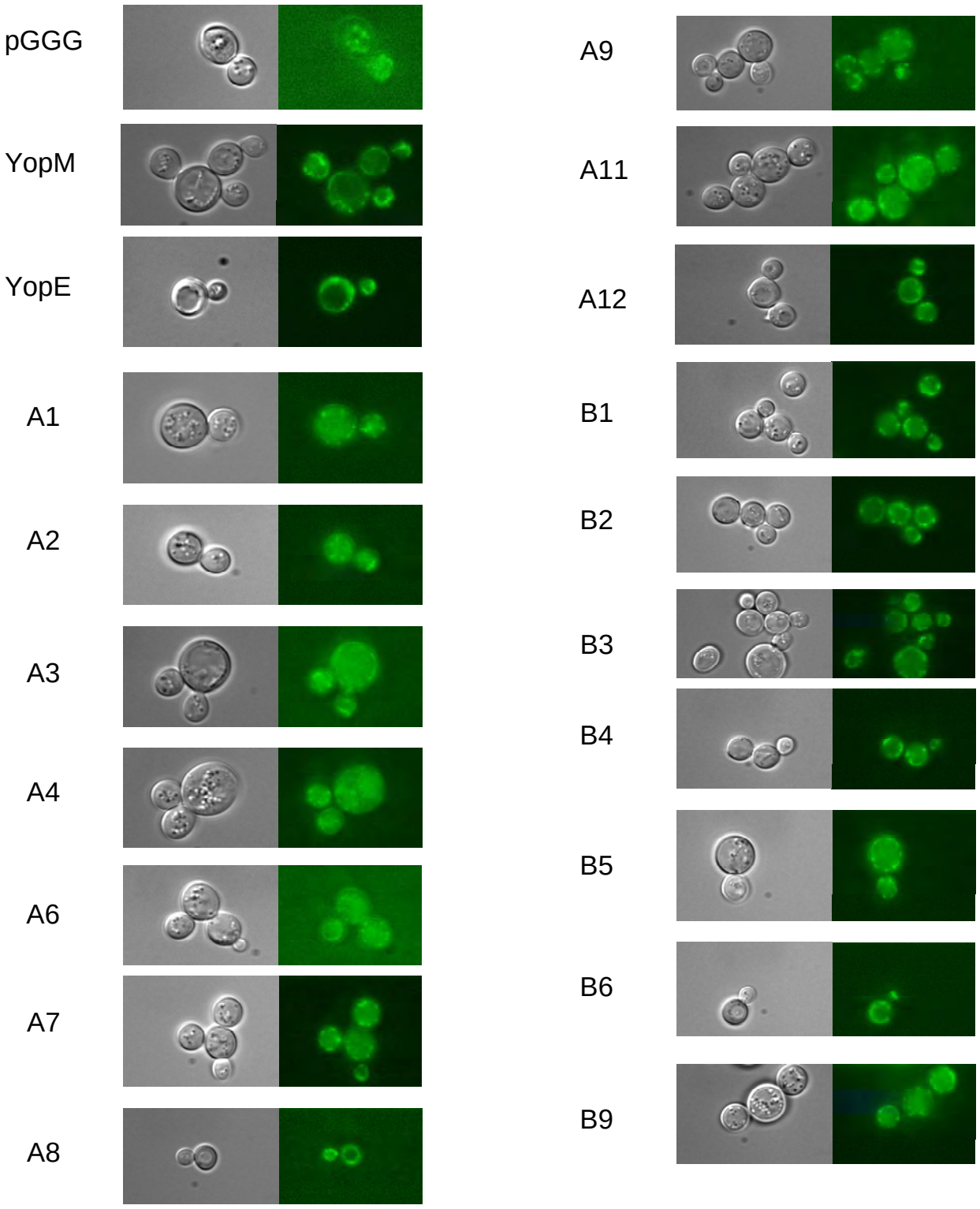


Fig. 4-10 : Photographies des résultats obtenus en microscopie à contraste de phase (à gauche) et à fluorescence (à droite) pour les levures ayant poussé en milieu contenant du galactose. Les annotations font référence au tableau 4-1.

4.2.3. Discussion

Afin d'avoir une idée de la localisation des GFP-ORFs, les résultats ont été comparés à ceux d'une banque de donnée de localisation des différents constituants de la levure (http://yeastgfp.ucsf.edu.). Celle-ci a été réalisée par Won-Ki Huh et ses collaborateurs (2003) lors d'une analyse globale de la fluorescence pour la majorité des protéines de *Saccharomyces cerevisiae* fusionnées à la GFP en C-terminal. Cette analyse permet de donner un indice de la localisation de deux GFP-ORFs, la GFP-A3 et la GFP-B6, qui semblent se localiser respectivement en périphérie de la membrane ou au niveau de la mitochondrie. En effet, la fluorescence associée à l'expression de GFP-A3 est localisée le long de la membrane plasmique et celle de GFP-B6 en filaments ou en zones denses dans la levure et ressemble à une localisation mitochondriale dans la banque de donnée (Fig. 4-11).

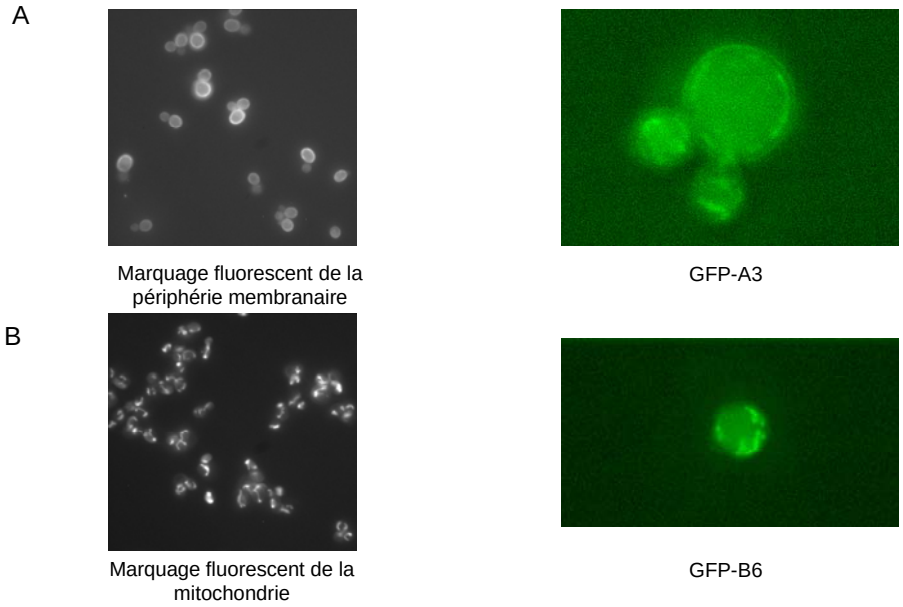


Fig. 4-11 : (A) Photographie de la fluorescence caractérisant la périphérie membranaire de *Saccharomyces cerevisiae* (**http://yeastgfp.ucsf.edu**.) et celle similaire associée à la GFP-A3. (B) Photographies de la fluorescence caractérisant la mitochondrie de *Saccharomyces cerevisiae* (**http://yeastgfp.ucsf.edu**.) et celle similaire associée à la GFP-B6.

La localisation des autres GFP-ORFs se caractérise par des granules de fluorescence plus marqués, par une fluorescence proche de la membrane et/ou par une fluorescence peu présente et diffuse. Ces caractéristiques ne suggèrent pas une localisation particulière. En effet ce type de localisation de la fluorescence peut être associé à un grand nombre de constituants de la levure tels que les endosomes, les peroxysomes, l'actine, le réticulum endoplasmique, les vésicules allant du RE à l'appareil de Golgi, l'appareil de Golgi, l'appareil de Golgi tardif et la périphérie membranaire (fig. 4-12).

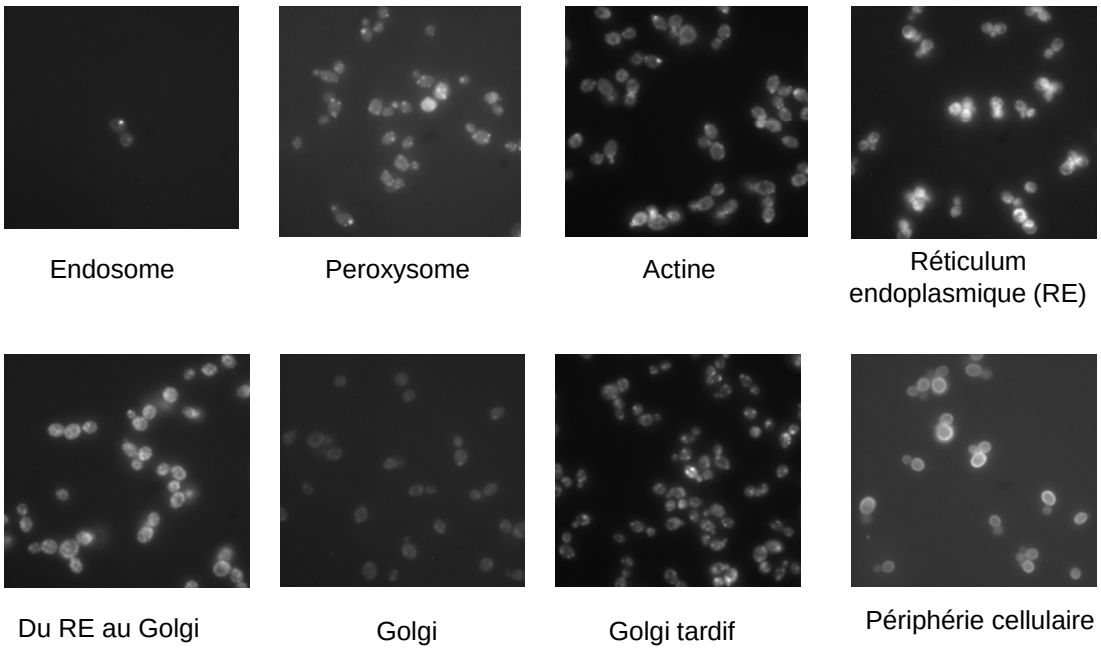


Fig. 4-12 : Photographies de la fluorescence associée à certains constituants de *Saccharomyces cerevisiae* (dont l'endosome, le peroxysome, l'actine, le réticulum endoplasmique, les vésicules transitant du RE au Golgi, le Golgi, le Golgi tardif ainsi que la périphérie nucléaire ; http://yeastgfp.ucsf.edu.) et caractérisée par un signal diffus, ponctuel ou en périphérie membranaire.

Cette analyse de localisation reste très préliminaire. Seules des expériences de co-localisation des marqueurs des constituants cellulaires ou par immunocytochimie permettraient de déterminer une localisation subcellulaire précise des protéines considérées. De plus, l'utilisation d'une fusion GFP pour localiser des protéines bactériennes peut engendrer des changements. Lors de cette expérience, seule une fusion N-terminale a été utilisée.

En résumé, plusieurs GFP-ORFs semblent se localiser dans la levure : GFP-A3 en périphérie membranaire, GFP-B6 au niveau de la mitochondrie, et GFP-A8 au niveau du cytoplasme. Le tableau 4-4 reprend les interactions trouvées dans le crible double hybride avec les protéines humaines pour les protéines codées par les ORFs correspondant à A3, A8, et B6.

référence	ORF *Brucella melitensis*	annotation de l'ORFéome de *Brucella melitensis*	plate position ORF humaines	annotation de l'ORFéome humain
A3	BMEI1974	Diacylglycerol kinase	11085@A12	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2
A8	BMEI1291	Transcriptional regulator, AraC family	11019@D06	RAB7, member RAS oncogene family-like 1
B6	BMEII0900	Mannose-6-phosphate isomérase / Mannose-1-phosphate guanylyltransférase (GDP)	11010@E11	tubulin, alpha 2, transcript variant 2

Tableau 4-4 : Tableau reprenant les protéines *de Brucella melitensis* pour lesquelles nous avons pu déterminer une localisation en levure et leurs interactions trouvées en double hybride entre certaines protéines humaines.

