

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Identification de partenaires physiques dans le réseau de régulation PdhS-DivK chez *Brucella* spp.

Dotreppe, Delphine

Award date:
2006

Awarding institution:
Université 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.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

NAMUR

Faculté des Sciences

Identification de partenaires physiques dans le réseau de régulation PdhS-DivK chez *Brucella* spp.

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Delphine Dotreppe

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 DE PARTENAIRES PHYSIQUES DANS LE RESEAU DE REGULATION PdHS-DivK
CHEZ *BRUCELLA* SPP.**

Delphine Dotreppe

Résumé:

Depuis quelques temps, la communauté scientifique s'accorde à dire que la différenciation cellulaire est une caractéristique inhérente des mondes eucaryote et procaryote. Dans ce contexte, *Caulobacter crescentus* est considéré comme un modèle de différenciation procaryotique. Sa parenté phylogénétique, au sein de la famille des α -protéobactéries, avec le genre *Brucella* permet d'appréhender avec *a priori* les mécanismes moléculaires impliqués dans l'asymétrie et la différenciation. CtrA, un régulateur de réponse global appartenant au système à deux composants, fait partie d'un réseau de régulation qui a un rôle central dans la différenciation et la division cellulaire chez *C. crescentus*. Ce réseau de régulation est constitué des histidines kinases CckA, DivJ, DivL et PleC ainsi que du régulateur de réponse DivK, et ces protéines affectent toutes l'état phosphorylé et/ou la stabilité de CtrA. CtrA est tout son réseau de régulation présente un homologue chez *Brucella* spp. Par ailleurs, nous retrouvons une histidine kinase supplémentaire chez *Brucella* spp., sans homologue proche prédit à partir du génome de *C. crescentus*, PdhS, qui interagirait avec DivK et pourrait donc contrôler son état de phosphorylation. La fonction exacte de PdhS dans le réseau de régulation de CtrA chez *Brucella* spp est méconnue. PdhS présente la particularité de posséder un grand domaine cytoplasmique pour lequel aucune fonction n'a pu être prédite, et d'être localisée à un pôle de la cellule. Comme la surexpression de *ctrA*, la surproduction de *pdhS* donne un phénotype caractéristique de défaut dans la division cellulaire.

Afin de disséquer les fonctions de PdhS et de DivK dans le réseau de régulation de CtrA impliqué dans l'asymétrie chez *Brucella* spp., deux approches expérimentales successives ont été réalisées. La première consiste en l'identification de partenaires physiques potentiels par la méthode du double hybride en levure. La seconde consiste à caractériser des candidats partenaires par l'examen de la morphologie de mutants de surexpression de ces partenaires, et par l'examen de localisation de fusions avec la *yellow fluorescent protein* (YFP) dans la souche *Brucella abortus* 544. Ces deux expériences ont permis de renforcer le lien fonctionnel prédit entre PdhS ou DivK avec leurs partenaires respectifs.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2006

Promoteur : Prof. X. De Bolle

Co-promoteur : Prof. J.-J. Letesson

Je voudrais tout d'abord remercier le Professeur Jean-Jacques Letesson (co-promoteur) de m'avoir accueillie dans son laboratoire et le Professeur Xavier De Bolle (promoteur) pour m'avoir accordé une part non négligeable de son temps. Merci pour votre gentillesse et votre attention envers moi.

Un tout grand merci à toi Johann pour ta gentillesse et ta disponibilité. Merci de m'avoir transmis tes nombreuses connaissances scientifiques (c'est assez impressionnant). Merci, merci, merci...

Je remercie Marie pour ses conseils et son aide précieuse pour les corrections.

Je remercie d'avance Madame C. Lambert et Messieurs T. Arnould, D. Hermand et A. Jamet pour le temps que vous allez consacrer à la lecture critique de ce mémoire.

Merci à tous les URBMiens pour leur convivialité. C'est extrêmement agréable de travailler dans un cadre de vie comme celui là.

Je remercie également mes parents qui m'ont permis de faire ces études, merci d'avoir toujours été là pour moi dans les bons moments comme dans les plus difficiles.

Liste des abréviations

Abrév.	Nom complet	Explication complémentaire
2H	Double hybride	Test d'interaction protéique en levure
3AT	3-Amino-1,2,4-Triazole	Inhibiteur de <i>His3</i>
AD	Activating domain	Domaine de transactivation de Gal4
Amp	Ampicilline	Antibiotique
BD	Binding domain	Domaine de liaison à l'ADN de Gal4
<i>bla</i>	b-lactamase	Gène de résistance à l'ampicilline
<i>cat</i>	Cm-acétyltransférase	Gène de résistance au chloramphénicol
CDS	Coding sequence	Séquence codante d'une protéine
Cm	Chloramphénicol	Antibiotique
DIC	Differential interference contrast	Mode d'observation en microscopie photonique
DO	Densité optique	Mesure, entre autre, le nombre de bactéries
GW TM	Gateway TM	Technique de clonage par recombinaison
H	Histidine	Acide aminé
HK	Histidine kinase	Acteur du système à deux composants
Hpt	Histidine phosphotransférase	Acteur du système à deux composants
Kan	Kanamycine	Antibiotique
Kda	Kilodalton	10 ³ Daltons (unités de masse moléculaire)
Kb	Kilopaires de base	10 ³ paires de bases nucléotidiques
L	Leucine	Acide aminé
LB	Luria Bertani	Milieu de culture riche pour bactéries
LPS	Lipopolysaccharide	Feuillet lipidique externe de la membrane externe des bactéries Gram négatives
Nal	Acide nalidixique	Antibiotique
<i>Npt</i> ou <i>kan^R</i>	Néomycine phosphotransférase	Gène de résistance à la kanamycine
ORF	Open reading frame	Phase ouverte de lecture
pb	Paire de base	Deux nucléotides appariés
PBS	Phosphate buffer saline	Solution phosphatée saline à osmolarité physiologique
PCR	Polymerase chain reaction	Technique d'amplification de fragments ADN
rpm	Rotation par minutes	Unité de centrifugation
RR	Régulateur de réponse	Acteur du système à deux composants
ts, cs	Thermo-, cryosensible	Létalité d'une souche à température élevée, basse
U	Uracile	Nucléotide
W	Tryptophane	Acide aminé
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside	Solution utilisée dans le test β-Gal
YFP	Yellow fluorescent protein	Protéine fluorescente qui émet dans le jaune

Tables des matières

Avant-propos	2
Introduction	5
<i>Brucella</i>	5
Épidémiologie	5
Pathogénie	6
Phylogénie	8
<i>Caulobacter crescentus</i> : Un modèle de différenciation	9
<i>Caulobacter crescentus</i> – Une bactérie dimorphique polarisée ^(Poindexter, 1981)	10
Approches globales pour l'étude du cycle cellulaire	10
CtrA - Un régulateur de réponse global	11
Le régulon CtrA	12
Régulation de l'activité de CtrA	12
Trois voies de transduction du signal en amont de CtrA	13
La voie CckA	13
DivL : Une kinase senseur avec une structure unique ^(Wu et al., 1999)	14
Le réseau PleC-DivJ-DivK	14
Les partenaires du mini-réseau PleC-DivJ-DivK	15
Localisation au cours du cycle cellulaire	15
Les voies CckA et DivL	16
Le réseau PleC-DivJ-DivK	16
Facteurs de localisation : PodJ, TipN et TipF	17
<i>Brucella</i> ssp. : Asymétrie (et différenciation)	18
Division asymétrique	19
<i>Sinorhizobium meliloti</i> : un tremplin pour <i>Brucella</i>	19
Plasticité du réseau de régulation	20
Similitudes et divergences	20
PdhS : un nouveau protagoniste	20
Objectifs du mémoire	22
Résultats et discussion	24
Première partie Recherche d'interactants physiques de PdhS et DivK	25
Test des interactions	27
Mise en évidence des interactions	27
Mating (cfr figure 23)	28
Confirmation	30
Discussion	32
Deuxième partie Caractéristiques phénotypiques	34
Mutants de surexpression	34
Construction des souches de surexpression	34
Préparation et analyses des phénotypes associés à la surexpression des différents candidats	35
Contrôle négatif	35
Test des interactants putatifs de PdhS	37
Test des interactants putatifs de DivK	39
Discussion	40
Localisation subcellulaire	41
Construction des souches	42
Préparation et analyses de la localisation subcellulaire des différents candidats	42
Pertinence des résultats	47
Discussion	48

Conclusions générales et perspectives	50
Matériel et méthodes	54
Souches et plasmides	54
Souches	54
Plasmides	55
Milieux de culture	56
Tampons et solutions	57
Méthodes	59
Techniques relatives à l'ADN	59
Polymerase chain reaction (PCR)	59
Électrophorèse en gel d'agarose	60
Restriction de plasmide	61
Purification sur gel	61
Purification sur colonne	62
Minipréparation de plasmide	62
Séquençage	62
Clonage Gateway™	63
Techniques relatives à l'utilisation de bactéries	64
Préparation de cellules <i>E.coli</i> électro-compétentes (DH10B/S17-1)	64
Transformation bactérienne par électroporation	65
Conjugaison	65
Coloration (de) Gram	66
Techniques relatives à l'utilisation de levures	67
Test d'interaction protéique en double-hybride	67
Transformation de levures par choc thermique	68
Test β -Galactosidase ^(Walhout and Vidal, 2001)	68
Techniques relatives aux protéines	69
Analyse de l'expression d'une protéine par Western blot	69
Techniques relative à la microscopie	71
Appareillage	71
Préparation d'échantillons pour la microscopie	71
Molécules fluorescentes	72

« Mardi dernier nous avons inoculé tous les moutons, les vaccinés et les non vaccinés, par le charbon très virulent. Or la dépêche annonce que, quand nous arriverons aujourd'hui à deux heures tous les non vaccinés seront morts. Quant aux vaccinés, tous sont debout. La dépêche se termine par les mots : succès épatant. La joie est au laboratoire et à la maison. Réjouissez-vous mes chers enfants. »

Louis Pasteur, 2 juin 1881.

Avant-propos

Les génomes bactériens présentent une énorme plasticité évolutive dans la fonction de gènes, dans leur organisation structurale et dans l'organisation des réseaux de régulation pour ne citer qu'eux. Depuis des millions d'années, ces génomes ont été considérablement remaniés et ont évolués, sans doute contribuant à ce que les bactéries occupent pratiquement toutes les niches écologiques existant sur Terre. Des modifications ont eu lieu notamment dans les réseaux de régulation qui contrôlent les opérations cellulaires, la progression du cycle cellulaire et les réponses aux signaux environnementaux^(McAdams *et al.*, 2004). Le réseau de régulation CtrA dont nous parlerons par la suite, est un exemple parlant de ces modifications au cours de l'évolution. CtrA est une protéine présente chez toutes les α -protéobactéries et est connue pour contrôler de nombreuses fonctions du cycle cellulaire chez la bactérie non pathogène *Caulobacter crescentus* (voir page 9). CtrA fait partie d'un système à deux composants qui est impliqué dans la différenciation. Dans sa forme la plus simple et la plus commune, le système à deux composants est constitué, comme son nom l'indique, de deux partenaires. Le premier, une histidine kinase (HK) ou kinase senseur, sent un paramètre environnemental défini. D'ordinaire localisée en membrane plasmique, elle comporte un domaine senseur, un domaine de liaison à l'ATP et un domaine portant l'histidine autophosphorylable. Le second, un régulateur de réponse (RR) cytoplasmique, est constitué d'un domaine receveur doté d'un résidu aspartate accepteur de phosphate et d'un domaine effecteur qui exécute une réponse adaptative et qui généralement s'avère être un facteur de transcription. Suite à la perception de signaux externes ou internes au niveau de son domaine senseur, une HK s'autophosphoryle de manière ATP-dépendante sur son résidu histidine spécifique. Le groupe phosphorylé est ensuite transféré sur un résidu aspartate conservé situé sur le domaine receveur d'un RR apparenté. De manière générale, cette phosphorylation a pour effet d'activer le second domaine en augmentant dans le cas d'un facteur de transcription (cas majoritaire des RR) l'affinité pour ses sites de liaison à l'ADN et favorisant donc la régulation transcriptionnelle positive ou négative des gènes cibles (Fig.1a). Deux autres formes atypiques et plus complexes existent également. Dans le premier cas, les transferts de phosphate s'effectuent le long d'une cascade ou phospho-relais comportant des intermédiaires tels qu'un RR constitué uniquement d'un domaine aspartate receveur et d'une histidine phosphotransférase (Hpt) et menant d'une HK à un RR. (Fig.1b)^(Khorchid and Ikura, 2006). Le phosphate « coule » d'une protéine à l'autre en alternant entre une histidine et un aspartate conservés. L'insertion de nouveaux intermédiaires a pour but d'augmenter les niveaux de contrôle et permet ainsi une régulation plus fine du réseau qui, *in fine*, induit une réponse appropriée aux besoins cellulaires. Le second cas est constitué par les kinases hybrides, kinases particulières dont un domaine aspartate receveur est lié à l'extrémité carboxy-terminale de l'HK senseur. Dans ce cas-ci, une Hpt fait inévitablement le lien entre la kinase hybride et le RR. Ces systèmes à deux composants sont des systèmes de régulation dans lesquels les sites de phospho-réaction entre les différentes protéines homologues des différents organismes sont fortement conservés, résultat probablement d'une évolution convergente. Par contre, on observe une modularité plus importante dans les domaines senseurs et effecteurs des protéines du système à deux composants, résultat probablement d'une évolution divergente de ces réseaux de régulation. À ce titre, la plasticité du réseau de régulation CtrA chez les α -protéobactéries est intéressante. C'est un réseau complexe, au sommet duquel nous trouvons deux HK chez *C. crescentus*. Chez d'autres α -protéobactéries,

nous trouvons une ou deux HK supplémentaires, que nous avons nommé PdhS. PdhS est composée d'un domaine typique au système à deux composants avec une histidine conservée ainsi que d'un domaine senseur n'ayant aucune homologie avec d'autres HK. La présence d'HK supplémentaire témoigne de la plasticité du réseau de régulation au point de vue évolutif.