Selon l'annotation de l'ORFéome, les trois protéines bactériennes identifiées correspondent à une kinase, un régulateur tanscriptionnel et une isomérase ou une guanylyltransférase. La question est de savoir si ces protéines correspondent à un effecteur potentiel de *Brucella melitensis*. Comment ces protéines pourraient-elles agir pour faciliter l'invasion de *Brucella melitensis* ?

Plusieurs hypothèses peuvent être faites sur base de l'annotation de l'ORFéome et/ou du crible double hybride. Cependant il faut rester prudent dans l'élaboration d'hypothèses concernant la localisation ainsi que la fonction de ces effecteurs potentiels. En effet les localisations subcellulaires se basent soit sur une localisation similaire à un des contrôles utilisé dans l'expérience, soit sur une banque de données de localisation des protéines de la levure. Des expériences de co-localisation sont nécessaires pour déterminer une localisation subcellulaire précise. De plus, il est important de rappeler que la technique du double hybride possède ses limites. Ainsi, les interactants humains trouvés pour les protéines d'intérêt peuvent être des faux positifs, ou encore ne pas constituer l'ensemble des interactions existantes dans les conditions réelles. Enfin, les annotations de l'ORFéome de *Brucella melitensis* et humain ne sont pas fiables à 100%.

La localisation cytoplasmique du régulateur transcriptionnel permet d'envisager plusieurs hypothèses. Selon le crible double hybride, cette protéine interagit avec Rab7, une protéine marquant les endosomes tardifs. Or la fluorescence observée ne correspond pas à la fluorescence associée à l'endosome. Ceci peut être expliqué par une mauvaise conformation de la protéine liée à la fusion GFP ou à la condition expérimentale, ou par la présence d'un faux positif dans le crible double hybride. De plus, son interaction avec Rab7 n'implique pas forcément une localisation endosomale, celle-ci nécessitant peut-être la présence d'un stimulus donné.

L'enzyme impliquée dans le métabolisme du mannose se localiserait en région mitochondriale. Cette localisation étrange met en doute l'annotation de la protéine dans l'ORFéome de *Brucella melitensis*, néanmoins supposée par l'utilisation d'outils bioinformatique (BLAST). De plus, selon le crible double hybride, cette protéine interagirait avec une sous-unité de la tubuline humaine, dont l'orthologue chez la levure se localise dans le noyau et le cytoplasme. La localisation observée de cette protéine laisse supposer qu'elle pourrait interagir avec une protéine mitochondriale, n'ayant pas été testée dans le crible double hybride,mais dont l'interaction n'est pas biologiquement relevante.

Enfin, la suggestion d'une localisation en périphérie membranaire de la diacylglycérol kinase semble être confirmée par une localisation similaire pour l'homologue en levure (Gpa2p) de la protéine humaine identifiée comme interagissant avec la protéine d'intérêt en double hybride. L'implication de Gpa2p dans la physiologie de la levure est très vaste.

4.3. Vérification de la sécrétion des effecteurs putatifs

4.3.1. Principe et stratégie

Le principe de la méthode est de détecter la sécrétion des effecteurs putatifs dans la cellule eucaryote à l'aide d'un composé facilement détectable lorsqu'il se lie à un tag fusionné à une protéine d'intérêt. Comme vu précédemment, une des manières de mettre en évidence la sécrétion d'une protéine bactérienne est de lui fusionner un tag Lumio. Si cette protéine chimérique est sécrétée dans le cytosol de la cellule eucaryote, il sera possible, après avoir préablement incubé la cellule avec le réactif Lumio, d'observer un signal de fluorescence à 528nm, après une excitation à 508nm.

La stratégie envisagée est de fusionner le tag Lumio en amont ou en aval des ORFs codants des effecteurs putatifs de *Brucella melitensis* et d'observer lors de l'infection de macrophages par *Brucella melitensis* contenant la protéine fusionnée s'il y a émission d'un signal de fluorescence à 528nm. Réaliser la fusion du tag Lumio en amont ou en aval de l'ORF permet de minimiser les risques liés à la dissimulation de séquences de reconnaissance de l'appareil de sécrétion de type IV pouvant être situées en C-terminal ou en N-terminal, respectivement.

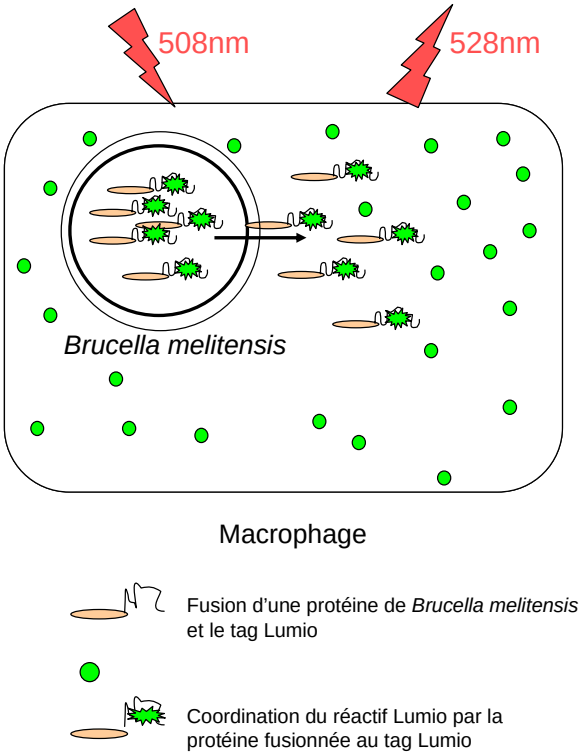


Fig. 4-11 : Représentation schématique (A) du mécanisme de sécrétion de protéines de fusion protéine de *Brucella melitensis*-tag Lumio.

Au cours d'un travail précédant (Hosselet, 2005), deux plasmides contenant un promoteur p*lac* constitutif chez *Brucella melitensis* en amont d'une construction soit cassette Gateway-tag Lumio, soit tag Lumio-cassette Gateway, toutes deux suivies d'un codon stop ont été construits. Ces plasmides ont été appelés pGEM-T-Lumio. Afin que la séquence de la cassette Gateway et celle du tag Lumio soient en phase, deux cassettes Gateway différentes ont été utilisées : la rfC1 (Invitrogen corporation) pour la construction Lumio en C-terminal et la rfAB (Jamet, données personelles) pour la construction Lumio N-terminal. La figure 4-12 représente les deux vecteurs ainsi que la position des sites de restriction importants pour la suite de la construction.

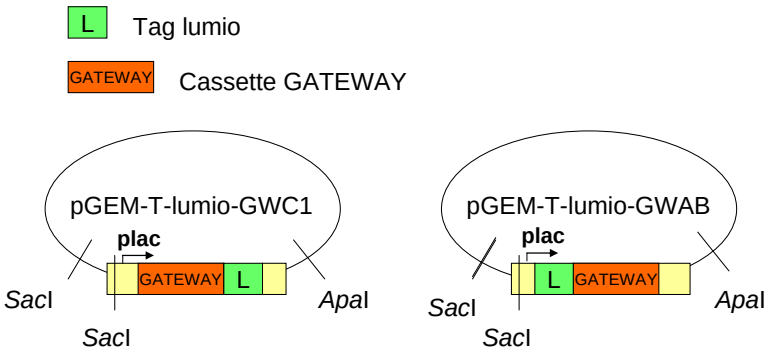


Fig. 3-12 : Représentation schématique de la construction des vecteurs pGEM-T-Lumio composés d'un promoteur p*lac* régulant l'expression des gènes en aval, soit la cassette Gateway C1 suivie du tag Lumio (à gauche), soit le tag Lumio suivi de la cassette Gateway AB (à droite). *Sac*I et *Apa*I sont les enzymes de restriction permettant la récupération de la construction prédécrite.

4.3.2. Construction des plasmides pLUM-N/C.

Les pLUM-N/C ont été construits afin d'obtenir la construction Lumio dans un plasmide réplicatif chez *Brucella melitensis*. Après une étape de restriction des pGEM-T-Lumio-GWAB/C1 et du pBBR-1-MCS par les enzymes de digestion *Apa*I et *Sac*I, les fragments d'ADN contenant la construction Lumio ont été ligués dans le pBBR-1-MCS. La figure 4-13 représente de manière schématique la restriction des plasmides par les enzymes *Apa*I et *Sac*I ainsi que les constructions finales attendues.

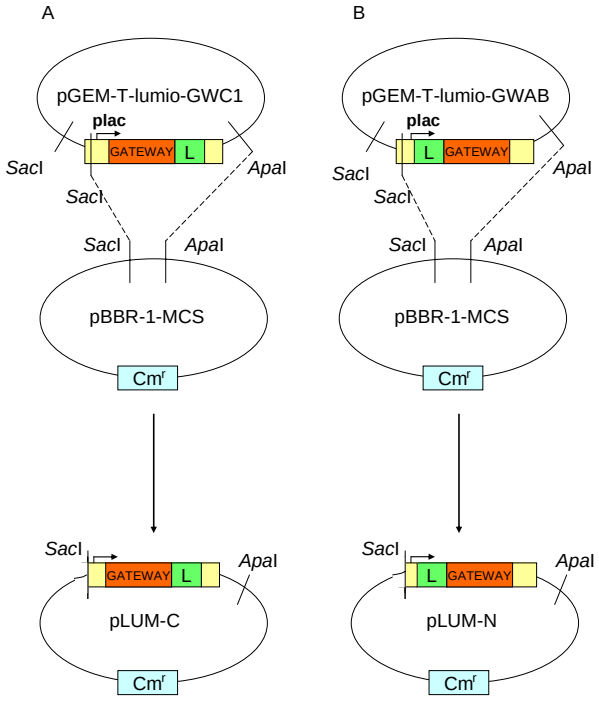


Fig. 4-13 : Représentation schématique de la construction du pLUM-C (A) et du pLUM-N (B), après restriction du pGEM-T-Lumio-GWC1/AB par les enzymes *ApaI* et *SacI* et ligation du fragment d'ADN contenant la construction Lumio dans le pBBR-1-MCS portant un gène de résistance au chloramphénicol et préalablement restreint par *Apa*I et *Sac*I.

Comme les cassettes Gateway portent un marqueur de résistance au même antibiotique que le pBBR-1-MCS, la stratégie de construction a dû être réitérée plusieurs fois. Il est obligatoire d'utiliser le pBBR-1-MCS car le vecteur doit être réplicatif dans *Brucella* et que seulement certains antibiotiques peuvent être utilisés pour sélectionner les transformants dans *Brucella*. En effet l'utilisation de l'ampicilline ne permet pas toujours de sélectionner efficacement des transformants de cette bactérie et l'utilisation de la rifampicine ou de la

tétracycline est interdite pour des raisons de sécurité car ces antibiotiques sont prescrits lors du traitement de la brucellose.

Afin de vérifier que le vecteur pBBR-1-MCS a bien été restreint par *Sac*I et *Apa*I, un aliquot du produit de digestion de pBBR-1-MCS coupé par ces enzymes de restriction a servi à transformer une souche de *E. coli*. Le nombre de clones apparaissant sur milieu chloramphénicol correspond au nombre de vecteurs non-restreints. Malgré la purification du pBBR-1-MCS ouvert par *SacI* et *Apa*I, les petits fragments libérés par cette restriction, des plasmides à moitié ou non restreints, peuvent persister dans les produits de purification. Afin que le fragment d'intérêt provenant du pGEM-T-Lumio puisse s'intégrer dans le pBBR-1-MCS, une grosse quantité d'inserts (10 fois plus que de vecteurs) a été utilisée.

Plusieurs clones de *E. coli*, après avoir été transformés avec les produits de ligation, ont été sélectionnés afin de vérifier que la construction plasmidique était bien celle attendue. Les plasmides récupérés ont été restreints par *Apa*I et *Sac*I. Deux plasmides sur 6 présentaient un profil de restriction attendu pour la construction pLUM-C et un seul sur 6 pour la construction pLUM-N (Fig. 4-14).

A

	Taille en pb des fragments d'ADN attendus après restriction par *Apa*I et *Sac*I		
pLUM-N	4681	1269	743
pLUM-C	4657	1295	743
pBBR-1-MCS	3956		743

B

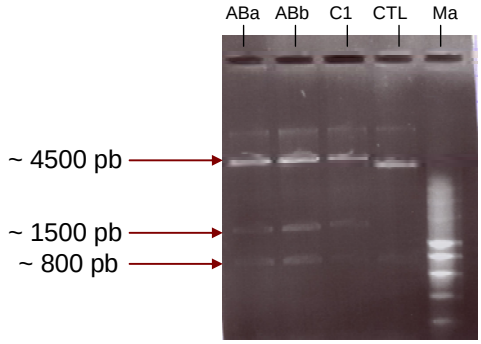


Fig. 4-14 : (A) Tableau présentant la taille des fragments d'ADN attendus après restriction des pLUM-N/C et du pBBR-1-MCS par *Apa*I et *Sac*I. (B) Photographie prise après migration sur gel d'électrophorèse des fragments d'ADN obtenus après restriction par *Apa*I et *Sac*I des pLUM-N/C de et du pBBR-1-MCS (CTL). ABa, ABb et C1 correspondent aux clones de *E. coli* dans lesquels les constructions pLUM-N/C attendues ont été récupérées. Ma, marqueur de poids moléculaire Smart ladder.

Afin de vérifier l'absence d'erreur dans la séquence nucléotidique, ces plasmides ont été envoyés au séquençage. Les plasmides retrouvés dans les clones ABb et C1 et ne présentent pas de changements nucléotidiques altérant la construction. La construction du tag Lumio a été testée : une ORF a été introduite à la place de la cassette Gateway dans les vecteurs pLUM-N et pLUM-C. Ces vecteurs ont été introduits chez *E. coli* et la présence d'une protéine chimérique détectable via le réactif Lumio vérifiée sur gel de polyacrylamide 12%. L'émission d'un signal de fluorescence provoquée par la coordination du réactif Lumio par les protéines de fusion, observée sur banc UV, valide les constructions obtenues (Rolain, 2006).

5. Conclusions générales et perspectives

Au cours de ce mémoire, plusieurs approches ont été utilisées en vue d'identifier et de caractériser des effecteurs putatifs de *Brucella melitensis*.

Lors d'un crible double hybride en levure, 17 interactions protéiques ont été mises en évidence entre certaines protéines humaines et des protéines de *Brucella melitensis*. Ces protéines bactériennes sont susceptibles d'être des effecteurs favorisant l'invasion et la colonisation de la niche de réplication de *Brucella melitensis* au sein de la cellule hôte, et sont à la base des différentes expériences réalisées.

Deux approches complémentaires ont été utilisées en vue d'identifier et de caractériser des effecteurs parmi ces protéines, renseignant sur leur toxicité potentielle, ou sur leur localisation subcellulaire en levure. Pour cela, une construction plasmidique, contenant une ORF d'intérêt fusionnée à la GFP et sous le contrôle d'un promoteur inductible au galactose, a été utilisée. Les candidats identifiés par l'une ou l'autre de ces approches, feront l'objet d'expériences supplémentaires afin de vérifier leur sécrétion dans le cytosol de la cellule hôte avec le plasmide construit au cours de ce mémoire.

La première approche a consisté à identifier des protéines toxiques pour la levure à l'instar de certains effecteurs bactériens connus comme YopE ou YopM. Cette étude a permis d'identifier, parmi les 17 candidats testés, deux protéines toxiques pour la levure ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle ce sont des effecteurs. Il s'agit des protéines correspondant aux ORFs BMEI1974 et BMEII0410 et annotées en tant que diacylglycérol kinase et acetylglutamate kinase, respectivement.

La deuxième approche visait à localiser dans la levure les effecteurs putatifs afin de pouvoir émettre des hypothèses éventuelles quant à leur fonction lors de l'invasion en cellule. Nos résultats suggèrent une localisation en périphérie de la membrane pour la GFP-BMEI1974 annotée comme étant une diacylglycérol kinase. La localisation observée nécessitera d'être confirmée par des techniques de colocalisation (immunocytochimie, marqueurs d'organites), et ce, pour toutes les protéines étudiées.

Ces résultats suggèrent que la BMEI1974 et la BMEII0410 codent des effecteurs potentiels de *Brucella melitensis*. La BMEI1974 couplée à la GFP code une protéine toxique pour la levure et qui semble se localiser en périphérie membranaire. La BMEII0410 couplée à la GFP code une protéine toxique en levure, mais pour laquelle aucune localisation évidente n'a pu être déterminée.

Avant toute hypothèse concernant l'activité ou la fonction de ces deux protéines lors de l'invasion de *Brucella melitensis*, il est important de vérifier que ces protéines sont bien sécrétées. Au cours de ce mémoire un plasmide permettant de fusionner un tag Lumio à n'importe quelle ORF de l'ORFéome a été construit. Cette construction a été vérifiée et va permettre d'identifier des protéines sécrétées dans le cytosol de la cellule eucaryote puisque, fusionnées au tag, elles seront facilement détectables en présence d'un réactif auquel il se complexe. Cette stratégie devra être appliquée aux 17 effecteurs potentiels de départ. En effet, un effecteur bactérien (même cytotoxique) n'est pas forcément toxique en levure.

Néanmoins, si une des protéines identifiées au préalable est montrée comme étant sécrétée, une toxicité en levure ou une localisation subcellulaire particulière peut donner des indices quant à la fonction de l'effecteur bactérien. Une manière de caractériser ces effecteurs, est de créer des mutants chez *Brucella melitensis*. Après avoir obtenu le phénotype d'infection des mutants et identifié à quel niveau l'effecteur agit, des mutants de domaines et des mutants ponctuels peuvent être réalisés afin de définir plus précisément la fonctionnalité de cette protéine.

L'analyse des résultats du crible double hybride met en évidence un certain nombre d'interactions entre certaines protéines de *Brucella melitensis* et des petites protéines G de la superfamille Ras. Or, les petites protéines G sont connues pour leur implication dans de nombreux processus physiologiques tels que la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation, l'organisation de l'actine, la progression du cycle cellulaire, le transport vésiculaire, … Une question intéressante consisterait à savoir si les 5 protéines de *Brucella* qui ont été identifiées comme interagissant avec les protéines G dans le crible double hybride interagissent avec d'autres membres de la superfamille Ras. Pour répondre à cette question, un deuxième crible double hybride est en cours de réalisation tesatnt ces protéines bactériennes contre toutes les protéines appartenant à la superfamille des Ras. Il permettrait d'identifier des cibles supplémentaires parmi les membres de la superfamille des Ras de ces effecteurs putatifs.

Une perspective à plus large spectre serait d'utiliser la technique du test de survie en levure pour identifier, à l'échelle de l'ORFéome de *Brucella melitensis*, des effecteurs potentiels. Un vecteur permettant l'expression régulable en levure et le clonage en Gateway de toutes les ORFs de *Brucella melitensis* sera utilisé à cet effet. De plus, ce plasmide fusionne à l'ORF clonée les tags HA et His_6 qui permettent de vérifier la présence de la protéine par western blot. Les tags de cette construction sont plus petits que la GFP et minimisent les changements de conformation de la protéine d'intérêt provoqués par la fusion d'un tag.

La vérification de la sécrétion des effecteurs, et la construction de mutants et leur caractérisation phénotypique, devraient permettre de confirmer qu'il s'agit d'effecteurs et de mieux comprendre les mécanismes d'invasion de *Brucella*.

6. Matériel et méthodes

6.1.Matériel

6.1.1. Souches et plasmides

6.1.1.1.Plasmides

Plasmides	Caractéristiques	Référence
pFUS	*Gal*10-GFP (2μ) *LEU*2	Byers laboratory
pCLF110	Dérive du pFUS avec *yopE* en fusion avec GFP sous le contrôle de *GAL10*	(Lesser et Miller, 2001)
pCLF140	Dérive du pFUS avec *yopM* en fusion avec GFP sous le contrôle de *GAL10*	(Lesser et Miller, 2001)
pGGG	Dérive du pFUS, avec *yopE* remplacé par une cassette Gateway	URBM
pGG-YopE	Dérive du pGGG, avec *yopE* cloné en Gateway	URBM
pGG-YopM	Dérive du pGGG, *yopM* cloné en Gateway	URBM
pGG-ORF	pGGG avec une des 17 ORFs utilisées lors de ce travail cloné en Gateway	Ce travail
pGEM®-T Easy	Vecteur T avec f1 *ori*R, Amp^r	Promega corporation
pGEM-T-LumioGWAB	Dérive du pGEM-T Easy, avec le fragment *Sac*I/*Apa*I contenant la construction lumio et la cassette Gateway rfAB en *Eco*RV	URBM
pGEM-T-LumioGWC1	Dérive du pGEM-T Easy, avec le fragment *Sac*I/*Apa*I contenant la construction Lumio et la cassette Gateway rfAB en *Sma*I.	URBM
pBBR-1-MCS	*plac*-lacZα de pBluescript KS Cm^r, compatible IncP, IncQ, IncW, CXolE1 et p15A ;	(Kovach *et al.*, 1994)
pLUM-N	pBBR-1-MCS avec le fragment *Apa*I/*Sac*I contenant le tag Lumio du pGEM-T-LumioGWAB	Ce travail
pLUM-C	pBBR-1-MCS avec le fragment ApaI/SacI contenant la construction Lumio du pGEM-T-LumioGWC1	Ce travail

6.1.1.2.Souches de E. coli.

DH10B

Cette souche a servi à amplifier des plasmides avec lesquels elle avait été transformée.

Génotype : F- *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *end*A1 *ara*D139 Δ(*ara, leu*)7697 *gal*U *gal*K λ- *rps*L *nup*G

DB3.1

Cette souche est résistante au produit du gène toxique *ccdB* et a servi à amplifier des plasmides contenant un gène *ccdB* avec lesquels elle avait été transformée.

Génotype : F- *gyr*A462 *end*A1 Δ(sr1-*rec*A) *mcr*B *mrr hsdS*20(rB-, mB-) *sup*E44 *ara*-14 *gal*K2 *lac*Y1 *pro*A2 *rps*L20(SmR) *xyl*-5 λ-l*eu mtl*1

6.1.1.3.Souche de Saccharomyces cerevisiae

La souche GRF18 a été transformée avec les différents plasmides pGGG dans lesquels ont été clonés ou non une ORF de *Brucella* ou de *Yersinia*.
Génotype : matα *LEU2 HIS3*; S.c.ρ+

6.1.2. Milieux

6.1.2.1.Milieux pour levure.

6.1.2.1.1. Milieu sélectif SC – LEU

Par litre de milieu :

Préparer un milieu minimum contenant 6.75 g de YNB (Yeast Nitrogen Base) avec ammonium sulfate sans acides aminés, 1.3 g de poudre d'acide aminés, et 20 g d'agar dans le cas d'un milieu solide.
Mettre à pH 5.9, porter à volume avec dH_2O en considérant les volumes de solutions qui devront être ajoutées après autoclave.
Autoclaver.
Ajouter 8mL/L de milieu des solutions concentrées des acides aminés His, Trp et Ura.
Ajouter le volume nécessaire de solution concentrée (40%) de glucose pour obtenir le pourcentage voulu.