Introduction

Introduction

Depuis l'observation de la première cellule bactérienne, au 17^{ème} siècle par Anton van Leeuwenhoek, le monde bactérien n'a jamais cessé d'intéresser et d'étonner les scientifiques. Le terme bactérie correspond à plus d'un million d'espèces et représentent la forme de vie la plus ancienne sur Terre (apparition estimée à 3,8 milliards d'années) et il n'est pas exclu que leur origine soit extra-terrestre. Comme mentionné ci-avant, les bactéries ont su développer des mécanismes tantôt simples tantôt complexes pour s'adapter à la plupart des niches écologiques existant sur Terre. Ainsi, les bactéries ont réussi à coloniser les niches minérales (eau, sol,...) les plus extrêmes, notamment les habitats hypersalins (Grand lac salé au USA) ou les environnements marins chauds (cheminées hydrothermiques) mais aussi les niches biologiques. Par exemple, les Bactéries fixatrices d'azote du genre *Rhizobium* vivent en symbiose avec des Légumineuses (pois, haricots, soja,...) et *Escherichia coli* qui font partie de la microflore intestinale de l'Homme et des animaux à sang chaud. Parmi cette incroyable diversité, il y a bien sûr des formes pathogènes dont les bactéries du genre *Brucella*. C'est justement leur pathogénécité qui les rend attrayante au point de vue scientifique. De plus, elles ont récemment été classées comme arme biologique potentielle, augmentant tristement d'un cran l'intérêt porté à ce pathogène.

Avant de commencer et d'entrer dans le vif du sujet, j'exposerai les différents points que j'aborderai dans cette première partie. Cette introduction s'articulera autour de trois sujets principaux. Le premier point traitera du pathogène en question à savoir *Brucella* spp. Le second point concernera une autre bactérie, *Caulobacter crescentus*, qui sert de modèle de différenciation pour le monde bactérien en général et *Brucella* spp. en particulier. Ceci conduira, au troisième point, la discussion d'une éventuelle différenciation chez *Brucella* spp. Enfin, j'exposerai les objectifs du mémoire.

Brucella

Épidémiologie

Autrefois connue sous le nom de fièvre de Malte, la Brucellose, maladie à étendue mondiale, doit son nom à Sir David Bruce^(Allardet-Servent et al., 1988). Elle est caractérisée par des infections chroniques chez les animaux, provoquant avortement chez les femelles et stérilité chez les mâles. La maladie se caractérise par de multiples plaintes d'ordre général (fièvre, sueurs, anorexie, fatigue, perte de poids et dépression). La brucellose humaine est une infection systémique dont les symptômes non spécifiques apparaissent après deux à trois semaines d'incubation. Elle est causée par les agents pathogènes appartenant au genre *Brucella*. À ce jour, le genre *Brucella* est constitué de huit espèces : *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella neotomae*, *Brucella canis*, *Brucella ovis*, *Brucella cetaceae* et enfin, *Brucella pinnipedia*^(Jahans et al., 1997). Chaque espèce a un hôte ou une gamme

d'hôtes préférentiels. *B. abortus* s'établit essentiellement chez les animaux composant le bétail. *B. melitensis* s'installent chez les caprins (chèvre) ainsi que chez les ovins (moutons et brebis) comme le fait *B. ovis*. *B. canis* infecte le chien, *B. neotomae* le rat du désert et *B. suis* a un tropisme pour les suidés (porcs, sangliers,...) et les rennes. *Brucella cetaceae* et *Brucella pinnipedia* sont identifiés, respectivement, chez les cétacés (baleines, dauphins et marsouins) et chez les pinnipèdes (phoques, otaries et morses). Bien qu'asporulée, *Brucella* spp. survit pendant plusieurs mois dans le milieu extérieur (lait, étables, prairies, sol, fumier...). Chez l'animal, il existe une transmission directe qui est soit fœto-maternelle, soit génitale, soit digestive par absorption d'aliments contaminés (lait, placenta) et une transmission indirecte par l'environnement. Chez l'Homme, la contamination directe représente 75% des cas. Elle peut s'effectuer suite à la consommation d'aliments contaminés (produits laitiers non pasteurisés ou viande insuffisamment cuite) ou par contact cutané ou muqueux avec des animaux infectés notamment dans le milieu professionnel (fermiers, scientifiques,...). La contamination indirecte (25% des cas) est réalisée par l'ingestion de crudités souillées par du fumier, par des mains sales, par de la poussière de litière. La transmission interhumaine est exceptionnelle. La maladie est devenue rarissime en Europe du Nord, au Canada, en Australie, en Nouvelle Zélande, au Japon et en Israël. Par contre, elle reste endémique dans la plupart des pays en voie de développement, où elle provoque toujours des ravages^(Boschiroli et al., 2001). Notons que *B. melitensis* et *B. suis* sont plus virulentes pour l'homme que *B. abortus* ; les infections de *B. canis* sont rares.

Seul le diagnostic bactériologique par culture et isolement de la souche apportera la certitude d'une contamination, même si le diagnostic sérologique est le plus fréquent. Le test de séroagglutination de Wright constitue l'examen de référence et le test ELISA est utilisé pour la détection d'anticorps dans le sang. Une fois le diagnostic établi, on traite les patients avec différents antibiotiques. Traditionnellement, l'administration de la tétracycline en combinaison avec la streptomycine était la thérapie recommandée pour la brucellose humaine. Grâce à son temps de demi vie plus long, la doxycycline a remplacé la tétracycline. L'association avec un second agent est encore préconisé afin d'empêcher une rechute. En général, il s'agit de la rifampicine^(Jay P. Sanford et al., 1997).

Pathogénie

Petits coccobacilles à Gram négatif de 1,2 µm de long sur 0,8 µm de large (Fig.2), les bactéries du genre *Brucella* sont des pathogènes intracellulaires facultatifs. Contrairement à d'autres bactéries pathogènes, *Brucella* ne possède pas de facteurs de virulence classiques connus tels que capsule, exotoxines, exoenzymes, formes de résistance, plasmides.... Les facteurs de virulence classiques sont ceux qui lui permettent d'envahir la cellule hôte, de résister aux agressions intracellulaires et d'atteindre leur niche de réplication dans les phagocytes professionnels et non professionnels. *Brucella* pénètre l'organisme via plusieurs voies: cutanée, digestive ou respiratoire, puis gagne par voie lymphatique le premier relais ganglionnaire. Elle se multiplie et se dissémine dans tout l'organisme par voie lymphatique et sanguine (bactériémie). Après un certain temps, elle se fait phagocyter plus ou moins rapidement par une cellule spécialisée (macrophage, polymorphonucléaire,...) puis détruite avec libération d'antigène et d'endotoxine. Dans l'ensemble des tissus, les macrophages constituent la première ligne de défense de la réponse immune innée contre les micro-organismes envahisseurs. Cependant, l'immunité à médiation cellulaire est également essentielle pour la défense de l'organisme contre l'infection. Les lymphocytes T renforcent l'activité bactéricide des macrophages qui détruisent les *Brucella* au sein d'un granulome

spécifique^(Celli, 2006). Evoluant dans un milieu hostile, *Brucella* va tenter néanmoins de contrer les attaques du système immunitaire.

Suite à son entrée qui requiert des lipid rafts fonctionnels sur les phagocytes^(Watarai et al., 2002), on retrouve *Brucella* non opsinisée dans une vacuole appelée dès lors *brucella*-containing-vacuole ou BCV. Pour information, les lipid rafts sont des microdomaines membranaires riches en cholestérol. Dans le schéma normal de phagocytose, la vacuole fusionne avec un endosome précoce et ensuite avec un endosome tardif, obligeant la bactérie à faire face à l'acidification. La fusion finale avec des lysosomes porte un coup fatal à cette tentative infectieuse via la libération de facteur lytique^(Aderem, 2003). Cependant, *Brucella* spp. utilise une stratégie qui lui permet de court-circuiter la voie lysosomale classique de dégradation et qui dévie le trafic vacuolaire à son avantage pour créer une niche intracellulaire propice à sa réplication (Fig.3). Cette vacuole interagit avec des endosomes précoces mais elle évite la fusion avec les endosomes tardifs et les lysosomes^(Pizarro-Cerda et al., 1998). Notons que l'acidification résultante d'une interaction avec des endosomes précoces s'avère être nécessaire pour l'induction de facteurs de virulence^(Porte et al., 1999). Ensuite, elle exerce une interaction avec le réticulum endoplasmique d'une manière soutenue menant à la fusion de ces deux organelles^(Celli et al., 2003). Celle-ci génère une vacuole dérivée du réticulum endoplasmique permissive à la division bactérienne et présentant certains marqueurs du réticulum endoplasmique.

Ci-dessous, trois facteurs connus qui participent à la virulence chez *Brucella* spp. sont décrits :

- **Le LPS**

De manière générale, le lipopolysaccharide ou LPS des bactéries Gram- est composé d'un lipide A hydrophobe lié à un noyau oligosaccharidique, très compact et chargé, lui-même associé (LPS lisse) ou non (LPS rugueux) à une chaîne de O-polysaccharide hydrophile (O-chain) (Fig.4). Le lipide A chez *Brucella* possède un squelette de diaminoglucose (plutôt que de glucosamine) et des groupes acyles plus longs (de 18 à 28 carbones plutôt que 12 à 14) qui sont seulement liés au noyau par des liaisons amides (plutôt que des liaisons ester et amide)^(Lapaque et al., 2005). Le LPS de toutes les espèces de *Brucella* est lisse, c'est-à-dire avec une O-chain, à l'exception de *B. canis* et *B. ovis* dont le LPS est rugueux. L'intégrité du LPS sur la surface bactérienne est un des facteurs requis pour la survie intracellulaire. Les *Brucella* spp. expriment un LPS non conventionnel ce qui leur donne une très basse endotoxicité ainsi qu'une protection contre les peptides cationiques antimicrobiens et l'action du complément^(Erridge et al., 2002). Ce LPS particulier joue également un rôle dans l'entrée et la survie précoce dans les macrophages.

- **β -1,2 glucans**

Récemment, il a été démontré que des β -1,2 glucans cycliques, produits par *Brucella*, modulent la maturation des vacuoles contenant *Brucella* pour empêcher la fusion avec les lysosomes^(Dermine et al., 2001). Ce β -1,2 glucan cyclique, composé de plusieurs dizaines de monomères de glucose, est similaire à celui qui est synthétisé par d'autres α -protéobactéries telles que *Agrobacterium* et *Rhizobium*^(Bohin, 2000). De plus, les bactéries présentant des mutations dans le gène encodant la β -1,2 glucan synthétase (*cgs*) sont atténuées en modèle murin^(Briones et al., 2001).

- **VirB**^(Boschiroli et al., 2002)

La recherche de mutants incapables de survivre et de se multiplier dans les cellules eucaryotes a débouché sur la découverte chez *Brucella* spp. d'un système de sécrétion de type IV (SSTIV) qui interviendrait dans au moins une étape du processus de phagocytose (Fig.5).

Ce système de sécrétion est essentiel à la survie intracellulaire et à la multiplication de *B. suis*, *B. melitensis* et *B. abortus* et se rencontre fréquemment en surface d'autres bactéries pathogènes. Cette machine d'exportation leur sert généralement de seringue pour injecter des facteurs de virulence indispensables dans le processus d'infection soit directement dans les cellules hôtes soit dans l'environnement. Dans le cas de *Brucella*, cet appareil de sécrétion est encodé par douze gènes dont 11 trouvent un homologue dans l'opéron *virB* d'*A. tumefaciens*, mais aucun effecteur sécrété n'a encore été identifié.

Brucella a développé de multiples stratégies complémentaires visant à désarmer les fonctions bactéricides des macrophages de l'hôte pendant son trafic intracellulaire jusqu'à une niche de division^(Celli, 2006). Le mode d'entrée est tributaire du LPS qui, bien que pas encore entièrement caractérisé, détermine partiellement la survie bactérienne précoce en retardant la fusion lysosomiale. Ce mécanisme est renforcé par l'action des b-1,2 glucans cycliques qui perturbent les lipid rafts phagosomaux impliqués dans la maturation le long de la voie endocytaire. Cependant, ces dispositifs ne suffisent pas pour assurer une survie bactérienne à long terme. L'échappement des fonctions lytiques du macrophage exige un appareil de sécrétion de type IV fonctionnel et trouve son terme dans la transformation du BCV en un compartiment dérivé du RE permissif à la réplication^(Celli, 2006).

Phylogénie

L'embranchement des Proteobacteries est divisé en plusieurs classes nommées alpha-, bêta-, gamma-, delta- et epsilon- protéobactéries. *Brucella* spp. appartient à la classe des α -protéobactéries dont plusieurs membres possèdent plus d'un réplicon essentiel désignés comme des chromosomes. Certains de ces mégaréplicons supplémentaires ont une collection de « housekeeping » gènes et ne sont pas mobilisables par conjugaison. Tout le genre *Brucella* possède deux chromosomes d'environ 2.1 et 1.15 Mb, à l'exception de certaines souches de *B. suis*, qui n'en possèdent qu'un de 3,2 Mb. Deux hypothèses opposées ont été proposées. La première suggère que les souches contenant deux chromosomes ont émergé par recombinaisons homologues sur un mégaréplicon conduisant à l'excision d'un second chromosome ; la seconde penche pour une origine plasmidique du petit chromosome devenant indispensable au cours de l'évolution par incorporation de gènes essentiels^(Jumas-Bilak et al., 1998).