6.1.2.1.2. Milieu sélectif SD – LEU

Par litre de milieu :

Préparer un milieu minimum contenant 6.75 g de YNB (Yeast Nitrogen Base) avec ammonium sulfate sans acides aminés, et 20 g d'agar dans le cas d'un milieu solide.
Mettre à pH 5.9, porter à volume avec dH_2O en considérant les volumes de solutions qui devront être ajoutées après autoclave.
Autoclaver.
Ajouter 8mL/L de milieu des solutions concentrées des acides aminés His, Trp et Ura.
Ajouter le volume nécessaire de solution concentrée (40%) de galactose et/ou raffinose pour obtenir le pourcentage voulu.

6.1.2.1.3. Milieux non-sélectifs (YEPD, *y*east *e*xtract bacto-*p*eptone *D*-glucose)

Pour un litre d'eau désionisée	**Forme liquide**	**Forme solide**
Glucose	20 g	20 g
Bacto peptone 2%	50 g	50 g
Yeast extract 1%	25 g	25 g
Agar	-	20 g

6.1.2.2.Milieu LB (Luria Bertani) pour bactéries

Pour un litre d'eau désionisée	Forme liquide	Forme solide
Hydrolysat de caséine (peptone)	10 g	10 g
NaCl	5 g	5 g
Yeast extract	5 g	5 g
Agar	-	15 g

Au mileu, ajouter un antibiotique si une sélection de bactéries transformantes est nécessaire :

Antibiotique	Concentration finale
Ampicilline	50 µg/mL à partir d'un stock concentré 1000X dans ddH_2O
Chloramphénicol	50 µg/mL à partir d'un stock concentré 1000X dans EtOH 70%

6.1.3. Solutions et Réactifs

6.1.3.1.Tampon TE 10X :

Tris HCl pH8.0 100mM
EDTA 10mM
Porter au volume souhaité avec dH_2O puis autoclaver

6.1.3.2.Solution d'acétate de lithium (LiAc) 10X :

LiAc 1M
Porter au volume souhaité avec dH_2O puis autoclaver

6.1.3.3. Poly éthylène glycol (PEG) 50% :

PEG 4000 50g
Porter à volume de 100mL avec dH_2O puis stériliser au moyen d'un filtre de 0.45 µm (Millipore).

6.1.3.4.LiAc/TE 1X :

LiAc 10X : 1/10ème de volume
TE 10X : 1/10ème de volume
dH_2O : 8/10èmes de volume

6.1.3.5.Mélange LiAc/TE/PEG 40% :

LiAc 10X : 1/10ème de volume
TE 10X : 1/10ème de volume
PEG 50% : 8/10èmes de volume

6.1.3.6.Glucose, Raffinose, Galactose 40% (w/v) :

Dissoudre 400 g de glucose, de raffinose ou de galactose dans un volume final de 1 L. Autoclaver.

6.1.3.7.Solutions concentrées d'acides aminés

Histidine-HCl, 100 mM , autoclaver
Uracile, 20 mM , autoclaver
Tryptophane (à conserver à 4°C et à l'abri de la lumière), 40 mM, filtrer (filtre 1.22µM Millipore)

6.1.3.8.Poudre d'acides aminés

Mélanger 6 g de chacun des acides aminés suivants : alanine, arginine, acide aspartique, asparagine, cystéine, acide glutamique, glutamine, glycine, isoleucine, lysine, méthionine, phénylalanine, proline, sérine, thréonine, tyrosine, valine. Ajouter 6 g de sulfate d'adénine. Les suivants sont donc omis (mais ajoutés au milieu en fonction de la sélection souhaitée) : tryptophane, histidine, uracile, leucine.

6.1.3.9.Tampons pour miniprep

6.1.3.9.1. P1 :

RNAseA 100 µg/mL
Tris-HCl 50 mM
EDTA 80 mM
Mettre à pH8.0 et garder à 4°C.

6.1.3.9.2. P2 :

NaOH 100mM
SDS 1%

6.1.3.9.3. P3 :

KAc 3 M
Mettre à pH 5.5 avec de l'acide acétique et garder à 4°C.

6.1.3.10. Tampon TAE (stock concentré 50X)

Tris-HCl pH 8.0, 40Mm
EDTA, 50Mm
Acide actétique glacial, 57.1mL
Porter à un volume de 1L avec ddH_2O

6.2.Méthodes

6.2.1. Techniques de biologie moléculaire

6.2.1.1.Techniques relatives à l'ADN

6.2.1.1.1. Miniprep et maxiprep

Cette technique permet de récupérer l'ADN plasmidique d'une population de bactéries. Elle se base sur une lyse alcaline des bactéries, l'élimination des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, le lavage de l'ADN et enfin sa resuspension. L'ADN plasmidique est récupéré en utilisant le protocole d'extraction de Macherey-Nagel, "Plasmid DNA Purification" (purification sur colonne, miniprep et maxiprep), et avec le protocole classique de miniprep :

- Inoculer 5 mL de LB, contenant l'antibiotique approprié, avec une colonie isolée. Faire pousser sur la nuit sous agitation à 37°C.
- Centrifuger 1.5 mL de la culture pendant 5 min à 12500 rpm et éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 300 µL de tampon P1.
- Ajouter 300 µL de tampon P2, mélanger par inversions, laisser 5 min à température ambiante.
- Ajouter 300 µL de tampon P3, mélanger par inversions et laisser 10 min sur glace.
- Centrifuger pendant 15 minutes à 12500 rpm à 4°C et récupérer le surnageant.
- Ajouter 0.7 volume d'isopropanol (environ 630 µL) et mélanger par inversions.
- Centrifuger pendant 15 minutes à 12500 rpm à 4°C et éliminer le surnageant.
- Ajouter 300 µL d'éthanol 70% (préalablement placé à -20°C).
- Centrifuger pendant 5 minutes à 12500 rpm à 4°C et éliminer le surnageant (délicatement).

Laisser évaporer, puis resuspendre dans 50 µL de dH_2O.

6.2.1.1.2. Restriction d'ADN plasmidique

Les enzymes de restriction sont des endonucléases qui permettent de cliver l'ADN double-brin de manière spécifique : elles reconnaissent des séquence consensus souvent palindromiques. La coupure peut être décalée d'un brin par rapport à l'autre, formant ainsi des "bouts protrudants", ou bien des bouts francs s'il n'y a pas de décalage. Les enzymes de restriction et leurs tampons sont fournis par Roche Molecular Biochemical et Biolabs. Les enzymes *Eco*RI, *Apa*I et *Sac*I ont été utilisées au cours de ce mémoire pour cliver un fragment d'ADN ou pour déterminer les profils de restriction plasmidiques sur gel d'agarose. Une formule permet de déterminer le nombre d'unité d'enzymes (Q) nécessaire en fonction de la taille du fragment du plasmide a restreindre (t_p en kb), du nombre de sites de restriction reconnus par cette enzyme chez le phage lambda (n_λ) et dans le plasmide à restreindre (n_p), et de la quantité d'ADN à restreindre (qp, en µg) afin de ne pas utiliser une quantité d'enzyme excessive.

$$Q\ (\text{Unités}) = (48{,}5/t_p)\ .\ qp\ .\ (n_p/\ n_\lambda)$$

6.2.1.1.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN dans un champ électrique en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser est inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer. La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Comme marqueur de tailles, nous avons utilisé l'HyperLadder de Bioline et le Smart ladder SL. La révélation d'ADN est réalisée grâce au bromure d'éthidium (BrEt), composé fluorescent qui s'intercale entre les

bases et rend la double hélice des acides nucléiques visible sous UVs. La fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille, ainsi qu'à la quantité d'ADN. En connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de taille, nous pouvons estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison des intensités de fluorescence et approximer ainsi sa concentration.

- Dissoudre en chauffant Y g d'agarose dans Z ml de tampon TAE 1X, où Y/Z représente le pourcentage en agarose, généralement de 1%.
- Ajouter 5 µL de bromure d'éthidium (2mg/ml H_2O).
- Une fois que la température du flacon permet de le tenir en main (~60°C), couler le gel dans un support adéquat muni d'un peigne délimitant les puits.
- Charger les échantillons auxquels a été ajouté au moins un dixième de solution d'alourdisseur, sans oublier de charger le marqueur moléculaire en parallèle (5 µL/puits).

6.2.1.1.4. Extraction et purification d'ADN sur gel d'agarose

Cette technique permet de récupérer un fragment d'ADN d'un gel d'agarose isolé au cours de l'électrophorèse, principalement afin d'utiliser ce fragment dans des constructions futures. Le kit MBI Fermentas est utilisé au laboratoire. Cette méthode repose sur l'utilisation de billes de silice auxquelles l'ADN adhère spécifiquement, les sels et les impuretés peuvent ainsi être éliminés.

6.2.1.1.5. Ligation

Cette technique permet de créer des liaisons covalentes entre deux fragments d'ADN. La réaction de ligation est réalisée pendant 2 heures à température ambiante (sur la paillasse). Le mélange de réaction contient :

- Vecteur et insert dans un rapport moléculaire 1/1 pour un clonage directionnel et 1/3 pour un non directionnel.
- 4 µL de Tampon 5X T4 DNA Ligase.
- 1 µL de T4 DNA Ligase.

Porter à volume final (20 µL) avec de l'eau.

6.2.1.1.6. Réaction LR

Protocole adapté de (Walhout *et al*., 2000) :

Réaliser les réactions sur glace

Dégeler la LR Clonase sur glace ; vortexer brièvement.

Combiner et mélanger à la pipette :

- 75 ng de vecteur de destination linéarisé en *Apa*I/*Sac*I(pGGG)
- 1.5 µL de vecteur d'entrée (75ng par reaction)
- 1 µL de tampon de reaction : 5x LR Clonase™ reaction buffer, dans le Gateway® LR Clonase™ enzyme mix, Invitrogen
- 0.5 µL de mix LR Clonase (Int, Xis, IHF) : Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix, Invitrogen
- ajouter dH_2O pour atteindre 5 µL finaux.

Note : préparez un mélange général (sans vecteurs d'entrée et en ajoutant l'enzyme en dernier lieu), et l'ajouter aux 1.5 µL de vecteurs d'entrée.

Incuber sur la nuit dans une étuve à 25°C

Transformer 2.5 µL de chaque réaction dans 15 µL de bactéries $CaCl_2$ compétentes.

6.2.1.2.Transformations

6.2.1.2.2. Transformation de bactéries $CaCl_2$ compétentes

La transformation bactérienne consiste à faire entrer de l'ADN exogène (dans ce cas, un plasmide) dans une bactérie. Ceci nécessite un traitement préalable des bactéries rendant la paroi et la membrane bactérienne perméables à l'ADN : la bactérie est alors dite compétente. Un choc thermique peut alors être appliqué pour induire la capture de l'ADN par la cellule.

- Dégeler un aliquot de bactéries compétentes sur glace.
- Transférer 50 µL de bactéries compétentes par transformation sur 1 à 5 µL d'ADN dans un tube stérile refroidi sur glace au préalable.
- Mélanger délicatement à la pipette et laisser reposer 30 min sur glace.
- Réaliser le choc thermique dans un bain marie à 42°C pendant 1 min, placer ensuite sur glace 2 min.
- Ajouter 900 µL de LB et placer à 37°C pendant ½ heure sans agitation, puis pendant ½ heure avec agitation.
- Étaler 100 µL sur boîte, et centrifuger le reste pendant 5 min à 2000 rpm.
- Éliminer 800 µL du surnageant et resuspendre le culot dans les 100 µL restant.
- Etaler sur boîte et laisser pousser à 37°C sur la nuit.

N. B. : dans le cas d'une transformation par un produit de réaction LR, 2.5 µL de LR sont utilisés pour transformer 15 µL de bactéries compétentes. Environ 200 µL de LB sont ajoutés après le choc thermique.

6.2.1.1.2. Transformation de levures

Prendre un patch de levure et inoculer 15 mL de YEPD. Faire croître sur la nuit à 30°C, sous forte agitation.
Mesurer la DO_{600nm} le lendemain matin.
Diluer jusqu'à une DO de 0.1 (=début de phase exponentielle) dans + ou - 40 mL.
Récupérer les cellules (1 à 2 mL) quand la DO se situe entre 0.4 et 0.6.
Centrifuger à 2000 rpm pendant 10 min. à température ambiante.
NOTE : quand les levures sont presque prêtes à être récupérées :

- Faire bouillir du ssDNA (ADN de sperme de saumon) pendant 5 à 10 minutes, ensuite le placer directement sur glace
- Préparer les plasmides dans les eppendorfs (3µL)
- Prévoir de la place dans un bain à 42°C pour le choc thermique

Laver dans 400µL de dH2O, centrifuger à 2000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante.
Laver dans 100µL de LiAc/TE, centrifuger à 2000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante.
Resuspendre les cellules dans 20µL de LiAc/TE.
Ajouter 2µL d'ADN de sperme de saumon aux levures.
Ajouter 100µL de PEG LiAc/TE au mix de levures+ssDNA.
Ajouter les 122 µL du mix levures/ssDNA/PEG/LiAc/TE dans le tube contenant 3 µL d'ADN, bien mélanger.
Placer les tubes à 30°C pendant 30 min.
Placer les tubes dans un bain à 42°C pendant 15 minutes pour le choc thermique.
Centrifuger à 2000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante.
Éliminer le surnageant (PEG) à la pipette et resuspendre le culot dans 100 µL de dH_2O.
Centrifuger 10 min à 2000 rpm et enlever le surnageant, resuspendre dans 100µL de dH2O.
Etaler chaque transformation sur une boite de milieu sélectif, à l'aide de billes ou d'un rateau en verre, stériles.
Note :

- A partir de l'étape de récupération, les volumes concernent une transformation.
- Préparer le Liac/TE et le LiAc/TE/PEG le jour même.

6.3. Technique de microscopie

6.3.1. Microscope

Le microscope utilisé est un Nikon Eclipse E1000 (objectif 100X, plan Apo) et la caméra permettant la prise de micrographies est une Hamamatsu ORCA-ER.

6.3.2. Préparation d'échantillons de microscopie à fluorescence

Après avoir déposé 3 µl de culture de la souche GRF18 de *Saccharomyces cerevisiae* entre lame et lamelle, l'échantillon a été observé en immersion (afin d'augmenter le pouvoir séparateur) au microscope photonique et à fluorescence utilisant l'objectif 100X.

6.3.3. Molécule fluorescente

La GFP est une protéine fluorescente qui lorsqu'elle est excitée à 475 nm émet un signal de fluorescence dans le vert (509nm).

7. Références bibliographiques

Alonso, A. & Garcia-del Portillo, F. Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *Int Microbiol* **7**, 181-91 (2004).

Cyclic beta-1,2-glucan is a Brucella virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol* **6**, 618-25 (2005).

Backert, S. & Meyer, T. F. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **9**, 207-17 (2006).

Bagnoli, F., Buti, L., Tompkins, L., Covacci, A. & Amieva, M. R. Helicobacter pylori CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16339-44 (2005).

Batut, J., Andersson, S. G. & O'Callaghan, D. The evolution of chronic infection strategies in the alpha-proteobacteria. *Nat Rev Microbiol* **2**, 933-45 (2004).

Bonazzi, M. & Cossart, P. Bacterial entry into cells: A role for the endocytic machinery. *FEBS Lett* **580**, 2962-7 (2006).

The Brucella suis virB operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1544-9 (2002).

Bourzac, K. M. & Guillemin, K. Helicobacter pylori-host cell interactions mediated by type IV secretion. *Cell Microbiol* **7**, 911-9 (2005).

Brandt, S., Kwok, T., Hartig, R., Konig, W. & Backert, S. NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the Helicobacter pylori CagA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9300-5 (2005).

Brandt, S., Kwok, T., Hartig, R., Konig, W. & Backert, S. NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the Helicobacter pylori CagA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9300-5 (2005).

Burns, D. L., Fiddner, S., Cheung, A. M. & Verma, A. Analysis of subassemblies of pertussis toxin subunits in vivo and their interaction with the ptl transport apparatus. *Infect Immun* **72**, 5365-72 (2004).

Campodonico, E. M., Chesnel, L. & Roy, C. R. A yeast genetic system for the identification and characterization of substrate proteins transferred into host cells by the Legionella pneumophila Dot/Icm system. *Mol Microbiol* **56**, 918-33 (2005).

Cardoso, P. G., Macedo, G. C., Azevedo, V. & Oliveira, S. C. Brucella spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb Cell Fact* **5**, 13 (2006).

Celli, J. Surviving inside a macrophage: the many ways of Brucella. *Res Microbiol* **157**, 93-8 (2006).

Celli, J. & Gorvel, J. P. Organelle robbery: Brucella interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Microbiol* **7**, 93-7 (2004).

Legionella effectors that promote nonlytic release from protozoa. *Science* **303**, 1358-61 (2004).

Christie, P. J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S. & Cascales, E. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol* **59**, 451-85 (2005).

Churin, Y., Kardalinou, E., Meyer, T. F. & Naumann, M. Pathogenicity island-dependent activation of Rho GTPases Rac1 and Cdc42 in Helicobacter pylori infection. *Mol Microbiol* **40**, 815-23 (2001).

Colombo, M. I. Pathogens and autophagy: subverting to survive. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**, 1481-3 (2005).

Corbel, M. J. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* **3**, 213-21 (1997).

Cossart, P., Pizarro-Cerda, J. & Lecuit, M. Invasion of mammalian cells by Listeria monocytogenes: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol* **13**, 23-31 (2003).

Covacci, A. & Rappuoli, R. Pertussis toxin export requires accessory genes located downstream from the pertussis toxin operon. *Mol Microbiol* **8**, 429-34 (1993).

Identification of Brucella spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol* **3**, 487-97 (2001).

DelVecchio, V. G., Kapatral, V., Elzer, P., Patra, G. & Mujer, C. V. The genome of Brucella melitensis. *Vet Microbiol* **90**, 587-92 (2002).

Endosomal membrane traffic: convergence point targeted by Mycobacterium tuberculosis and HIV. *Cell Microbiol* **6**, 999-1009 (2004).

Derre, I. & Isberg, R. R. LidA, a translocated substrate of the Legionella pneumophila type IV secretion system, interferes with the early secretory pathway. *Infect Immun* **73**, 4370-80 (2005).

Enninga, J., Mounier, J., Sansonetti, P. & Tran Van Nhieu, G. Secretion of type III effectors into host cells in real time. *Nat Methods* **2**, 959-65 (2005).

Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-35 (2002).

Release of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. *J Pathol* **188**, 220-6 (1999).

Systematic mutagenesis of the Helicobacter pylori cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol* **42**, 1337-48 (2001).

Foulongne, V., Bourg, G., Cazevieille, C., Michaux-Charachon, S. & O'Callaghan, D. Identification of Brucella suis genes affecting intracellular survival in an in vitro human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. *Infect Immun* **68**, 1297-303 (2000).

Gamazo, C. & Moriyon, I. Release of outer membrane fragments by exponentially growing Brucella melitensis cells. *Infect Immun* **55**, 609-15 (1987).

The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* **152**, 165-80 (2001).

Gomis-Ruth, F. X., Sola, M., de la Cruz, F. & Coll, M. Coupling factors in macromolecular type-IV secretion machineries. *Curr Pharm Des* **10**, 1551-65 (2004).

Gorvel, J. P. & Moreno, E. Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* **90**, 281-97 (2002).

A comparative study of the actin-based motilities of the pathogenic bacteria Listeria monocytogenes, Shigella flexneri and Rickettsia conorii. *J Cell Sci* **112 (Pt 11)**, 1697-708 (1999).

Autophagy induction favours the generation and maturation of the Coxiella-replicative vacuoles. *Cell Microbiol* **7**, 981-93 (2005).

Hacker, G. & Fischer, S. F. Bacterial anti-apoptotic activities. *FEMS Microbiol Lett* **211**, 1-6 (2002).

Hackstadt, T. Redirection of host vesicle trafficking pathways by intracellular parasites. *Traffic* **1**, 93-9 (2000).

Hassane, D. C., Lee, R. B., Mendenhall, M. D. & Pickett, C. L. Cytolethal distending toxin demonstrates genotoxic activity in a yeast model. *Infect Immun* **69**, 5752-9 (2001).

Hoekstra, D., van der Laan, J. W., de Leij, L. & Witholt, B. Release of outer membrane fragments from normally growing Escherichia coli. *Biochim Biophys Acta* **455**, 889-99 (1976).

Hosselet, S. (Haute Ecole Charleroi-Europe, 2005).

Howe, D. & Heinzen, R. A. Replication of Coxiella burnetii is inhibited in CHO K-1 cells treated with inhibitors of cholesterol metabolism. *Ann N Y Acad Sci* **1063**, 123-9 (2005).

Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686-91 (2003).

Jimenez de Bagues, M. P., Dudal, S., Dornand, J. & Gross, A. Cellular bioterrorism: how Brucella corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation. *Clin Immunol* **114**, 227-38 (2005).

Johnson, S., Deane, J. E. & Lea, S. M. The type III needle and the damage done. *Curr Opin Struct Biol* **15**, 700-7 (2005).
Judd, P. K., Kumar, R. B. & Das, A. Spatial location and requirements for the assembly of the Agrobacterium tumefaciens type IV secretion apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11498-503 (2005).
Jutras, I. & Desjardins, M. Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 511-27 (2005).
Kadurugamuwa, J. L. & Beveridge, T. J. Membrane vesicles derived from Pseudomonas aeruginosa and Shigella flexneri can be integrated into the surfaces of other gram-negative bacteria. *Microbiology* **145 (Pt 8)**, 2051-60 (1999).
cag+ Helicobacter pylori induce transactivation of the epidermal growth factor receptor in AGS gastric epithelial cells. *J Biol Chem* **276**, 48127-34 (2001).
Knodler, L. A. & Steele-Mortimer, O. Taking possession: biogenesis of the Salmonella-containing vacuole. *Traffic* **4**, 587-99 (2003).
Kozukeev, T. B., Ajeilat, S., Maes, E. & Favorov, M. Risk factors for brucellosis--Leylek and Kadamjay districts, Batken Oblast, Kyrgyzstan, January-November, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **55 Suppl 1**, 31-4 (2006).
Kuehn, M. J. & Kesty, N. C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev* **19**, 2645-55 (2005).
Ladant, D. & Ullmann, A. Bordatella pertussis adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol* **7**, 172-6 (1999).
Lesser, C. F. & Miller, S. I. Expression of microbial virulence proteins in Saccharomyces cerevisiae models mammalian infection. *Embo J* **20**, 1840-9 (2001).
Llosa, M. & O'Callaghan, D. Euroconference on the Biology of Type IV Secretion Processes: bacterial gates into the outer world. *Mol Microbiol* **53**, 1-8 (2004).
Regulation of Brucella virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Vet Microbiol* **90**, 329-39 (2002).
Maurin, M. [Brucellosis at the dawn of the 21st century]. *Med Mal Infect* **35**, 6-16 (2005).
Mock, M. & Ullmann, A. Calmodulin-activated bacterial adenylate cyclases as virulence factors. *Trends Microbiol* **1**, 187-92 (1993).
Helicobacter pylori induces AGS cell motility and elongation via independent signaling pathways. *Infect Immun* **72**, 3646-9 (2004).
Brucella abortus 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J Bacteriol* **172**, 3569-76 (1990).
A C-terminal translocation signal required for Dot/Icm-dependent delivery of the Legionella RalF protein to host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 826-31 (2005).
Nagai, H., Kagan, J. C., Zhu, X., Kahn, R. A. & Roy, C. R. A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on Legionella phagosomes. *Science* **295**, 679-82 (2002).
Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by Helicobacter pylori encoding the cag pathogenicity island. *J Biol Chem* **274**, 31655-62 (1999).
A homologue of the Agrobacterium tumefaciens VirB and Bordetella pertussis Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of Brucella suis. *Mol Microbiol* **33**, 1210-20 (1999).
Patel, J. C. & Galan, J. E. Manipulation of the host actin cytoskeleton by Salmonella--all in the name of entry. *Curr Opin Microbiol* **8**, 10-5 (2005).
Pike, L. J. Rafts Defined. *J Lipid Res* (2006).
Pizarro-Cerda, J. & Cossart, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* **124**, 715-27 (2006).
Immunochemical identification of Brucella abortus lipopolysaccharide epitopes. *Clin Diagn Lab Immunol* **1**, 206-13 (1994).
Rolain, T. (Facultés universtitaires Notre-Dame de la Paix Namur, 2006).