La classe des α -protéobactéries à laquelle appartient le genre *Brucella* est hautement diversifiée^(Moreno, 1998). Elle comprend entre autres des symbiontes de légumineuses tels *Sinorhizobium meliloti* et *Mesorhizobium loti*, des pathogènes de plantes tels *Agrobacterium tumefaciens*, des pathogènes intracellulaires obligatoires d'animaux tels *Rickettsia prowazekii* (agent infectieux du typhus), *Rickettsia conorii*, des pathogènes intracellulaires facultatifs d'animaux tels *Bartonella henselae*, des bactéries pourpres telles *Rhodopseudomonas palustris* et des bactéries ubiquistes vivant à l'état libre telles *Caulobacter crescentus* et *Rhodobacter capsulatus*. Sur base de résultats d'hybridation ADN-ARNr, de la comparaison des séquences d'ARNr 16S et des lipides membranaires, les bactéries du genre *Brucella* sont considérées comme proches d'autres bactéries appartenant aux genres *Agrobacterium* et *Rhizobium*. Cet ensemble forme la subdivision α_2 de la classe des Protéobactéries^(Moreno et al., 1990). De récentes études suggèrent que la majorité des α -protéobactéries se divisent de façon asymétrique et on suspecte dès lors une différenciation^(Hallez et al., 2004). Le contrôle du cycle cellulaire ainsi que l'établissement de l'asymétrie chez *Caulobacter crescentus*, un membre des α -protéobactéries, est mieux compris parce que plus étudié.

De récentes observations suggèrent que la majorité des α -protéobactéries se divisent de façon asymétrique, sous-tendant dès lors une possible différenciation. CtrA, un régulateur de réponse essentiel conservé chez toutes les α -protéobactéries, a un rôle central dans le contrôle du cycle cellulaire ainsi que l'établissement de l'asymétrie chez *Caulobacter crescentus*, un membre des α -protéobactéries, mieux compris car plus étudié.

Caulobacter crescentus : Un modèle de différenciation

La bactérie aquatique non pathogène *Caulobacter crescentus* a émergé comme modèle pour, d'une part la différenciation cellulaire, et d'autre part pour la coordination du cycle cellulaire procaryotique. Chaque division cellulaire chez cet organisme produit deux cellules filles qui sont morphologiquement et fonctionnellement distinctes : une cellule pourvue d'un appendice polaire nommé indifféremment stalk, pédoncule ou prostheca ainsi que d'une seconde cellule monoflagellée à l'un de ses deux pôles (Fig.6)^(Poindexter, 1981). La division cellulaire asymétrique est une caractéristique commune dans le cycle de vie de nombreuses bactéries. L'exemple le mieux connu est *Bacillus subtilis* qui, sous certaines conditions de famine, peut se diviser asymétriquement pour produire une spore. De plus, certaines bactéries, telles que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri* et *Listeria monocytogenes*, peuvent sembler symétriques mais, après inspection plus minutieuse, ont des pôles associés à des appendices polaires différents^(Skerker and Laub, 2004).

Les recherches impliquant *Caulobacter crescentus* ont été surtout consacrées à l'étude de la différenciation ainsi qu'à l'éclaircissement des mécanismes qui contrôlent la morphogénèse polaire (synthèse/perte du flagelle et des pili et formation du stalk) et la progression du cycle cellulaire. Depuis plusieurs années, *C. crescentus* a même pris place auprès de *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* en tant que modèle pour l'étude des réseaux génétiques et des réseaux de régulation qui contrôlent le cycle cellulaire bactérien dans les dimensions spatio-temporelles. Son étude est rendue plus aisée suite à l'observation de traits phénotypiques caractéristiques de chaque phase du cycle cellulaire telles que la mobilité qui va de paire avec la rotation d'un flagelle fonctionnel et la chémotaxie, ou encore la résistance/sensibilité aux bactériophages ϕ CbK due à l'absence/présence de pili de type IV qui interviennent dans l'adhésion aux surfaces abiotiques et biotiques et qui se situent au pôle flagellé. Une autre force du modèle est la facilité à obtenir des populations de cellules synchronisées par centrifugation en gradient de densité qui sépare les cellules nageuses des cellules stalkées ou pédonculées^(Evinger and Agabian, 1977). Ceci permet l'examen de changements au point de vue de la morphologie, du taux d'ARNm, du taux de protéines et de leur localisation subcellulaire au cours du cycle. Grâce à son génome complètement séquencé et annoté, on peut visualiser l'expression de manière systématique par DNA microarrays des 3767 gènes prédits qu'encode le génome de *C. crescentus*^(Ausmees and Jacobs-Wagner, 2003). Tous ces avantages en font un organisme facile à étudier et ce en contraste par rapport à l'étude d'un pathogène dont la pathogénécité limite techniquement son étude. Dans le cas de *Brucella abortus*, sa manipulation requiert un laboratoire de niveau de sécurité de biosécurité 3 (BL3) spécialement organisé et équipé pour limiter sa dispersion dans l'environnement. Même sur un milieu plus riche, *Brucella abortus* a un temps de génération relativement important, de l'ordre de 2 à 3h, limitant le nombre d'expérimentations réalisables en un temps réduit. De plus, *Brucella abortus* ne présente pas de traits phénotypiques caractéristiques tels que la

présence d'un flagelle, de pili, d'un stalk, d'une division asymétrique prononcée, facilement identifiables en microscopie. Néanmoins, *Brucella melitensis* semble posséder un flagelle mais, étant donné sa production trop fugace, ceci rend difficile toute observation au microscope^(Fretin et al., 2005).

***Caulobacter crescentus* – Une bactérie dimorphique polarisée^(Poindexter, 1981)**

Les bactéries membres du genre *Caulobacter* peuplent la majeure partie des espaces d'eau douce sur Terre, où elles jouent un rôle important dans le cycle global du carbone par minéralisation du matériel organique dissous. L'une des caractéristiques la plus spectaculaire de ces bactéries est leur dimorphisme. Celui-ci est maintenu par une division cellulaire asymétrique qui s'opère à chaque cycle de division, donnant lieu à deux cellules filles génétiquement identiques mais morphologiquement distinctes et avec des programmes développementaux différents : une cellule sessile équipée d'un stalk à extrémité adhésive et une cellule mobile nageuse pourvue d'un flagelle. Munie d'un flagelle et de pili de type IV ainsi que d'un appareil de chimotaxie fonctionnel à l'un des deux pôles, la cellule nageuse, passe par une phase de vie mobile pendant laquelle la réplication du chromosome et les programmes de division cellulaire sont inhibés (phase G1). Après cette période quiescente mobile et après avoir atteint un milieu propice à sa survie, la cellule nageuse passe par une phase dite de transition G1-S où elle entame une différenciation cellulaire qui implique l'éjection du flagelle, la rétraction des pili et la formation d'un stalk au pôle précédemment occupé par le flagelle et les pili (Fig.7). Le stalk, prolongement de l'enveloppe bactérienne dépourvu d'ADN ou de ribosomes, est terminé par une extrémité collante ou holdfast qui permet d'ancrer la bactérie à son substrat. La cellule stalkée, en initiant une réplication chromosomique (S), passe à un état prédivisionnel précoce et glisse vers un état prédivisionnel tardif en synthétisant un nouveau flagelle non fonctionnel au pôle opposé au stalk, en ségrégant ses chromosomes et en entamant une constriction transversale (phase G2). L'achèvement de cette constriction (cytokinèse) et la séparation des cellules filles mènent directement, d'une part, à l'acquisition de la mobilité du flagelle et à la biogenèse des pili chez la nouvelle cellule flagellée, et d'autre part, à la compétence pour l'initiation de la réplication chez la cellule stalkée. *C. crescentus* vit généralement dans des environnements aquatiques dilués où un des nutriments le plus limitant semble être le phosphate. Un manque de phosphate induit une élongation dramatique du stalk. En effet, sa taille peut augmenter jusqu'à trente fois par rapport à celle observée dans un milieu riche en phosphates^(Gonin et al., 2000). Cette élongation augmente considérablement la surface cellulaire totale et de cette façon accroît l'absorption de nutriments^(Ireland et al., 2002). En fin de vie, la cellule stalkée arrête de se diviser, allonge son stalk jusqu'à ce qu'il casse induisant dès lors sa mort.

Approches globales pour l'étude du cycle cellulaire

Le séquençage du génome (+/- 4 Mb) de *Caulobacter crescentus*, encodant 3767 gènes, a fourni une source intéressante pour des approches protéomiques et génomiques. Dans le premier cas, l'étude à large échelle du taux de synthèse des protéines, utilisant l'électrophorèse en gel 2D et la spectrométrie de masse, fournit une analyse globale de la

production protéique au cours du cycle cellulaire^(Grunenfelder et al., 2001). Les résultats obtenus, outre leur forte corrélation avec les résultats des microarrays décrits ci-dessous, ont établi le rôle de la protéolyse en qualité de mécanisme de contrôle du taux de protéines durant le déroulement et la transition des événements du cycle. Dans le second cas, l'utilisation de damiers à ADN ou microarrays a révélé qu'un ensemble de 553 gènes, c'est à dire plus de 15% du génome, sont transcriptionnellement régulés au cours du cycle cellulaire et cela avec une extraordinaire précision (Fig.8). Par exemple, la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme de l'ADN (synthèse de nouveaux nucléotides, méthylation,...) et la réplication de l'ADN, est induite et atteint un niveau maximal au moment de la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire ; alors que la transcription de gènes impliqués dans la ségrégation du chromosome est maximale en phase S tardive.

Ce mode de transcription « just-in-time » s'applique presque à tous les événements connus du cycle cellulaire. Le contrôle transcriptionnel précis peut contribuer à une utilisation plus efficace des ressources cellulaires et aide à garantir le timing correct des événements pendant le cycle cellulaire. L'aspect le mieux étudié du développement morphologique de *C. crescentus* fut le processus de la biogenèse flagellaire^(Gober and Marques, 1995), processus minutieusement contrôlé et dont chaque produit de gène est exprimé au moment opportun assurant une coordination entre la morphogénèse polaire et la division cellulaire. Les gènes requis pour l'assemblage du flagelle sont organisés en quatre classes (I-IV) chez *C. crescentus* sur base de leur profil d'expression. L'ordre d'expression de ces quatre classes de gènes est concomitant à l'ordre dans lequel les produits géniques requis pour l'assemblage d'un flagelle fonctionnel (Fig.8). CtrA est le seul gène de classe I identifié à ce jour. Une fois phosphorylé, il contrôle entre autre l'expression transcriptionnelle des gènes de classe II codant pour les composants flagellaires assemblés précoces. Leur assemblage correct en membrane interne est signalé à la cellule qui permet la transcription des gènes de classe III. Pareillement, l'assemblage convenable de ces composants protéiques dans le périplasme et en membrane externe renseigne la cellule qui déclenche l'expression de la classe IV constituée essentiellement des gènes encodant le filament flagellaire, à savoir les flagellines^(England and Gober, 2001). La co-linéarité étonnante de l'expression génique et l'assemblage d'organelle se produit également pour la biogenèse des pili.

Pour mettre en relation la coordination de la morphogénèse polaire et le cycle cellulaire, un crible de mutants thermosensibles (ts) affectés à température permissive dans l'expression de *fliQ* (gène flagellaire de classe II) et développant à température restrictive un phénotype létal a mis en évidence le régulateur de réponse CtrA^(Quon et al., 1996). Notons au passage qu'un crible identique a permis de pêcher l'histidine kinase CckA^(Skerker and Laub, 2004).

CtrA - Un régulateur de réponse global

Appartenant à la famille des systèmes à deux composants, il est composé d'un domaine amino-terminal aspartate receveur typique des RR appartenant aux systèmes à deux composants et d'un domaine de liaison à l'ADN du côté carboxy-terminal. La phosphorylation au niveau du résidu aspartate 51 (Asp51) situé sur le domaine receveur accroît l'affinité de liaison de CtrA sur ces séquences cibles. CtrA reconnaît un consensus correspondant à un motif 9-mère, 5'-GTAA-NNNNNN-TTAA (où N est un nucléotide quelconque), détecté dans les régions promotrices de nombreux gènes, qu'il régule positivement ou négativement^(Laub et al., 2002, Ouimet and Marczyński, 2000).

Le régulon CtrA

Deux fonctions particulières sont attribuées au régulateur de réponse CtrA. D'un côté CtrA, réprime l'initiation de la réplication de l'ADN dans la cellule nageuse. En se liant aux cinq sites de séquences caractéristiques présents au niveau de l'origine de réplication, CtrA provoque un encombrement stérique qui bloque la liaison de l'ADN polymérase et empêche le recrutement d'un facteur clé d'initiation de la réplication, DnaA^(Quon et al., 1998). De l'autre, il agit comme facteur de transcription, régulant directement l'expression de 95 gènes organisés en 55 opérons, soit positivement (66), soit négativement (29). Les fonctions des gènes régulés par CtrA, qui constituent le régulon CtrA, peuvent être divisées en trois classes principales. La première comprend les gènes requis pour la morphogenèse polaire. CtrA phosphorylé active la cascade de biogenèse flagellaire (*fla*) et la transcription du gène *pilA* qui code pour la sous-unité de la piline. La seconde englobe les gènes essentiels pour les processus du cycle cellulaire comme la division cellulaire (*ftsZ*), la méthylation de l'ADN (*ccrM*) et l'initiation de la réplication (*hemE* P_s). Enfin, la troisième renferme des gènes de régulation (Fig.9). Il est particulièrement intéressant de noter que deux membres du régulon CtrA, *divK* et *clpP*, interviennent dans la protéolyse de CtrA en tant que feedback négatif et que CtrA-P s'autorégule par un feedback positif^(Laub et al., 2002).

Donc, chez *C. crescentus*, CtrA joue comme un interrupteur moléculaire qui permet la coordination de la progression du cycle cellulaire et de la morphogenèse en contrôlant l'expression d'une centaine de gènes. En d'autres mots, CtrA n'exerce pas sa régulation à un stade unique du cycle cellulaire. CtrA est lui-même sujet à de multiples niveaux de régulation. Ces différents niveaux seront exposés dans le chapitre qui suit.

Régulation de l'activité de CtrA

L'activité de CtrA au cours du cycle cellulaire est contrôlée par au moins trois niveaux partiellement redondants : la transcription, la protéolyse et la phosphorylation (Fig.10).

Transcription de CtrA : l'expression du gène *ctrA* est sous le contrôle de deux promoteurs, P1 et P2, qui sont actifs à différents moments durant le stade prédivisionnel et sont directement régulés par CtrA lui-même. Le promoteur plus faible P1, régulé négativement par CtrA, est actif dans la cellule prédivisionnelle précoce alors que le promoteur plus fort P2, régulé positivement par CtrA, est activé plus tard pendant le stade prédivisionnel. Suite à l'absence de CtrA actif dans les cellules stalkées, due à la protéolyse et à la déphosphorylation (comme expliqué par la suite), il y a expression et synthèse du régulateur protéique GcrA. Celui-ci réprime l'expression de facteurs d'initiation de la réplication (DnaA) et active des gènes impliqués dans le métabolisme de l'ADN ainsi que l'expression de CtrA à partir du promoteur P1 dans la cellule prédivisionnelle précoce^(Stephens, 2004). L'accumulation de CtrA (et la phosphorylation consécutive de celui-ci) cause la répression du promoteur P1 et l'activation du promoteur P2 aboutissant à un niveau élevé de CtrA dans la cellule prédivisionnelle tardive. De manière concomitante à la répression de P1, CtrA phosphorylé s'autoamplifie par activation de P2^(Ausmees and Jacobs-Wagner, 2003, Domian et al., 1999).

Protéolyse de CtrA : elle est dépendante du protéasome procaryote ClpXP qui se compose de deux types de sous-unités X et P^(Jenal and Fuchs, 1998). La déplétion d'une des deux sous-unités mène à la stabilisation de CtrA, qui cause un défaut dans la transition G1-S, vraisemblablement parce que CtrA reste lié à l'origine de réplication. Le protéasome ClpXP typiquement reconnaît des résidus hydrophobiques à l'extrémité carboxy-terminale de ses protéines substrats. D'ailleurs la portion C-terminale de CtrA est nécessaire pour la protéolyse

mais semble ne pas être suffisante pour la déclencher. Il a été démontré que les 56 premiers résidus du domaine receveur en N-terminal en même temps que les 15 derniers résidus du domaine C-terminal contiennent l'information nécessaire pour la protéolyse régulée de CtrA^(Ryan et al., 2002). Un second régulateur de réponse, DivK, contribue également à la protéolyse de CtrA au pôle stalké^(Hung and Shapiro, 2002). Durant la transition cellulaire G1-S ainsi que dans le compartiment stalké de la cellule prédivisionnelle, CtrA est localisé au pôle stalké juste avant sa dégradation. Par ailleurs, les 56 premiers résidus sont nécessaires à sa localisation^(Ryan et al., 2004).

Phosphorylation de CtrA : CtrA devient compétent pour activer la transcription seulement après la phosphorylation de son résidu Asp51^(Reisenauer et al., 1999, Siam and Marczynski, 2000). Le niveau de phosphorylation change dynamiquement au cours du cycle cellulaire. CtrA est présent et phosphorylé dans la cellule nageuse. La concentration de CtrA-P disparaît intégralement durant la transition de la cellule nageuse vers la cellule stalkée (G1-S), pour permettre l'initiation de la réplication. Lorsque CtrA est synthétisé suite à son activation transcriptionnelle dans les cellules prédivisionnelles précoces, le niveau de CtrA-P augmente pour atteindre la concentration la plus haute dans les cellules prédivisionnelles. L'HK hybride CckA, l'HK DivL et le RR DivK jouent tous les trois sur l'état de phosphorylation de CtrA. Leur fonction respective est discutée dans le point suivant.

Trois voies de transduction du signal en amont de CtrA

La différenciation est contrôlée et coordonnée par de multiples voies de transduction du signal dont les médiateurs font partie de la famille des protéines à deux composants. Le génome de *C. crescentus* encode 61 protéines histidines kinases^(Nierman et al., 2001). Des analyses génétiques ont montré qu'au moins quatre d'entre elles initient les voies de transduction du signal régulant la progression du cycle cellulaire et la différenciation. On retrouve les histidines kinases « typiques » transmembranaires DivJ, PleC et DivL. La quatrième kinase impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, CckA, est une histidine kinase hybride qui possède un domaine régulateur de réponse à l'extrémité carboxy-terminale enté au domaine histidine receveur^(Ohta and Newton, 2003).

Étant donné son importance, le niveau cellulaire de CtrA-P doit être précisément contrôlé au cours du cycle cellulaire. Au moins trois voies de transduction du signal ont été proposées pour contrôler la phosphorylation de CtrA : la voie CckA, la voie DivL et la voie à multi composants PleC-DivJ-DivK.

La voie CckA

CckA est une histidine kinase hybride essentielle insérée en membrane interne grâce à deux segments transmembranaires du côté N-terminal. L'évidence que l'histidine kinase CckA joue un rôle central dans la régulation de l'activité de CtrA est basée sur plusieurs observations.

Le lien entre CtrA et CckA fut mis en évidence par l'utilisation de mutants ts *cckATS1*^(Jacobs et al., 2003). Ceux-ci présentent un phénotype pléiotropique incluant des défauts dans la biogenèse du flagelle et des pili, l'initiation de la réplication de l'ADN et la division cellulaire, caractéristiques par ailleurs d'un mutant *ctrA* avec perte de fonction^(Jacobs et al., 2003). De plus, une analyse de microarrays a démontré irrévocablement la correspondance

phénotypique entre mutants *ts cckATS1* et *ctrA* (*ctrAV148F*). L'expression des gènes identifiés comme cibles directes de CtrA^(Laub et al., 2002) change significativement dans un mutant *ctrAV148F* et l'expression d'approximativement 95% d'entre eux est fortement affecté dans un mutant *cckATS1*. Notons que cette correspondance n'est pas absolue, impliquant potentiellement la présence d'une fonction ne concernant pas CtrA. CckA, essentielle à la viabilité, est connue pour contribuer à la phosphorylation de CtrA. Celle-ci diminue dramatiquement dans les cellules *cckATS1*. La phosphorylation de CckA, et vraisemblablement son activité, coïncide temporellement à celle de CtrA au cours du cycle cellulaire. La concentration de CckA-P est en effet la plus élevée dans les cellules prédivisionnelles et la plus faible dans les cellules stalkées^(Jacobs et al., 2003). La concentration de CckA est constante au cours du cycle cellulaire, suggérant que des mécanismes utilisant une protéolyse et/ou une synthèse différentielle sont improbables. Certaines études suggèrent que CckA a un effet stabilisant sur CtrA en plus de son rôle de kinase. D'ailleurs, le temps de demi-vie de CtrA diminue de plus de 50% en absence de CckA^(Pierce et al., 2006).

Le mutant *ctrAD51E* où l'aspartate est remplacé par un glutamate, résidu à chaîne latérale plus longue, qui mime le phosphate et qui par conséquent rend CtrA constitutivement actif, supprime l'essentialité de CckA. L'essentialité de CckA passe donc par la phosphorylation de CtrA.

Selon le paradigme du système de transduction du signal à multi composants, l'architecture atypique de CckA présume un phospho-relais avec une histidine phosphotransférase non identifiée qui transférerait le phosphate de CckA vers CtrA^(Ausmees and Jacobs-Wagner, 2003). Celle-ci resterait donc encore à mettre en évidence.

DivL : Une kinase senseur avec une structure unique^(Wu et al., 1999)

DivL, autre kinase senseur, est lié génétiquement à CtrA. Primo, des souches portant des allèles conditionnels de *divL* présentent une filamentation extrême des cellules similaires à celle arborée par les souches *ctrA* *ts* à température restrictive. Secondo, un allèle conditionnel de *ctrA* (*sokA*) supprime le phénotype cryosensible (*cs*) de l'allèle *divL*, prétextant que les fonctions de DivL sont génétiquement en amont de CtrA. Ce qui est troublant, c'est que DivL possède un résidu tyrosine (Tyr550) autophosphorylable à la place d'un résidu histidine conventionnel. Ce résidu tyrosine est critique pour la fonction essentielle de DivL *in vivo* et pour la régulation du cycle de division cellulaire. D'autre part, DivL phosphoryle CtrA *in vitro* et interagit avec DivK dans un test double hybride en levure (2H), bien que le rôle de cette interaction ne soit pas encore connu. Il reste encore à voir si DivL et CckA ont une action convergente ou divergente sur CtrA ou si l'un ou l'autre est impliqué dans une étape différente de la voie menant à l'activation de CtrA^(Pierce et al., 2006). À ce jour, la nature essentielle de la tyrosine autophosphorylable et les liens génétiques unissant DivL au reste des acteurs sont des données minces pour une compréhension globale du pathway, certains pensant même que DivL pourrait être une phosphatase de CtrA ou d'un autre RR^(Pierce et al., 2006).

Le réseau PleC-DivJ-DivK

Cette troisième voie conduisant au contrôle de l'activité de CtrA est certainement la mieux caractérisée des trois. Elle met en jeu un régulateur de réponse essentiel composé uniquement d'un domaine aspartate receveur, DivK, et deux histidines kinases non essentielles, PleC et DivJ.

Un allèle conditionnel de *ctrA sokA* (suppressor of *divK*) supprime la létalité de la mutation *cs divK*, le phénotype de division cellulaire *cs* d'un mutant *divJ* et les phénotypes de

non motilité et manque de stalk d'un mutant *pleC*^(Sciochetti et al., 2002, Wu et al., 1998). Cette analyse de suppression par *sokA* établit un lien génétique entre ces différentes protéines de signal amont (DivK, DivJ et PleC) et CtrA^(Ausmees and Jacobs-Wagner, 2003). PleC, DivJ et DivK participent ensemble au contrôle de la morphogénèse polaire et de la division durant le cycle cellulaire.

Des études précédentes ont mis en évidence le rôle de PleC et DivJ sur DivK. D'une part, le niveau de DivK phosphorylé est réduit dans un mutant $\Delta divJ$, suggérant que DivJ agit comme une kinase de DivK. D'autre part, dans un mutant *pleC*, le niveau de DivK-P est plus élevé que pour le sauvage, suggérant que PleC promeut directement ou indirectement la déphosphorylation de DivK-P^(Wheeler and Shapiro, 1999). Des expériences de FRET (Fluorescence resonance energy transfer) ont prouvé les interactions physiques directes entre DivJ et DivK ainsi qu'entre PleC et DivK *in vivo*^(Matroule et al., 2004).

La fonction essentielle de DivK réside dans la régulation de CtrA car l'allèle *sokA* (suppressor of *divK*) supprime la létalité d'une mutation *cs* de *divK*. Deux modèles ont été proposés. Dans le premier, DivK contrôle le niveau de CtrA-P dans un phospho-relais avec une histidine phosphotransférase inconnue entre DivK et CtrA. Dans le second modèle, DivK est impliqué dans la protéolyse de CtrA durant la transition cellulaire G1-S^(Wu et al., 1998). Un crible double hybride en levure a démontré que DivK interagit avec deux autres kinases non caractérisées, CckN et CckO. De nombreux travaux restent encore à réaliser, pour d'une part étudier le lien DivK - CtrA et d'autre part caractériser les autres protéines du système à deux composants identifiées dans le génome de *C. crescentus*^(Ohta and Newton, 2003).

Les partenaires du mini-réseau PleC-DivJ-DivK

DivJ : histidine kinase de 597 résidus acides aminés avec une séquence N-terminale, contenant 5 segments transmembranaires prédits et un domaine catalytique C-terminal qui contient le site conservé de phosphorylation, His-338.

Fonction : Nécessaire à l'initiation de la division cellulaire, au placement et à l'élongation du stalk^(Lam et al., 2003, Ohta et al., 1992, Wheeler and Shapiro, 1999).

PleC : histidine kinase ancrée en membrane interne de 842 acides aminés avec 4 segments transmembranaires prédits et possède le site conservé de phosphorylation, His-610.

Fonction : Contrôle la différenciation du pôle flagellé en un pôle stalké, active la motilité et la chimotaxie une fois l'assemblage du flagelle dans la cellule prédivisionnelle achevé.

DivK : régulateur de réponse de 125 acides aminés avec un unique domaine receveur, est diffusible et essentiel pour la viabilité^(Hecht et al., 1995), qui contient le site conservé de phosphorylation, Asp-53^(Hecht et al., 1995).

Fonction : Signal de complétion de la cytokinèse.

Localisation au cours du cycle cellulaire

Une facette intéressante des réseaux de régulation de transduction du signal qui interconnectent la morphogénèse polaire et la progression du cycle cellulaire chez *C. crescentus*, réside dans le fait que la plupart des composants protéiques ont un pattern de localisation subcellulaire caractéristique. Cette localisation, associée étroitement à la différenciation, est souvent dynamique, alternant entre une distribution diffuse et une localisation concentrée à un pôle cellulaire.

Les voies CckA et DivL

CckA change sa localisation cellulaire au cours du cycle (Fig.11)^(Jacobs et al., 1999). Il est distribuée en membrane de manière diffuse dans les cellules nageuses et stalkées. La cellule prédivisionnelle précoce, après l'initiation de la réplication, acquiert le signal permettant la localisation de CckA au pôle opposé au stalk. Dans la cellule prédivisionnelle tardive et ultérieurement à la formation du flagelle, CckA localise concomitamment au pôle stalké et néoflagellé avec une concentration plus faible pour le pôle stalké^(Jacobs et al., 1999). La localisation polaire de CckA dans les cellules prédivisionnelles coïncide avec le pic de phosphorylation de CtrA. Il semble donc que sa localisation et sa distribution asymétrique aide à établir une importante différence dans le destin des cellules filles.

À ce jour, le cas de DivL est assez peu connu. Certaines études suggèrent que DivL se localise dynamiquement entre le pôle stalké et le pôle distal à celui-ci et moins fréquemment au pôle stalké pendant la phase S^(Matroule et al., 2004, Sciochetti et al., 2005).