Human ORFeome version 1.1: a platform for reverse proteomics. *Genome Res* **14**, 2128-35 (2004).
Rzomp, K. A., Scholtes, L. D., Briggs, B. J., Whittaker, G. R. & Scidmore, M. A. Rab GTPases are recruited to chlamydial inclusions in both a species-dependent and species-independent manner. *Infect Immun* **71**, 5855-70 (2003).
Salcedo, S. P. & Holden, D. W. Bacterial interactions with the eukaryotic secretory pathway. *Curr Opin Microbiol* **8**, 92-8 (2005).
Sallstrom, B. & Andersson, S. G. Genome reduction in the alpha-Proteobacteria. *Curr Opin Microbiol* **8**, 579-85 (2005).
The mechanism of action of the Pseudomonas aeruginosa-encoded type III cytotoxin, ExoU. *Embo J* **22**, 2959-69 (2003).
Schroder, G. & Dehio, C. Virulence-associated type IV secretion systems of Bartonella. *Trends Microbiol* **13**, 336-42 (2005).
A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of Bartonella henselae into human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 856-61 (2005).
The Helicobacter pylori CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *Embo J* **22**, 515-28 (2003).
Tzfira, T. & Citovsky, V. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by Agrobacterium. *Trends Cell Biol* **12**, 121-9 (2002).
Valdivia, R. H. Modeling the function of bacterial virulence factors in Saccharomyces cerevisiae. *Eukaryot Cell* **3**, 827-34 (2004).
Valentine, L. Agrobacterium tumefaciens and the plant: the David and Goliath of modern genetics. *Plant Physiol* **133**, 948-55 (2003).
Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island. *Nat Immunol* **5**, 1166-74 (2004).
Vieira, O. V., Botelho, R. J. & Grinstein, S. Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J* **366**, 689-704 (2002).
Waterman, S. R. & Holden, D. W. Functions and effectors of the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol* **5**, 501-11 (2003).
Weiss, A. A., Johnson, F. D. & Burns, D. L. Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2970-4 (1993).
Zamboni, D. S., McGrath, S., Rabinovitch, M. & Roy, C. R. Coxiella burnetii express type IV secretion system proteins that function similarly to components of the Legionella pneumophila Dot/Icm system. *Mol Microbiol* **49**, 965-76 (2003).
Zamboni, D. S. & Rabinovitch, M. Nitric oxide partially controls Coxiella burnetii phase II infection in mouse primary macrophages. *Infect Immun* **71**, 1225-33 (2003).

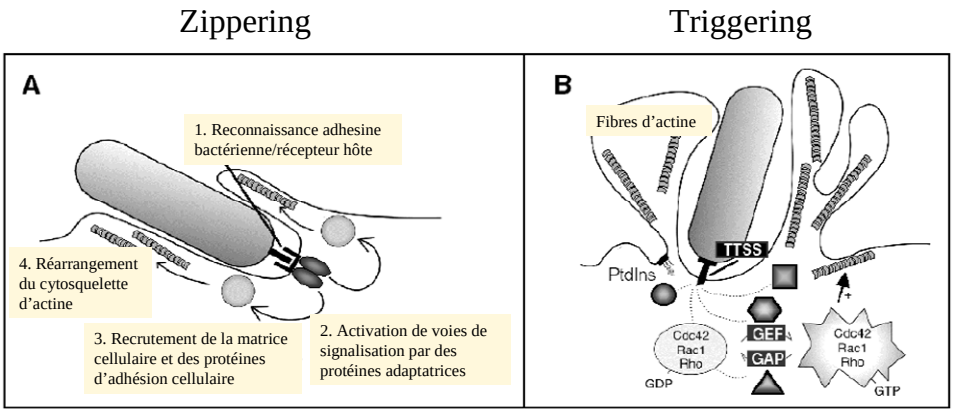


Fig. 2-1 : (A) Représentation schématique de l'entrée bactérienne dépendante des récepteurs membranaires, le zippering, et de l'entrée dépendante de l'injection de protéines (représentées par un rond, un triangle, un hexagone et un carré) dans le cytosol de la cellule, le triggering (B). D'après Alonso et García-del Portillo, 2004.

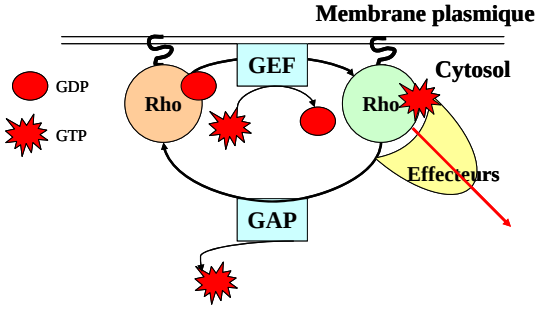


Fig. 2-2 : Représentation schématique des interrupteurs moléculaires, les Rho GTPases (famille des petites protéines G) oscillant entre une conformation active (liée au GTP) et inactive (liée au GDP) par l'intermédiaire de protéines échangeant le GDP en GTP (GEF, guanine exchange factor) et de protéines clivant le GTP (GAP, GTPase activating protein). D'après Etienne-Mannevielle et Hall, 2002

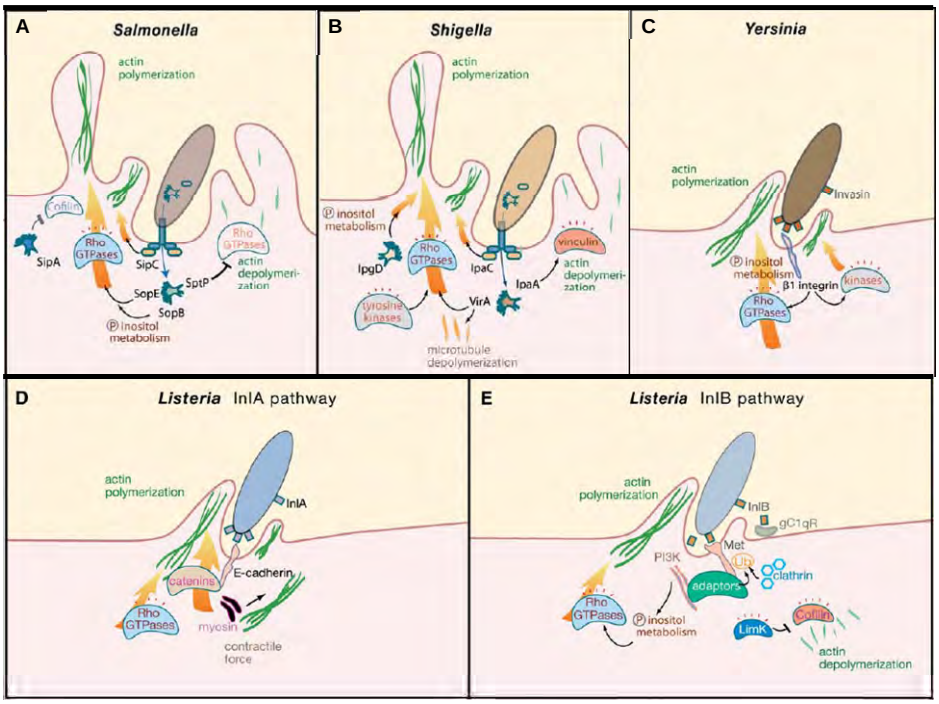


Fig. 2-3 : Représentation schématique de l'activation de voies de signalisation aboutissant à l'entrée des bactéries suivantes : *Salmonella* (A), *Shigella* (B), *Yersinia* (C), et *Listeria* (D,E) dans la cellule eucaryote. D'après une figure de Pizarro-Cerda et Cossart, 2006.

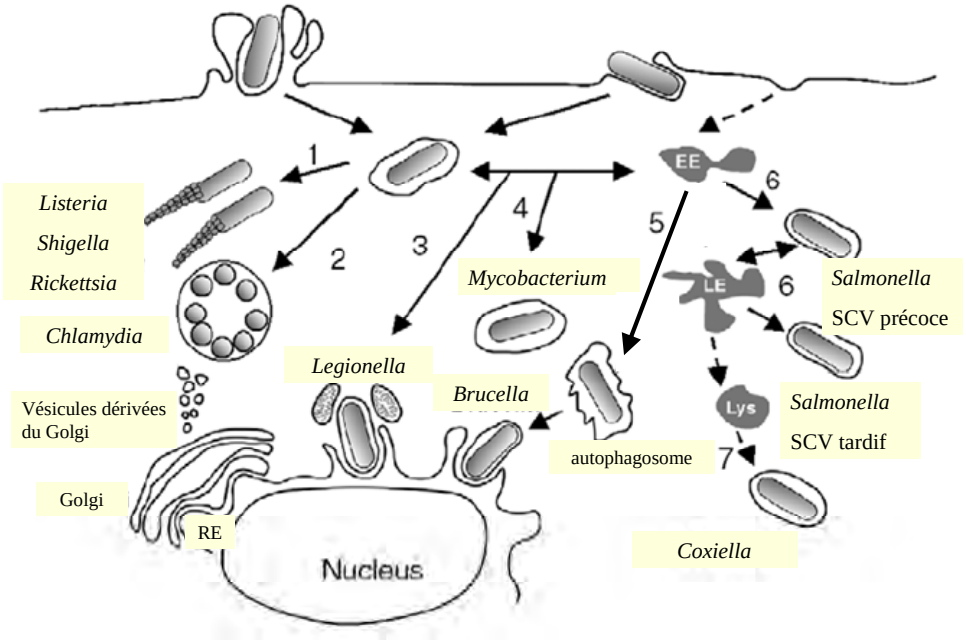


Fig. 2-4 : Représentation schématique des différents modes d'échappement de la voie de phagocytose par les pathogènes intracellulaires *Listeria*, *Shigella*, *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Legionella*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Salmonella* et *Coxiella*. D'après une figure de Alonso et Garcia-del Portillo, 2004.