Le réseau PleC-DivJ-DivK

Il a été démontré que DivK a un pattern de localisation dynamique au cours du cycle cellulaire. Il est dispersé dans le cytoplasme des cellules flagellées (Fig.12). Lorsque les cellules flagellées se différencient en cellules stalkées, DivK localise au pôle où se développe le stalk (pôle stalké). Ensuite, dans les cellules prédivisionnelles précoces, quelques protéines de DivK diffusent au pôle opposé au stalk (nouveau pôle flagellé) pour former un second centre de localisation. DivK reste localisé de manière bipolaire jusqu'à ce que la division cellulaire soit complète. À partir de ce moment, DivK est libéré du nouveau pôle flagellé alors qu'il reste ancré à la base du stalk. En conséquence, la division génère deux lignées cellulaires avec une distribution subcellulaire de DivK différente : une cellule flagellée avec DivK distribué de manière diffuse dans le cytoplasme et une cellule stalkée avec DivK localisé pôle stalké^(Jacobs et al., 2001). Des expériences de FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching) ont montré que la localisation polaire de DivK est dynamique. En effet, DivK fait la navette d'un pôle à l'autre de la cellule grâce aux activités de la phosphatase PleC et de la kinase DivJ localisées à des pôles opposés^(Matroule et al., 2004).

PleC et DivJ sont eux-mêmes localisés à un pôle cellulaire particulier à des stades spécifiques du cycle cellulaire. DivJ est principalement localisé à la base du stalk dans tous les types cellulaires stalkés. La localisation de PleC est dynamique durant le cycle cellulaire. Celui-ci est localisé au pôle flagellé des cellules nageuses. Au cours de la transition G1-S, PleC est relâché du pôle et redistribué à travers la membrane cytoplasmique et par la suite il localise au pôle opposé au stalk dans les cellules prédivisionnelles (Fig.13). DivJ et PleC sont impliqués dans la régulation de la localisation de DivK. DivJ est requis pour la localisation aux pôles ; dans un mutant nul de *divJ*, DivK est uniformément dispersé dans le cytoplasme dans tous les types cellulaires^(Jacobs et al., 2001). Par ailleurs, le résidu histidine phosphorylable His338 de DivJ, essentielle pour son activité, ne conditionne pas son processus de localisation. Ces résultats ont été mis en évidence suite à la substitution de l'histidine par une alanine (DivJ_{H338A})^(Lam et al., 2003). La délocalisation de DivK-P du nouveau pôle flagellé requiert l'activité de PleC. En effet, DivK est incapable de délocaliser de l'un ou l'autre pôle lors de la division cellulaire dans un mutant *pleC::Tn5* ou dans un mutant *pleC_{H610A}* caractérisé par le remplacement de l'histidine phosphorylable His610 par une alanine rendant PleC inactif. Ceci indique que PleC est impliqué dans la libération pôle spécifique de DivK lors de la cytokinèse^(Jacobs et al., 2001, Lam et al., 2003).

Le réseau PleC-DivJ-DivK se résume donc en un « ping-pong » protéique entre les deux pôles cellulaires (Fig.14)^(Matroule et al., 2004). Dans la cellule prédivisionnelle où le cytoplasme des deux futures cellules filles est non compartimenté, la phosphatase PleC promeut la libération de DivK du pôle flagellaire par déphosphorylation de DivK-P. La libération de DivK est immédiatement contrebalancée par l'activité kinase de DivJ qui par phosphorylation participe à la localisation de DivK-P au pôle flagellé. Parce que DivJ et PleC sont localisés à des pôles opposés, leur activité compensatoire sur la phosphorylation de DivK aboutit à la localisation dynamique de DivK avec un rapide échange de DivK et DivK-P entre les pôles au travers d'une diffusion rapide dans le cytoplasme. Aussi longtemps qu'il y a communication cytoplasmique entre le pôle flagellaire (PleC) et le pôle stalké (DivJ), l'accumulation de DivK-P au pôle flagellaire est maintenue et empêche la rotation du flagelle ainsi que la formation des pili. Une fois la cytokinèse complète, la ségrégation en deux cellules filles interrompt l'échange cytoplasmique entre les pôles. Dans les cellules flagellées, la libération de DivK du pôle flagellé, suite à l'activité phosphatase de PleC, n'est plus compensée par l'activité kinase de DivJ. Il en résulte une dispersion cytoplasmique complète de DivK du pôle flagellé qui permet la rotation du flagelle. Dans les cellules stalkées, faute de phosphatase, DivK-P s'accumule au pôle stalké, stimulant la protéolyse et la déphosphorylation de CtrA et donc la relance d'un cycle réplcatif chromosomique.

Facteurs de localisation : PodJ, TipN et TipF

Un facteur de localisation, PodJ, fournit l'information nécessaire pour la localisation polaire de PleC^(Viollier et al., 2002). En effet, dans les mutants *podJ*, PleC est distribué de manière diffuse sur la membrane cytoplasmique dans tous les types cellulaires. PodJ spécifie également la localisation de CpaC et CpaE, deux protéines ancrées en membrane, impliquées dans la biogenèse des pili^(Viollier et al., 2002). Le gène *podJ* code pour une protéine de 974 acides aminés avec un domaine N-terminal cytoplasmique riche en coiled-coils, un unique segment transmembranaire et une région C-terminale périplasmique, composée de trois tetratricopeptide repeat motifs (TRP) et de peptidoglycan-binding domains (PG). Les coiled-coils et les TRP sont des motifs connus pour être impliqués dans les interactions protéine-protéine^(Wolf et al., 1997). La protéine PodJ existe sous deux formes, une forme complète (PodJ_L) et une forme tronquée (PodJ_S). La transcription de *podJ* est régulée par les régulateurs principaux CtrA, GcrA et le facteur d'initiation de la réplication DnaA. Chaque forme localise à un pôle cellulaire mais à différents stades du cycle cellulaire où elles accomplissent différentes fonctions (Fig.15)^(Hinz et al., 2003, Lawler and Brun, 2006, Viollier et al., 2002). PodJ_L est synthétisé seulement dans les cellules prédivisionnelles où il se localise au pôle du flagelle naissant et recrute les facteurs nécessaires pour la biogenèse des pili, comportant la phosphatase PleC et les constituants de la machinerie d'assemblage des pili. En début de cytokinèse, le domaine périplasmique de PodJ_L est processé par une protéase périplasmique PerP, donnant lieu à la forme tronquée (PodJ_S) qui reste attachée à la membrane au niveau du pôle flagellé de la lignée des cellules nageuses^(Hinz et al., 2003, Viollier et al., 2002). PodJ_S est nécessaires pour la chimotaxie et la formation de l'extrémité collante du stalk ou holdfast, vraisemblablement parce que, par analogie avec PodJ_L, il recrute les facteurs polaires nécessaires au déroulement de ces processus^(Lawler and Brun, 2006, Viollier et al., 2002). PodJ_S est éliminé du pôle durant la transition G1→S par une métalloprotéase membranaire MmpA^(Chen et al., 2006). Ensuite PodJ_L est à nouveau synthétisé dans les cellules prédivisionnelles au nouveau pôle^(Viollier et al., 2002).

Pour revenir à ce qui a été dit auparavant, beaucoup de complexes protéiques procaryotiques sont à la base d'une asymétrie polaire. Chez *C. crescentus*, le flagelle est formé au pôle résultant d'une division cellulaire précédente. Cette spécificité de pôle n'est pas claire mais celle-ci pourrait impliquer une sorte de « cicatrice de naissance cytokinétique »

qui marque le nouveau pôle en tant que site d'assemblage du flagelle. De toute évidence, la formation de nouveaux pôles cellulaires implique un certain nombre de protéines qui sont jusqu'à présent peu connues. Récemment, deux protéines ont été identifiées et caractérisées, TipN et TipF, qui localisent au niveau du site de constriction des cellules en division et subséquemment au nouveau pôle après la séparation des cellules filles^(Huitema et al., 2006, Lam et al., 2006). Elles se définissent comme des marqueurs de nouveaux pôles. Dans les cellules prédivisionnelles, TipN localise au niveau du site de la cytokinèse alors que la machinerie de division cellulaire est en train d'être assemblée. Ensuite, la localisation de TipN est suivie par celle de TipF. Ils pourraient aider au recrutement de protéines additionnelles qui participent à la division cellulaire. Enfin, TipN, TipF et peut-être d'autres protéines restent au niveau du nouveau pôle formé (Fig.16). Elles lient la polarité à la division cellulaire et spécifient le futur site d'assemblage du flagelle. TipN contient deux régions transmembranaires probables et une région riche en coiled-coils, connus pour être impliqués dans des interactions protéine-protéine. En absence de TipN, les cellules assemblent un flagelle apparemment complet mais mal situé. TipF, quant à lui, requiert TipN pour sa localisation^(Lawler and Brun, 2006). TipN ne localise plus au niveau du site de division dans les cellules déplétées en FtsZ, protéine d'initiation de la division. En d'autres mots, la localisation de TipN est dépendante de la division cellulaire^(Huitema et al., 2006).

Certaines protéines du système à deux composants, évoquées précédemment, font parties d'un réseau complexe au cœur de la différenciation et du contrôle du cycle cellulaire chez *Caulobacter crescentus*. Plusieurs acteurs clés ont été identifiés et caractérisés. Néanmoins, certains composants de ce réseau sont encore inconnus. Une des facettes la plus stupéfiante de ce réseau de régulation est la localisation dépendante du cycle cellulaire de quelques-uns de ces composants. Il est aussi d'un grand intérêt que les composants du réseau de régulation chez *Caulobacter crescentus* sont conservés parmi d'autres α -protéobactéries, notamment les espèces bactériennes d'importance clinique ou agronomique. Les processus de contrôle du cycle cellulaire, bien que pauvrement compris, sont connus pour jouer un rôle important dans les mécanismes d'invasion et de colonisation de pathogènes et de symbiontes^(Barnett et al., 2001, Oke and Long, 1999, Robertson et al., 2000). Par conséquent, l'étude de la fonction et de la régulation des homologues présents dans ce réseau de régulation chez *C. crescentus* pourrait fournir une base pour la compréhension, non seulement pour l'importance biologique des pathogènes et des symbiontes, mais également des stratégies utilisées pour infecter et se répliquer à l'intérieure de leur hôte.

***Brucella* ssp. : Asymétrie (et différenciation)**

De récentes études ont montré que certains mécanismes décrits chez *Caulobacter crescentus*, sont évolutivement conservés parmi d'autres membres des α -protéobactéries.

Division asymétrique

La mise en évidence d'une division asymétrique chez *Brucella abortus* ainsi que chez d'autres α -protéobactéries telles que *Sinorhizobium meliloti* et *Agrobacterium tumefaciens* (Fig.17)^(Hallez et al., 2004), suggère que la division asymétrique est une caractéristique commune dans le groupe des α -protéobactéries. Cette asymétrie est caractérisée par une grande cellule annotée L et une cellule plus petite notée S. Pour l'instant, nous ne savons pas si ces deux cellules ont une fonction spécifique comme dans le cas de *C. crescentus*. En d'autres mots, on est en droit de se demander si cette asymétrie sous-tend une différenciation chez *Brucella* spp. Celle-ci est claire chez *Caulobacter* notamment, au point de vue morphologique, par la présence d'appendices polaires différents. Chez *Brucella* spp., il n'y a pas de stalk et la présence d'un flagelle reste controversée et difficilement observable. *Brucella* qui infecte les cellules eucaryotes n'a, à priori, pas besoin de se lancer à la recherche de nutriments puisqu'elle évolue, à certain moment, dans un milieu riche et un flagelle « permanent » ne lui servirait à rien. En outre, elle constitue une structure supplémentaire à exposer au système immunitaire de l'hôte. Il semblerait plus logique qu'il soit synthétisé à un certain stade du cycle infectieux. Certains mutants flagellaires sont atténués en souris 4 semaines après l'infection. Ceci indique que *Brucella* spp. requiert l'expression d'une structure flagellaire pour infecter de manière chronique en modèle murin^(Fretin et al., 2005).

Du fait de sa parenté phylogénétique étroite avec *Brucella* spp., confrontée à celle plus distante de *C. crescentus*, *S. meliloti* s'avère être un allié considérable en vue d'une meilleure appréhension du système chez *Brucella* spp.

Sinorhizobium meliloti: un tremplin pour *Brucella*

Sinorhizobium meliloti forme des nodules fixateurs d'azote sur les racines de certaines légumineuses du genre *Medicago*, *Melilotus* et *Trigonella*. Durant son développement en « bactéroïdes » fixateurs d'azotes, la réplication de l'ADN et la division cellulaire cessent et les cellules subissent de profonds changements métaboliques et morphologiques. Aucuns gènes de régulation contrôlant les stades précoces de ce processus n'avaient été identifiés. Des travaux récents ont isolé et caractérisé un homologue de *ctrA*, également essentiel pour la viabilité chez *S. meliloti*. La région promotrice a été identifiée et contient de multiples sites de liaison pour la protéine CtrA, suggérant que le gène peut être autorégulé comme c'est le cas pour *C. crescentus*^(Barnett et al., 2001).

S. meliloti a un homologue de DivK qui partage 74% d'identité pour la séquence protéique avec son homologue chez *C. crescentus*. Chez *S. meliloti*, la protéine DivK présente aussi une localisation dynamique dépendante du cycle cellulaire (Fig.18). La cellule fille qui hérite d'une localisation polaire de DivK est statistiquement plus longue que sa sœur où la localisation de DivK est non polaire. Ceci indique une division cellulaire asymétrique^(Lam et al., 2003).

Maintenant, il est temps de s'étendre sur l'analyse du réseau de régulation chez *Brucella* spp., de ses similitudes et de ses divergences d'avec le modèle de *C. crescentus*.

Plasticité du réseau de régulation

Similitudes et divergences

Des travaux antérieurs ont montré que la protéine CtrA de *Brucella abortus* est l'homologue fonctionnel de CtrA de *C. crescentus* et qu'il semble aussi essentiel^(Bellefontaine et al., 2002). Les *Brucella abortus* surexprimant CtrA peuvent présenter une morphologie branchée et/ou les cellules semblent plus grandes que les souches sauvages. Ces phénotypes sont compatibles avec le rôle de CtrA dans le contrôle de la division cellulaire chez *B. abortus*.

Chez *Brucella abortus*, la transcription de *ccrM*, codant pour rappel l'ADN méthyltransférase, serait également régulée par CtrA et le motif de reconnaissance de CtrA est conservé entre *C. crescentus* et *B. abortus*. Chez *Brucella* spp., des orthologues des quatre protéines signales (PleC, DivJ, DivL et CckA) ont été également identifiés par analyse génomique.

Des études, visant à caractériser le gène *ctrA* chez *Brucella abortus*, ont mis en lumière une régulation de processus similaires par CtrA à travers le contrôle de gènes cibles distincts. La division cellulaire s'accomplit suite à l'élaboration d'un septum de division et la séparation subséquente en deux cellules filles. Chez *C. crescentus*, FtsZ, un homologue structural de la tubuline est un acteur primordial de l'anneau de septation nommé aussi anneau Z. CtrA régule négativement le promoteur de *ftsZ*, et inhibe donc la formation de l'anneau Z. Les gènes homologues de *ftsZ* chez *Brucella* spp., ne semblent pas directement régulés par CtrA. Chez *Brucella abortus*, nous retrouvons un opéron (*minB*) composé des gènes *minC*, *minD* et *minE* absents du génome de *Caulobacter*. CtrA active transcriptionnellement le gène *minC* qui encode la protéine inhibitrice de FtsZ. L'action véritable de MinC, bien étudiée chez *E. coli*^(Margolin, 2000), dispose le septum au niveau du plan médian de la cellule par inhibition polaire systématique d'anneaux ectopiques, et ce grâce à un jeu de va-et-vient continu entre les deux pôles. Précisément, c'est l'absence de MinC sur le plan médian, parce que réquisitionné aux pôles, qui sollicite la localisation adéquate de FtsZ. La plasticité du réseau de régulation de CtrA est telle que la septation, chez ces deux genres d' α -protéobactéries, sont régulés à travers le contrôle de gènes cibles distincts. En résumé, CtrA chez, *C. crescentus* réprime la transcription de *ftsZ*, constituant primordial dans la formation de l'anneau de septation, alors que chez *B. abortus*, CtrA active la transcription de *minC*, dont le produit inhibe la formation de l'anneau.

PdhS : un nouveau protagoniste

Comme mentionné précédemment, *Brucella* spp. possède des orthologues de chacun des acteurs impliqués dans les trois voies de transduction du signal en amont de CtrA. Un nouvel acteur, présent aussi chez *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti* et *Agrobacterium tumefaciens*, vient s'ajouter dans le réseau. Ce gène essentiel de 1035 acides aminés est nommé *pdhS* pour « *pleC/divJ* homologous sensor ». C'est un paralogue de *pleC* et de *divJ* qui présente une forte similarité avec ces deux histidines kinases au niveau de leur domaine C-terminal. Ceux-ci sont composés d'une part d'un domaine ATPase capable de lier l'ATP et d'autre part d'un domaine porteur d'un résidu histidine phosphorylable.

Dans un test double hybride en levure, PdhS interagit non seulement avec DivK mais aussi avec lui-même (homooligomérisation). Bien que la fonction de cette interaction PdhS-DivK soit encore hypothétique, nous présumons que PdhS contrôle d'une manière ou d'une autre l'état de phosphorylation de DivK, que ce soit en tant que kinase ou en temps que

phosphatase. Notons qu'un test double hybride restreint aux acteurs du pathway amont a confirmé les interactions présumées entre DivK et ses histidines kinases potentielles (PleC, DivJ et PdhS) ainsi que l'interaction entre DivK et DivL sans mettre en lumière d'interactions supplémentaires entre les divers partenaires.

Par fusion de PdhS avec une molécule fluorescente (YFP par exemple), on a démontré que PdhS se localise à un pôle alors qu'il ne possède aucun segment transmembranaire (Fig.19). Il localise dans 90% des cas à ce qui semble être le vieux pôle de la grande cellule, ce qui s'apparenterait au modèle de DivJ chez *C. crescentus*. Chez *B. abortus*, PdhS pourrait donc nous servir comme marqueur d'un pôle spécifique à la manière de TipN chez *C. crescentus*. La délétion de la partie C-terminale (PdhS Δ C) n'altère pas sa localisation ; elle la renforce même. Actuellement, aucune donnée ne permet de déterminer la fonction de l'extrémité N-terminale dont aucun domaine de fonction connue n'a pu être mis en évidence lors de recherches de similarités dans les banques de données. Cette extrémité N-terminale de fonction inconnue est suffisante et nécessaire pour la localisation de PdhS. La surexpression de *pdhS* conduit à des altérations morphologiques qui rappellent celles observées pour le mutant de surexpression de *ctrA* (Fig.20)^(Hallez et al., 2004). Les hypothèses avancées concernant les raisons de telles altérations, mettent en question essentiellement un problème de division. Nous pouvons intégrer PdhS et DivK dans le réseau de régulation en amont de CtrA (Fig.21). Dans notre modèle, si nous surexprimons *divK*, il en résulte une déphosphorylation et une protéolyse abondantes et par conséquent l'absence de CtrA ainsi que son inactivation ne permettant plus l'activation du promoteur *PminC* et la synthèse de la protéine MinC. En son absence, l'anneau Z peut donc se former à chacun des trois sites de division potentiels localisés au milieu de la cellule et à chacun des pôles. Il en résulte alors la formation de cellules plus petites. Prenons maintenant le cas de la surexpression de *pdhS*. Dans l'optique où PdhS phosphoryle DivK et l'active, celui-ci déphosphoryle et protéolyse CtrA qui n'est plus capable d'activer le *PminC* et les conséquences sont identiques que pour la surexpression de DivK. Il faut tout de même ajouter un bémol car la présence de petites cellules n'est pas le seul phénotype associé à la surproduction de PdhS. Il doit donc agir d'une autre manière, qu'elle soit direct ou non, par l'intermédiaire d'une autre protéine, sur l'activité de CtrA.

Objectifs du mémoire

Suite aux différentes notions exposées précédemment, on est en droit de s'interroger sur la fonction spécifique ou non des cellules filles issues d'une division asymétrique. Ces fonctions spécifiques pourraient être, par exemple, leur capacité à accomplir une des étapes impliquées dans leur relation parasitaire avec leur hôte eucaryote. De plus, la plasticité du réseau de régulation, notamment par la présence de nouveaux acteurs ou de nouvelles cibles, pourrait intervenir dans le passage d'une vie libre à une vie parasitaire.

Dans l'optique d'enrichir les voies de régulation impliquant PdhS et DivK, nous espérons identifier de nouveaux partenaires physiques de ces deux protagonistes. Dans le cas de PdhS, nous tenterons d'approcher la fonction du domaine N-terminal en espérant, par exemple, identifier un localisateur qui le réquisitionnerait au pôle, étant donné que PdhS est ne possède pas de segments transmembranaires prédits. Toutes autres interactions pourraient aussi nous aider à clarifier la fonction de PdhS chez *B. abortus*. Dans le cas de DivK, nous cherchons à identifier une histidine phosphotransférase, par exemple, qui ferait le lien entre DivK et CtrA.

Pour concrétiser ces objectifs, nous avons, dans un premier temps, utilisé une technique de référence en ce qui concerne les interactions protéiques ; à savoir le double hybride en levure. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à surexprimer et à localiser les interactants potentiels de PdhS et de DivK chez *Brucella abortus*. Pour rappel, PdhS et DivK ont un pattern de localisation particulier et leur surexpression conduit à des altérations morphologiques. Ces deux expériences viseront à renforcer le lien entre les interactants potentiels et nos protéines d'intérêt.

Résultats et discussions

Résultats et discussion

Toutes les expériences réalisées dans le cadre de ce mémoire ont pour but une meilleure caractérisation du rôle de PdhS et de DivK dans le réseau de régulation impliqué dans l'asymétrie chez *Brucella* spp.

L'étude de ces deux protéines s'articule autour de deux grandes étapes :

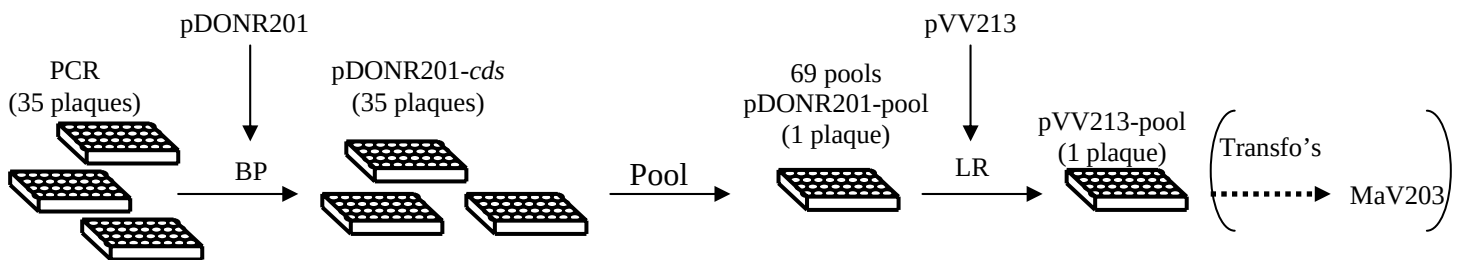
1. La première étape consistera, d'une part, en la recherche de partenaires physiques directes de PdhS ou DivK via un crible de double hybride en levure. Le crible s'effectuera contre l'ORFéome quasi complet de *Brucella melitensis*, soit environ 3100 ORF's sur les 3197 que totaliserait normalement l'ORFéome complet. D'autres part, nous chercherons à confirmer les interactions possibles des différents candidats et ce toujours par la méthode de double hybride. Cette confirmation s'effectuera, non plus en haut débit, mais chaque ORF isolée sera testée contre le gène d'intérêt.
2. La deuxième étape essayera, de mettre en évidence des similitudes ou des dissemblances entre certains phénotypes de PdhS / DivK d'une part, et leurs candidats interactants respectifs d'autre part dans la souche *Brucella abortus* 544. En parallèle, nous tenterons de surproduire et de localiser les différents candidats dans la souche *B. abortus* 544.

Première partie

Recherche d'interactants physiques de PdhS et DivK

La technique du double hybride en levure (2H) a été choisie afin de mettre en évidence des interactions protéiques faisant intervenir nos deux protéines d'intérêts, PdhS et DivK (voir Matériels et méthodes). L'avantage de ce système qui a prouvé son efficacité pour détecter de nouvelles interactions protéiques peut être facilement standardisé et automatisé.

La réalisation d'un test double hybride nécessite la construction d'un plasmide « appât » codant le produit de la fusion traductionnelle entre le domaine de liaison à l'ADN de Gal4p et l'ORF d'intérêt X (*pdhS* ou *divK*), ainsi que la construction d'un plasmide « proie » codant le domaine d'activation de Gal4p (AD) fusionnée lui-même à l'ORF d'intérêt Y (dans notre cas, l'ensemble des CDS prédites du génome de *Brucella melitensis*). Ces deux types de plasmides (pVV212-*pdhS/divK* et pVV213-*cds*) sont transformés dans deux souches de levures haploïdes de type conjugatif différent possédant trois gènes rapporteurs, cibles du BD, sous le contrôle de promoteurs distincts. Ces deux plasmides sont porteurs de marqueurs d'auxotrophie différents pour permettre la sélection des transformants sur un milieu sélectif et la sélection des conjuguants diploïdes est possible grâce à leur capacité à croître sur un milieu nécessitant l'expression des marqueurs d'auxotrophie des deux plasmides. Nous disposons d'une ressource de taille, à savoir l'ORFéome de *B. melitensis* à partir duquel les pVV213-*cds* ont été construits par la stratégie GatewayTM. (voir Matériels et méthodes pour les détails du système GatewayTM).



Dans un premier temps, les séquences codantes ou *cds* prédites à partir du génome de *B. melitensis* (soit 3197 *cds*) ont été amplifiées au moyen d'une paire d'amorces compatible en GWTM (*attB1/attB2*). Ces *cds* flanquées des sites de recombinaisons *attB1* et *attB2* sont réparties en 35 plaques PCR à raison d'un type PCR par puits. Celles-ci ont été triées par ordre croissant de taille d'abord pour le premier chromosome de manière à remplir les 20 premières plaques et ensuite pour le second chromosome de manière à remplir les 13 suivantes. Chez *B. melitensis*, certaines *cds* sont interrompues par un codon STOP qui pourrait altérer la fonction de la protéine. Toutes les *cds* correspondantes, exempt de codon STOP chez *B. suis* et *B. abortus* ont été amplifiées de la même manière et ont été déposées dans 64 puits de la plaque 34. Enfin, la 35^{ème} plaque est composée de 9 ORF's complémentaires codant pour des protéines du système à deux composants. Chaque puits contient en réalité un pool de PCR, c'est-à-dire un type d'amplicon mais pouvant comporter une ou plusieurs mutations.

Ensuite, une réaction BP a été réalisée, permettant la recombinaison entre les sites *attB* des produits PCR avec les sites *attP* du vecteur donneur pDONR201. Les produits de réaction ont été transformés dans *E. coli* (DH10B). Seules les bactéries contenant un vecteur recombinant seront capables de se multiplier. De plus, la kanamycine ajoutée au milieu permet la sélection des bactéries contenant un plasmide puisque le pDONR201 porte le gène de résistance à la kanamycine.

Les vecteurs d'entrée pDONR201 avec une *cds* insérée (3100 clones) sont récupérés par minipréparation d'ADN plasmidique. Par souci de facilité pour la réalisation du crible 2H, une partie a été groupée en pools. Chaque demi plaque (correspondant à 48 puits) a été poolée en un seul puits. Par exemple, 3 µl de chaque puits constituant la première moitié de la plaque Bm1 (pour *B. melitensis*) sont poolés dans le puits A01 de la plaque pDONR201-pool et 3 µl de chaque puits constituant la seconde moitié de la plaque Bm1 sont poolés dans le puits A02 de la plaque pDONR201-pool (voir figure ci-dessous). Et ainsi de suite jusqu'à la plaque Bm35.