Organite	Marqueurs	pH
Endosome précoce	EEA1	6
	Rab5	
	PI(3)P	
	syntaxin 13	
	transferrin	
	VAMP-3	
Endosome tardif, phagosome tardif	Rab7	5.5–6.0
	Rab9	
	récepteur au mannose 6-phosphate	
	syntaxin 7	
	LAMPs	
	acide lysobisphosphatidique	
Phagolysosome, phagosome tardif	LAMPs	4.5–5.5
	cathepsin D mature	

Tableau 2-1 : Tableau recapitulatif des protéines et de l'acidité caractéristiques des endosomes précoces, des endosomes tardifs, des phagolysosomes et des phagosomes tardifs. D'après un tableau de Vieira *et al.*, 2002

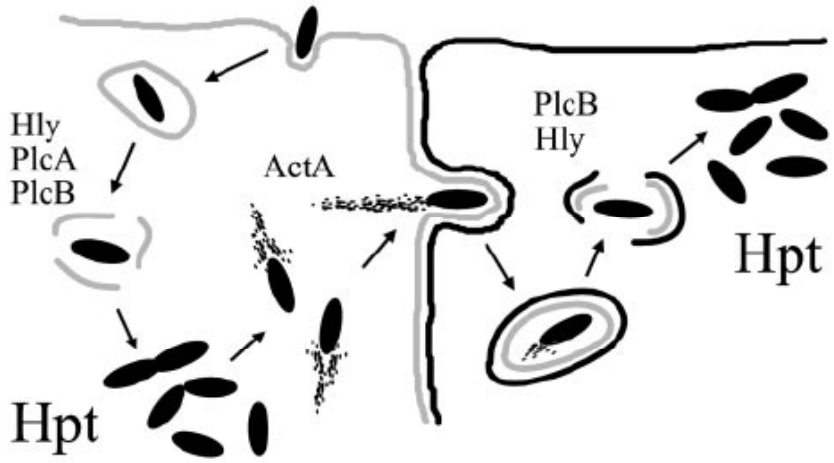


Fig. 2-5: Représentation schématique des étapes du cycle de vie intracellulaire de *Listeria* . D'après une figure de Chico-Calero *et al*, 2001.

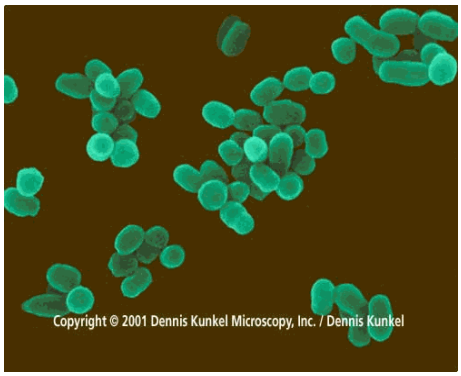


Fig. 2-6 : Micrographie électronique de *Brucella melitenis*.

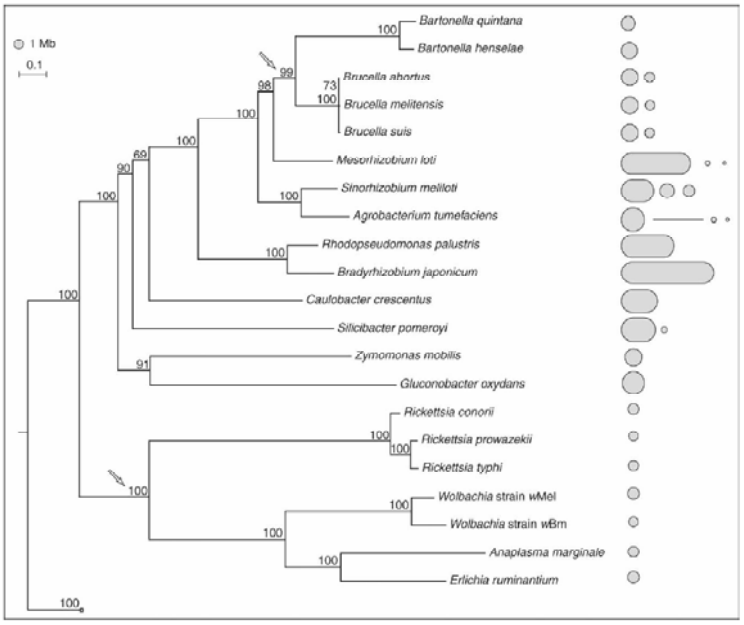


Fig. 2-7 : Représentation de l'arbre phylogénétique des α-protéobactéries. D'après Sallstrom et Andersson, 2005.

Pays	Infection des bovins (*B. abortus* ou *B. melitensis*)	Infection des ovins et caprins (*B. melitensis*)	Brucelloses humaines déclarées de 1995 à 2000
Norvège	OBF [a]	ObmF [b]	2 [c]
Finlande	OBF	ObmF	1
Suède	OBF	ObmF	15
Danemark	OBF	ObmF	0
Hollande	OBF	ObmF	13
Allemagne	OBF	ObmF	163
Grande Bretagne	OBF	ObmF	61
Irlande	non-OBF	ObmF	154 [d]
Belgique	non-OBF	ObmF	14
France	non-OBF	non-ObmF [e]	330
Autriche	OBF	non-ObmF	10
Italie	non-OBF	non-ObmF	7584
Espagne	non-OBF	non-ObmF	11 102
Portugal	non-OBF	non-ObmF	4589
Grèce	non-OBF	non-ObmF	1799

[a] OBF : pays officiellement exempt de brucellose bovine.
[b] ObmF : pays officiellement exempt de brucellose ovine et caprine.
[c] Années 1999 et 2000 seulement.
[d] Forte prédominance en Irlande du sud.
[e] La France est en fait divisée en zone ObmF approximativement dans la moitié Nord, et non-ObmF dans la moitié Sud.

Tableau 2-2 : Tableau regroupant les différentes espèces et biovars de *Brucella melitensis* qui infectent les bovins, les ovins et les hommes en Europe. D'après Maurin, 2004.

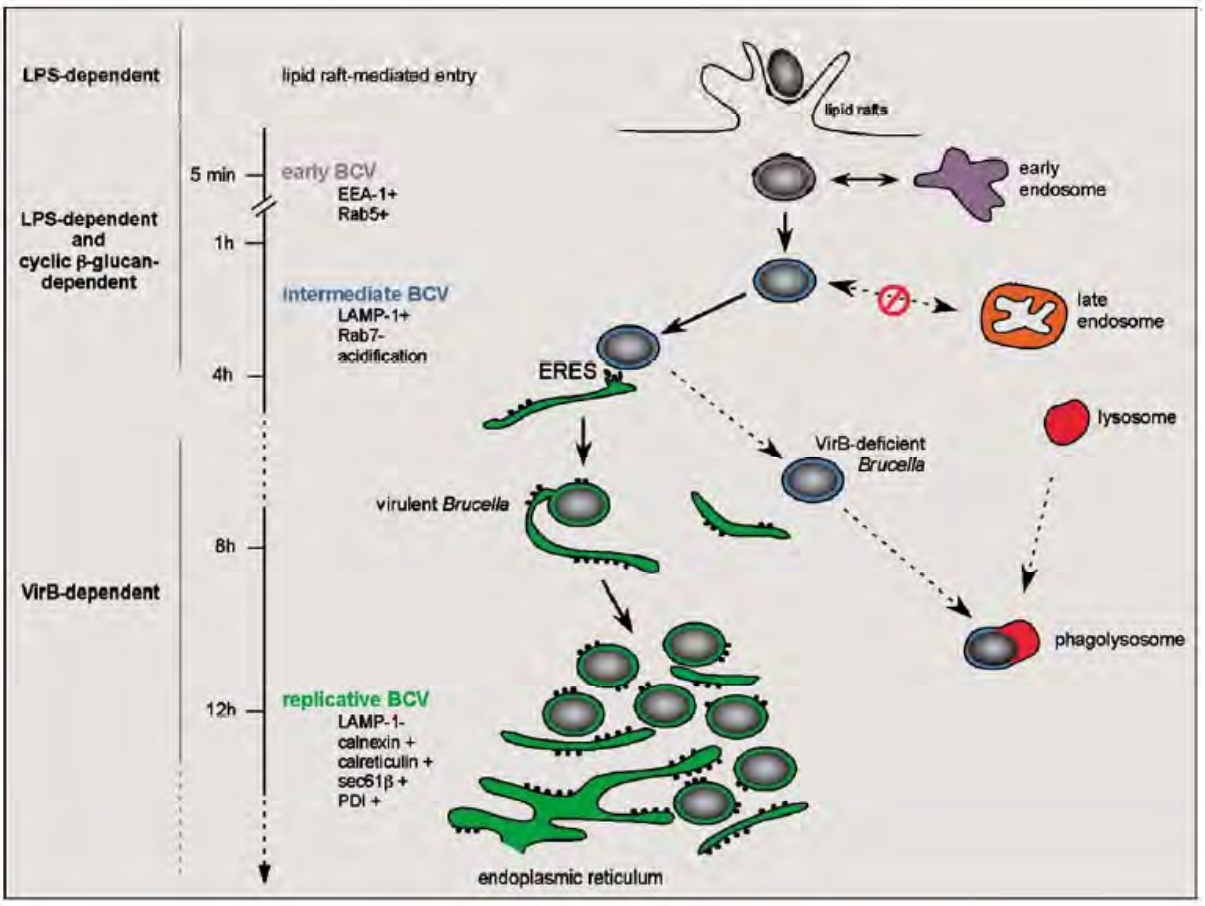


Fig. 2-8 : Représentation schématique du trafic intracellulaire de *Brucella*. D'après Celli, 2006.

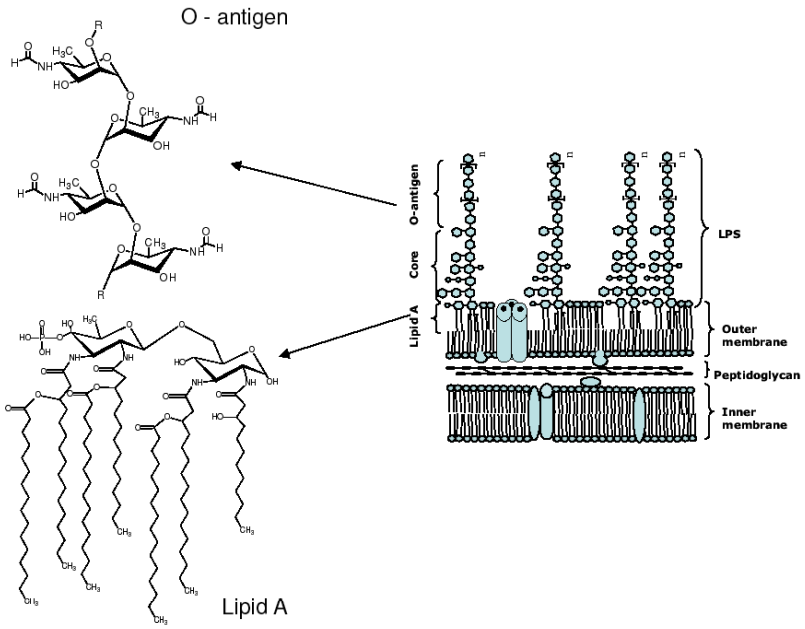


Figure 2-9 : Représentation schématique du lipopolysaccharide de *Brucella* et en particulier de son lipide A. D'après Gomes Cardoso *et al.*, 2006.

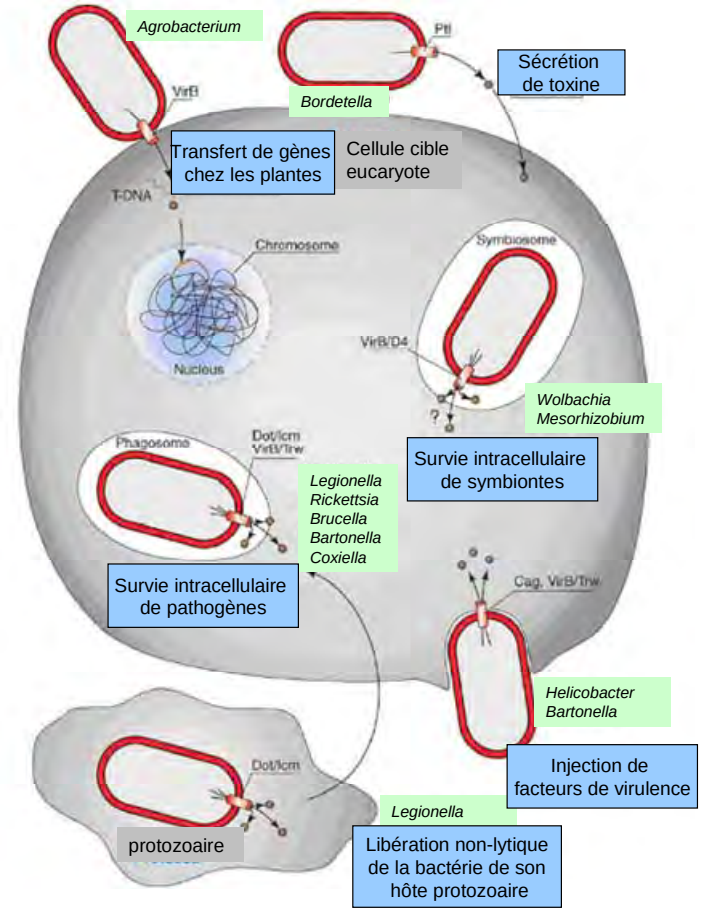


Fig. 2-10 : Représentation schématique du transfert d'effecteurs chez différentes bactéries pathogènes *via* des appareils de sécrétion de type IV. D'après Backert et Meyer, 2006.