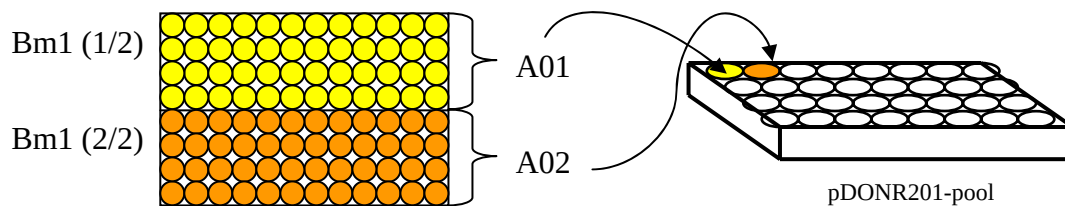


Figure 22. Schéma représentant la manière dont les plaques pDONR201-*cds* ont été poolées en une seule plaque pDONR201-pool.

Nous aurions pu pooler d'une autre manière, par exemple, en poolant les puits A01 des différentes plaques dans le puits A01 de la plaque pDONR201-pool. De cette manière, les puits contiendraient des vecteurs clonés avec des *cds* de taille assez différente. En poolant par demi plaque, nous gardons une certaine homogénéité de taille. Après transformation en *E. coli*, les bactéries qui ont un plasmide avec une petite *cds*, vu que le plasmide coûte moins d'énergie risquent de prendre le pas sur les bactéries qui ont un plasmide avec une *cds* plus grande. De plus, lors de minipréparation d'ADN plasmidique, on récupère moins bien les plasmides de grande taille.

Quatre puits supplémentaires contenant les pools où nous avons retiré les ORF's dont nous savons que les produits vont interagir avec PdhS et DivK (*divJ*, *pleC*, *pdhS*, *divK*, *divL* et *pleD*) sont rajoutés aux 69 pools. Nous disposons donc d'une plaque 96 puits pDONR201-pool (73 pools de 48 *cds* au total). Ensuite, une réaction LR a été réalisée pour chaque pool. Celle-ci a permis de cloner les différentes *cds* dans le vecteur de destination pVV213, afin d'obtenir un vecteur d'expression contenant l'insert, fusionné en 5' à la séquence codant le domaine de transactivation de Gal4p (AD). Le pool des produits de réaction obtenus sont alors transformés en DH10B électrocompétentes. L'antibiotique utilisé pour la sélection des bactéries transformantes est l'ampicilline, le vecteur pVV213 disposant du gène de résistance correspondant. Pour éviter de perdre des clones à cause du pooling, un minimum de 2000 colonies de transformants pour chaque pool de 48 clones a été obtenu. Les vecteurs d'expression sont récupérés par minipréparation d'ADN plasmidique. Sur cette plaque de pools pVV213-*cds*, a été ajouté 1 contrôle négatif (pVV213) et 2 contrôles positifs (pVV213-*divK* et pVV213-*pdhS*) Nous avons cloné les *cds* dans le pVV213 car nous limitons le nombre de faux positifs.

Nous avons utilisé l'ORFéome, déjà disponible, comme ressource pour notre crible 2H en levure. Toutefois, nous aurions pu utiliser d'autres ressources telles qu'une banque génomique. Dans un premier temps, le génome bactérien est fragmenté soit par l'utilisation d'enzymes de restriction ou soit par sonication. Ensuite, on récupère les fragments qui nous

intéressent. Par exemple, les fragments dont la taille est comprise entre 200 pb et 10 Kpb car des gènes supérieurs à cette taille sont rares chez *Brucella*. Les fragments sont ensuite clonés dans un vecteur de destination qui permet la fusion traductionnelle avec l'AD. La fragmentation aléatoire du génome comporte un inconvénient majeur. La cassure peut tomber non seulement en plein milieu d'une séquence codante et donner un segment protéique non fonctionnel mais en plus, le fragment cloné doit être en phase avec l'AD, sinon la protéine sera chimérique c'est-à-dire qu'elle n'existe pas *in vivo*. Il faut également que le gène soit cloné dans le bon sens. En outre, nous recherchons les petites protéines et si une cassure tombe en plein dans leur séquence codante, il y a de forte chance que les fragments obtenus soient non fonctionnels et que l'AD masque les petits fragments. Cela dit, l'utilisation de l'ORFéome comporte un inconvénient. Certaines *cds* qu'on amplifie peuvent être fausses et interagir de manière non pertinente. En fin de compte, dans le contexte d'un crible 2H en levure sans *a priori* dont l'objectif est de trouver de nouveaux interactants protéiques, l'utilisation d'un ORFéome s'imposait à nos yeux. Tout d'abord parce que nous cherchons des petites protéines hypothétiques qu'on risquait de perdre en utilisant une banque génomique et ensuite parce que la ressource était disponible au laboratoire.

Nous disposons au laboratoire des vecteurs d'expression pVV212-*pdhS* et pVV212-*divK* transformés dans la souche de levure MaV103 (MAT α). Ces vecteurs multicopies ont été construits par clonage GatewayTM. Il a été démontré que les produits des fusions BD-PdhS et BD-DivK ne sont pas des autoactivateurs c'est-à-dire, qu'ils ne sont pas capables d'activer la transcription des gènes rapporteurs indépendamment de toute interaction avec une seconde protéine de fusion. D'autre part, nous disposons des pools pVV213-*cds* transformés dans la souche de levure MaV203 (MAT α).

Test des interactions

Mise en évidence des interactions

Les gènes rapporteurs utilisés dans ce test double hybride sont tels que l'activation de leur transcription peut être détectée visuellement, soit par sélection, soit par test colorimétrique.

Nous avons tenu compte du phénotype relatif à trois gènes rapporteurs : *HIS3*, *URA3* et *lacZ* qui sont sous le contrôle de promoteurs distincts :

- *GAL1::HIS3* : 125 pb de *GAL1*_{UAS} ont été insérées dans le promoteur *HIS3* en amont du gène *HIS3*.
- *SPAL10::URA3* : promoteur *SPO13* avec 10 sites de liaison pour Gal4 fusionné au gène *URA3*.
- *GAL1::lacZ* : promoteur *GAL1* complet fusionné au gène *lacZ*.
- *HIS3* : le phénotype est déterminé par un test de croissance (sélection positive). *HIS3* code l'enzyme imidazole-glycerol-phosphate déshydratase requise pour la biosynthèse de l'histidine. La sélection s'opère donc sur un milieu déplété en histidine. Le 3AT, agissant comme inhibiteur compétitif de l'activité enzymatique, est ajouté au milieu. La biosynthèse de l'histidine résultant de la transcription basale du gène *HIS3* est ainsi inhibée, ce qui permet de réduire le bruit de fond. Seules les levures exprimant *HIS3* (donc contenant le facteur de transcription Gal4p reconstitué par l'interaction physique entre les deux protéines d'intérêt) sont capables de pousser sur un milieu sélectif (sans histidine et avec 3AT).

- *URA3* : le phénotype est déterminé par un test de croissance (sélection positive). *URA3* code pour l'orotidine-5'phosphate décarboxylase, une enzyme requise pour la biosynthèse de l'uracile. La sélection s'opère donc sur un milieu dépourvu d'uracile.
- *lacZ* : le phénotype est basé sur la détection colorimétrique (bleu-blanc) de la β -galactosidase (β -Gal) en réponse à l'activation du gène rapporteur *GAL1::lacZ*. La β -galactosidase, enzyme de dégradation du galactose, est également capable d'utiliser le X-Gal comme substrat. Lorsque celui-ci est clivé, un chromophore bleu est libéré. Autrement dit, les colonies qui deviennent bleues en présence de X-Gal expriment la β -galactosidase et contiendraient le facteur de transcription Gal4p reconstitué par l'interaction physique entre les deux protéines d'intérêt.

Mating (cfr figure 23)

Nous avons lancé en culture pendant 3h les souches nécessaires pour le mating dans un milieu synthétique sans leucine (SD-L) pour les MaV203 pVV213-pool et dans un milieu synthétique sans tryptophane (SD-W) pour les MaV103 pVV212-*pdhS*/-*divK* ou MaV103 pVV212. Le croisement nécessaire à l'obtention de diploïdes possédant les deux vecteurs d'intérêt se fait par « spotting » (dépôt de gouttes sur un milieu de croissance). Nous avons spotté 6 μ l des souches MaV203-pVV213-*cds* (80 spots) sur un milieu YPD. Une fois les gouttes sèches, nous spottons par-dessus 6 μ l des souches MaV103 pVV212-*pdhS*, MaV103 pVV212-*divK* ou MaV103 pVV212. Le lendemain, nous avons déposé, par réplique velours, les diploïdes sur un milieu SD-LW (pour sélectionner la présence des deux plasmides). Ce milieu sert de contrôle positif pour le mating. D'autre part, nous avons également répliqué les diploïdes sur un milieu déplété en leucine, en tryptophane, en histidine et contenant du 3AT (SD -LWH + 3AT 20mM). C'est à partir de cette étape, qui a pour but la mise en évidence d'interactants, que commence réellement le crible. Après 5 jours, les clones qui ont poussé sont repiqués à l'aide de cure-dents dans un milieu liquide SD-LWH. Après une nuit de croissance, 6 μ l de chacun des clones sont déposés sur quatre types de milieu : un milieu SD-LW (back up), un milieu YPD en vue du test β -galactosidase (cfr Matériels et méthodes) et sur un milieu SD-LWH + 3AT 20mM et un milieu synthétique déplété en leucine, en tryptophane et en uracile (SD-LWU) pour les tests de croissance.

Nous avons pris un seuil de sélection bas afin de diminuer la proportion de faux négatifs. Le critère retenu pour accepter une interaction est qu'au moins un des trois rapporteurs ait répondu positivement. Ensuite, pour les clones positifs, les séquences des fusions « AD-Y » sont amplifiées par PCR sur colonies avec les amorces iGal4 et Gal4-term. Les produits d'amplification sont ensuite déposés sur gel. Nous avons vérifié si la taille des fragments correspondait à la taille moyenne du pool de l'ORFéome en question. Ces produits PCR ont ensuite été séquencés avec l'amorce iGal4. Très peu de contaminations entre pools ont été observées.

L'identité des interactants potentiels est déterminée par comparaison des séquences avec la banque de données de *cds* de *Brucella melitensis* (http://serine.urbm.fundp.ac.be/~seqbruce/GENOMES/Brucella_melitensis/). Sur 88 clones positifs, nous avons réussi à en séquencer 60. En effet, certains clones se sont montrés récalcitrants, soit pour l'amplification PCR soit pour le séquençage. Parmi les 60 candidats, 47 correspondaient à une ORF décrites pour le génome de *B. melitensis* et les 13 autres ne correspondaient à aucune *cds* prédites. Nous disposions d'un contrôle positif pour chaque crible à savoir l'interaction PdhS-DivK qui fut mise en évidence par un test double hybride précédent. Nous avons bien retrouvé l'interaction avec DivK dans le crible de PdhS et celle avec PdhS dans le crible de DivK. En prime, indépendamment du contrôle positif pour DivK,

une interaction entre DivK et PdhS a été révélée dans le pool attendu, ce qui valide la fiabilité de la ressource.

Voici deux tableaux récapitulatifs reprenant les différentes ORFs dont la place dans l'ORFéome est mentionnée, l'indication d'une fonction connue ou non, leur localisation subcellulaire et la présence ou non de coiled-coils, motifs connus pour être impliqués dans des interactions protéiques.

Crible PdhS :

	ORF	Numéro de plaque dans l'ORFéome	Position sur plaque	Fonction connue ou non	Localisation subcellulaire	Coiled-coil
1	BMEI0139	Bm-13	G11	oui	C	
2	BMEI0422	Bm-05	B03	non	C	oui
3	BMEI0529	Bm-09	C07	oui	IM	
4	BMEI0566	Bm-09	G10	oui	P	
5	BMEI0735	Bm-02	B09	non	C	
6	BMEI0738	Bm-10	F02	non	C	
7	BMEI0753	Bm-34	G02	oui	C	
8	BMEI1271	Bm-03	D08	non	C	
9	BMEI1636	Bm-20	F05	oui	C	
10	BMEI1824	Bm-20	F10	oui	C	
11	BMEI1991	Bm-01	F12	non	C	
12	BMEI0025	Bm-34	F05	oui	P	
13	BMEI0026	Bm-34	E01	oui	C ou P	
14	BMEI0062	Bm-25	A01	oui	C	
15	BMEI0253	Bm-29	A09	oui	P	
16	BMEI0412	Bm-22	F05	non	C	
17	BMEI0659 (DivK)	Bm-34	H01	oui	C	
18	BMEI0765	Bm-23	F09	oui	IM	
19	BMEI0842	Bm-31	A05	non	IM	
20	BMEI1051	Bm-31	C12	oui	C	

Légende : C pour cytosolique, P pour périplasmique et IM pour ancrée en membrane plasmique. Le contrôle positif est encadré.

Crible DivK :

	ORF	Numéro de plaque dans l'ORFéome	Position sur plaque	Fonction connue ou pas	Localisation subcellulaire	Coiled-coil
1	BMEI0039	Bm-14	C09	oui	C	
2	BMEI0417 (PdhS)	Bm-21	D11	oui	C	oui
3	BMEI0587	Bm-13	E05	non	C	oui
4	BMEI0653	Bm-16	H03	oui	IM	oui
5	BMEI0757	Bm-10	C12	oui	C	
6	BMEI0847	Bm-06	C03	oui	IM	
7	BMEI1019	Bm-15	H11	oui	C	
8	BMEI1370	Bm-19	E11	non	C	
9	BMEI1457	Bm-06	F07	oui	C	
10	BMEI1486	Bm-19	G03	oui	C	
11	BMEI1565	Bm-11	D03	oui	IM	
12	BMEI0282	Bm-32	E03	oui	C	
13	BMEI0338	Bm-27	H09	oui	C ou P	
14	BMEI0423	Bm-30	B02	oui	C	
15	BMEI0821	Bm-26	E04	oui	IM	
16	BMEI0848	Bm-30	F03	oui	C	
17	BMEI0969	Bm-25	F02	oui	P	

18	BMEII1017	Bm-24	C08	oui	C
19	BMEII1022	Bm-27	G11	oui	C
20	BMEII1088	Bm-24	C04	oui	C ou P
21	BMEII1116	Bm-27	B03	oui	C

Légende : C pour cytosolique, P pour périplasmique et IM pour ancrée en membrane plasmique. Le contrôle positif est encadré.