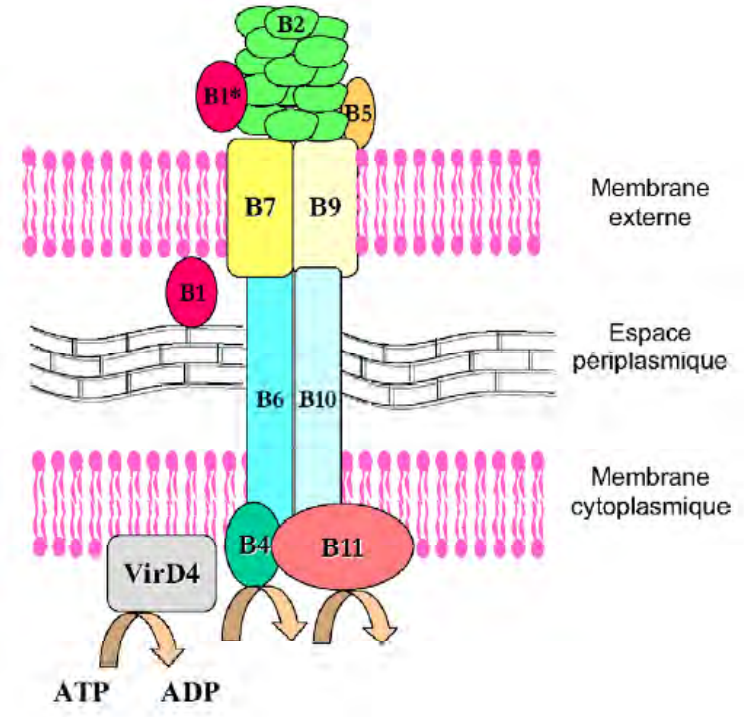
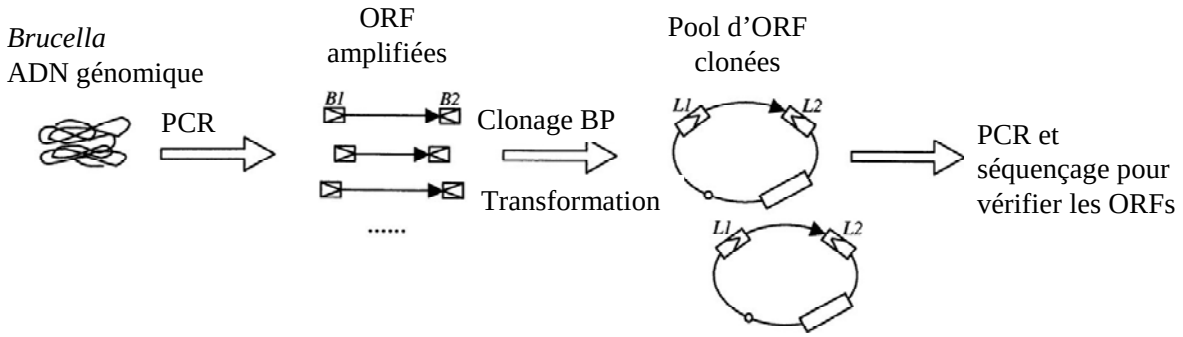


Fig. 2-11 : Représentation schématique de la structure de l'appareil de sécrétion modèle de type IV d'*Agrobacterium tumefaciens*. D'après Lavigne *et al.*, 2006.

La disponibilité du génome complet de *Brucella* a permis la création d'un ORFéome (Dricot *et al.*, 2004). Un ORFéome représente l'ensemble des séquences codantes prédites d'un organisme, clonées dans des vecteurs permettant le clonage par recombinaison Gateway. La construction d'un tel outil nécessite la validation des annotations des 3198 séquences ouvertes de lecture prédites ou ORF (Open Reading Frame) et en particulier des codons de départ. Grâce à cette réannotation, la construction de l'ORFéome a été possible, et s'est faite en trois étapes. Une première étape consistait à amplifier chacune des ORFs par PCR (Polymerase Chain Reaction) en leur ajoutant de part et d'autre la séquence des sites de recombinaison *attB1* et *attB2*. Ensuite, ces amplicons ont été clonés par recombinaison Int-dépendante avec les sites *attP1* et *attP2* (réaction BP) dans des vecteurs d'entrée portant un gène de résistance à la kanamycine. Les produits de clonage ont été transformés dans *E. coli* et les transformants sélectionnés sur milieu kanamycine. La dernière étape vérifie l'identité des ORF insérées par amplification PCR et séquençage, les résultats du séquençage étant comparés aux ORFs prédites du génome de *Brucella melitensis*.

Cet outil permet un clonage aisé des séquences codantes dans des vecteurs de destination (par une réaction LR) en vue d'expériences génomiques ou protéomiques à haut débit



Box : Description succinte et shéma des étapes de construction de l'ORFéome de *Brucella melitensis*. D'après une figure de Dricot *et al.*, 2004.

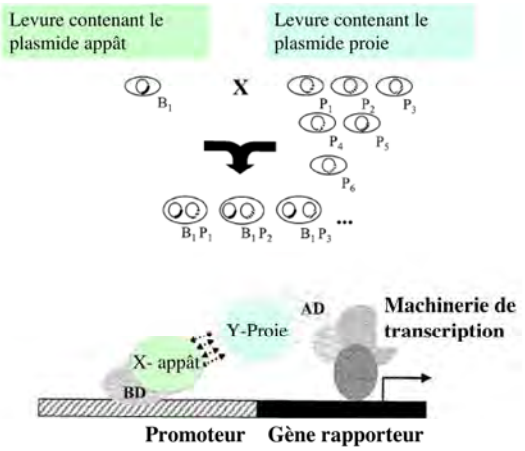


Fig. 2-12 : Représentation schématique du concept de l'interaction protéique double hybride en levure. D'après Legrain et Selig, 2000.

AD(Bm)	Homology	DB(Hs)	Homology
BMEI1161	Hypothetical Protein	11003@E12	nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)
BMEI0736	Ferripyochelin binding protein	11045@H07	RAB2, member RAS oncogene family
BMEI1974	DIACYGLYCEROL KINASE	11085@A12	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activi
BMEI1120	phosphotyrosyl phosphatase activator	11083@H10	Fas apoptotic inhibitory molecule
BMEI0920	MazG protein	11068@C09	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A10
BMEI1132	ATPases of the PP superfamily	11083@H10	Fas apoptotic inhibitory molecule
BMEI1244	Transporter	11006@H04	laminin receptor 1 (ribosom
BMEI0686	TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN, LYSR	11073@F08	hypoxia up-regulated 1
BMEI1395	MANNOSE-1-PHOSPHATE GUANYLYLTRANSFERA	11085@A12	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activi
BMEI0928	Acetate CoA-transferase alpha subunit (EC 2.8.3	11068@B11	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polyp
BMEI0928	Acetate CoA-transferase alpha subunit	11007@F05	BCL2-like 14 (apoptosis facilitator), transcript variant 4
BMEI0928	Acetate CoA-transferase alpha subunit (EC 2.8.3	11038@E02	chaperonin containing TCP1
BMEI0967	NAD-dependent malic enzyme (EC 1.1.1.39)	11046@B08	RAB39, member RAS oncogene family
BMEII0395	TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN, ASN	11038@D11	chaperonin containing TCP1
BMEII0410	Acetylglutamate kinase (EC 2.7.2.8)	11018@H07	proapoptotic caspase adaptor protein
BMEII0410	Acetylglutamate kinase (EC 2.7.2.8)	11023@D01	chromosome cathepsin Z (CTSZ)
BMEII0410	Acetylglutamate kinase (EC 2.7.2.8)	11077@A04	heat shock 60kDa protein 1
BMEII0410	Acetylglutamate kinase (EC 2.7.2.8)	11003@E12	nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)
BMEII0410	Acetylglutamate kinase (EC 2.7.2.8)	11027@E07	Niemann-Pick disease, type
BMEII0410	Acetylglutamate kinase (EC 2.7.2.8)	11085@A12	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activi
BMEII0410	Acetylglutamate kinase (EC 2.7.2.8)	11044@G08	PERP, TP53 apoptosis effector
BMEII0690	FrnE protein	11084@D03	Fas (TNFRSF6)-associated \
BMEII0588	FdhD protein	11028@E06	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydrox
BMEII0900	MANNOSE-6-PHOSPHATE ISOMERASE (EC 5.3.1.	11010@E11	tubulin, alpha 2, transcript variant 2
BMEII1037	ZINC PROTEASE	11019@D06	RAB7, member RAS oncogene family-like 1
BMEII1037	ZINC PROTEASE	11060@H05	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 5
BMEII1037	ZINC PROTEASE	11045@A02	BH3 interacting domain death agonist
BMEII1037	ZINC PROTEASE	11061@F09	actin-related protein 3-beta
BMEII1037	ZINC PROTEASE	11044@D06	ferritin, heavy polypeptide :
BMEII1037	ZINC PROTEASE	11021@E10	homeo box B13
BMEII1037	ZINC PROTEASE	11007@F05	BCL2-like 14 (apoptosis fac

Tableau 2-3 : Tableau reprenant les 17 effecteurs putatifs identifiés en double hybride (colonne de gauche, ORFs et annotations) par A. Jamet et de leurs interactants protéiques humains (Colonnes de droite, ORFs et annotations).

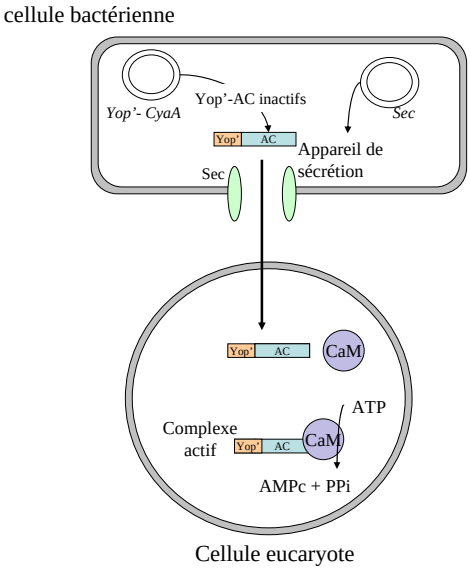


Fig. 2-13 : Représentation schématique du test utilisant l'adénylate cyclase (AC) de *Bordetella pertussi*s mettant en évidence la sécrétion de protéines hybrides Yop'-AC exprimées dans la celule bactérienne vers la cellule eucaryote. CaM : Calmoduline. D'après Ladant et Ullmann, 1999.

Fig. 2-14 : Représentation schématique du signal de fluorescence émis à 528nm grâce à la coordination des atomes d'arsenic du réactif Lumio par les cystéines du tag Lumio.