Une première salve d'interactants a donc été mise en évidence grâce au crible double hybride. Il reste donc à confirmer ces interactions potentielles. Néanmoins, il est ressorti de notre crible des protéines dont les fonctions prédites sont assez hétérogènes. Nous retrouvons des protéines intervenant dans des voies métaboliques tel que des enzymes impliquées dans le cycle de Krebs, des protéines ribosomales, des protéines impliquées dans le transport de divers ions et plusieurs protéines hypothétiques. Il y a quelques protéines périplasmiques ou ancrées en membrane interne mais, la majorité des protéines identifiées seraient cytosoliques. Ce qui nous intéresse plus particulièrement dans ce qui est sélectionné, ce sont les protéines hypothétiques.

Remarquons également que, outre la BMEII0338 qui transactive à elle seule, le contrôle négatif et les contrôles positifs dont nous disposons (voir à la section Matériels et méthodes) ainsi que ceux représentés par l'interaction entre PdhS et DivK se sont révélés corrects.

Confirmation

Parmi tous ces candidats, il est vraisemblable que la majorité soit des faux positifs. Par exemple, étant donné le grand nombre de colonies testées, il est possible que certaines interactions proviennent du fait qu'une des deux fusions (probablement BD-X) soit mutée et que le domaine soit capable de recruter la machinerie de transcription. C'est pourquoi, nous avons effectué un second test 2H qui a pour but de confirmer ou d'infirmer les différentes interactions potentielles que nous avons obtenues.

La stratégie utilisée pour la confirmation est légèrement différente de celle utilisée pour le crible. L'avantage, contrairement au crible, est qu'il n'y a pas de sélection préalable évitant ainsi des mutations émergentes. Les interactions ne sont plus testées contre un pool mais contre chaque candidat isolé que l'on va rechercher dans l'ORFéome. L'emplacement dans la banque des *cds* candidates, que nous avons utilisées pour la confirmation, est mentionné dans le tableau récapitulatif précédent. À partir de chaque pDONR201-*cds*, une réaction LR a été réalisée, permettant la recombinaison entre les sites *attL* des vecteurs d'entrée d'intérêts avec les sites *attR* du vecteur de destination pVV213. Les produits de réaction obtenus ont été transformés dans une souche de bactéries DH10B sensibles à *ccdB*. De cette manière, seules les bactéries contenant un vecteur recombinant seront capables de se multiplier. De plus, l'ampicilline ajoutée au milieu permet la sélection des bactéries contenant un plasmide, puisque le pVV213 porte le gène de résistance à l'ampicilline. Les vecteurs d'expression récupérés par minipréparation d'ADN plasmidique ont tous été validés par restriction diagnostic par *HindIII* (données non montrées). Ceux-ci ont été transformés dans la souche de levure haploïde MaV203 et les transformants ont été sélectionnés sur un milieu sans SD-L. D'autre part, les souches MaV103 pVV212/-,-*pdhS*,/-*pdhSΔN*,/-*pdhSΔC* et /-*divK* ont été mises en culture dans un milieu liquide SD-W à partir d'un stock à -80°C.

Voici un tableau récapitulatif représentant les interactions confirmées en fonction des trois tests pour quatre appâts différents :

Appât	Proie	Test His	Test Ura	Test β -gal
PdhS	BMEI0422	+	-	+
	BMEI0738	+	-	+
	BMEII1051	+	+	+
	BMEII0026	+/-	-	+
PdhΔN	rien			
PdhΔC	BMEI0422	+	-	+
	BMEI0738	+	-	+
	BMEII1051	+	+	+
DivK	BMEI0587	-	+	+
	BMEII0282	+	+	-

La plupart des candidats ont été écartés lors de cette confirmation. Quatre interactions potentielles ont été confirmées pour PdhS et 2 pour DivK. Dans le lot de protéines qui semblent interagir avec PdhS, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la « BMEI0422 ». Ne possédant aucun segment transmembranaire, cette protéine cytosolique possède des domaines prédits coiled-coils connus pour être impliqués dans des interactions protéiques. Cette protéine de 131 aa est conservée chez toutes les α_2 -protéobactéries (*S. meliloti*, *Mesorhizobium loti*,...) et il n'a pas d'homologue chez *C. crescentus*. Ceci est intéressant puisque PdhS n'a pas d'homologue chez *C. crescentus*. De plus, sa séquence codante, située sur le grand chromosome, se trouve d'une part directement en amont et en sens opposé de la séquence codante *ctrA* (*bmei0423*) et d'autre part en aval de la séquence codante *pdhS* (*bmei0417*). La BMEI0422 nous a paru être un candidat particulièrement sérieux comme partenaire pour PdhS. Il est possible que *ctrA*, *pdhS* et *bmei0422* participent à un réseau conservé et systémique parmi les α -protéobactéries. De même, la BMEI0738 est une protéine candidate sérieuse car elle est conservée que chez les α_2 -protéobactéries. Nous avons laissé de côté la BMEII0026 à cause de sa localisation périplasmique.

Pour rappel, l'extrémité C-terminale de PdhS possède une région prédite en coiled-coils. Elle possède aussi deux domaines distincts ; un domaine ATPase et un domaine autokinase. L'extrémité N-terminale n'a pour l'instant aucune fonction prédite. La délétion de chacun des domaines a permis de mettre en évidence que l'extrémité N-terminale semble nécessaire et suffisante pour l'interaction avec tous les candidats confirmés à savoir la BMEI0422, la BMEI0738 encodant une protéine hypothétique conservée chez certaines α_2 et la BMEII1051 encodant une fumarate hydratase de classe II cytosolique impliquée dans le cycle de Krebs et qui catalyse l'hydratation (ajout d'une molécule d'eau) sur la liaison éthylénique du fumarate pour faire du L-malate.

En ce qui concerne les deux interactants potentiels de DivK confirmés, nous savons que la BMEI0587, protéine hypothétique, possède un domaine coiled-coil et des répétitions de motifs tetratricopeptidiques connus pour faciliter les interactions spécifiques entre partenaires protéiques. La BMEII0282 encoderait une aldéhyde déshydrogénase qui catalyse de manière générale la déshydrogénation des aldéhydes et est impliquée dans le métabolisme de certains acides gras et de certains acides aminés.

Discussion

Toute approche à haut-débit comporte son lot de faux positifs et de faux négatifs. On ne peut exclure la possibilité qu'une partie des candidats en test double hybride soient en réalité des faux-positifs. Trois cas de faux positifs sont à considérer. Les candidats positifs étant capables d'activer la transcription du gène rapporteur :

- soit indépendamment de toute interaction avec la seconde protéine de fusion (auto-activation). Néanmoins, ces faux positifs peuvent être discriminés par des tests d'auto-activation « simple-hybride ».
- soit par l'intermédiaire d'une protéine interne au système assurant la liaison des deux protéines de fusion.
- soit reflétant une interaction impossible *in vivo* (temporellement et/ou spatialement). De temps en temps, nous pêchons des interactions qui paraissent incohérentes ou improbables. Dans le contexte cellulaire, les protéines cytosoliques tels que PdhS et DivK n'ont sans doute pas de contact avec les protéines périplasmiques. D'un point de vue évolutif, le fait qu'elles n'aient jamais été en contact, aucune contre-sélection n'a eu lieu pour que ces protéines périplasmiques n'interagissent pas avec PdhS ou DivK. Ce sont en réalité des vrais positifs mais dont l'interaction n'a pas de sens *in vivo*. L'utilisation du pVV212/213 conduit à la surexpression des protéines dans la levure forçant probablement certaines interactions. Une solution serait d'utiliser des vecteurs centromériques présents à raison d'une seule copie par cellule.
- nous retrouvons des protéines dites « collantes » qui interagissent avec une grande fraction des protéines testées. Toutefois, la comparaison avec d'autres cribles permet d'identifier ces protéines collantes qui reviennent souvent.

Parmi les causes possibles d'un biais des résultats, nous évoquons également les faux négatifs, c'est-à-dire les protéines capables d'interagir *in vivo* mais non détectés en double hybride. Par exemple, le système d'identification de double hybride en levure utilisé est incapable de donner lieu à une interaction (pourtant bien réelle *in vivo*). Ceci peut être dû à la présence ou à l'absence d'un élément particulier, par exemple, un masquage d'un domaine d'interaction, un troisième partenaire ou une modification post-traductionnelle. Des caractéristiques intrinsèques à la protéine peuvent aussi être en cause. On peut considérer parmi ceux-ci les protéines qui interagissent réellement *in vivo* avec l'appât d'intérêt mais qui ne sont pas capables de se replier dans l'environnement dans lequel elles sont synthétisées (dans ce cas-ci la levure). Un Western blot permet de s'assurer que la protéine est stable et qu'elle n'est pas dégradée trop rapidement. Contrairement à certains faux positifs, les faux négatifs sont plus difficilement identifiables et leur nombre est inconnu.

Il faut rappeler que le système double hybride a fait ses preuves pour ouvrir des possibilités d'investigations ultérieures, en fournissant une première « liste » non exhaustive de candidats qui peuvent être testés par la suite dans des systèmes différents. Des recherches d'interactants plus poussées peuvent être réalisées pour détecter, éventuellement par d'autres méthodes, des partenaires qui étaient faux négatifs lors de l'analyse préliminaire. Il est donc vraisemblable que notre crible 2H ne permette pas de détecter toutes les protéines « interactantes » mais elle constitue une première approche pour déterminer une bonne partie d'entre elles.

Le test 2H n'est pas la seule technique utilisée pour mettre en évidence des interactions protéiques. Il existe des tests d'interactions *in vitro* tels que la coimmunoprécipitation, le pulldown assay ou encore les systèmes d'affinité en tandem (TAP, Calmodulin binding peptide - protein A et Glutathion-S-transferase (GST) - His tag). Ces différentes techniques ne nous renseignent pas sur la nature directe ou non des interactions.

Le FRET (fluorescence resonance energy transfer) permet, quant à lui, de prouver une interaction directe *in vivo*.

Deuxième partie

Caractéristiques phénotypiques

Suite au crible et à la confirmation, nous avons identifié plusieurs protéines qui semblent interagir avec nos protéines d'intérêt. Vu les données préliminaires à ce travail pour PdhS et DivK, deux types d'expériences nous ont semblé adéquates et simples pour renforcer l'hypothèse d'une interaction. Premièrement, des études précédentes ont révélé que la surexpression de PdhS et de DivK chez *B. abortus* donnait des phénotypes particuliers par rapport au phénotype de la souche sauvage. Deuxièmement, PdhS se localise à un des pôles dans 90% des cas et DivK se localise aux deux pôles cellulaires (peut-être en faisant la navette d'un pôle à l'autre). Dans un premier temps, nous tentions de mettre en évidence, pour la surexpression des candidats chez *Brucella abortus*, un phénotype particulier par rapport au phénotype sauvage. La comparaison des phénotypes observés avec celui des mutants de surexpression de *pdhS* et *divK* est en mesure de nous donner *in fine* une indication sur un lien génétique possible entre les différents candidats et l'une ou l'autre protéine d'intérêt. En effet, si deux protéines font partie d'une voie qui contrôle (indirectement) la morphologie et si la surproduction d'une protéine provoque des morphologies aberrantes, on peut, par exemple, s'attendre à ce que la surproduction de l'autre protéine provoque aussi des altérations morphologiques. Dans un deuxième temps, nous envisagions de localiser les divers candidats dans la souche *B. abortus* 544 et de confronter leur localisation au pattern de localisation de PdhS ou de DivK. Ces données permettront de consolider les résultats obtenus précédemment.

Mutants de surexpression

Construction des souches de surexpression

Les vecteurs d'entrée étant d'ores et déjà disponibles au laboratoire, il ne restait plus qu'à insérer les *cds* candidates dans un vecteur de destination adéquat. Dans ce but, une réaction LR du système de clonage Gateway™ a été réalisée. Celle-ci a permis d'insérer les 5 *cds* d'intérêt dans le vecteur de destination pBBR1MCS1GW, afin d'obtenir un vecteur d'expression contenant l'insert et permettant l'étude de la surexpression protéique. Ce vecteur d'expression est sous le contrôle du *Plac*, promoteur constitutivement actif chez *Brucella* spp. et a un nombre de copie par bactérie élevé (entre 10 et 15 copies). Les produits de réaction obtenus sont alors transformés en bactéries *ccdB* sensibles. L'antibiotique utilisé pour la sélection des bactéries transformantes est le chloramphénicol, le vecteur pBBR1MCS1GW disposant du gène de résistance correspondant. Les vecteurs d'expression sont récupérés par minipréparation d'ADN plasmidique et ont tous été validés par PCR et restriction diagnostic *EcoRV*.

La dernière action à effectuer avant la partie test proprement dite consiste en l'introduction des vecteurs recombinants dans la souche *B. abortus* 544. La technique choisie préférentiellement pour atteindre cet objectif consiste à faire conjuguer la souche receveuse, en l'occurrence *B. abortus* 544, avec une souche donneuse, en l'occurrence *E. coli* S17-1, préalablement transformée avec le plasmide d'intérêt.

Préparation et analyses des phénotypes associés à la surexpression des différents candidats

L'avant veille, nous avons ensemencé en cultures liquides les 8 souches de *B. abortus* 544, 5 d'entre elles possédant chacune une construction différente pBBR1MCS1-X ou X= - *bmei042*, *bmei0738*, *bmei1051*, *bmei0587* ou *bmei0282*, 2 possédant chacune les constructions qui serviront de contrôles positifs (pBBR1MCS1-*pdhS*/-*divK*) et la huitième possédant le pBBR1MCS1-GW qui nous servira de contrôle négatif. Tous les ensemencements ont été faits en triplicats. La veille, nous avons dilué les cultures de manière à ce qu'elles atteignent une DO⁶⁰⁰ de 0,5 le jour J, c'est-à-dire lorsque les bactéries sont en pleine phase exponentielle. Ensuite, après avoir préparé les agarose pad, nous déposons 1 µl de chaque culture sur l'agarose. Puis, nous recouvrons le tout d'une lame porte objet, découpons au moyen d'un scalpel l'agarose non couvert par celle-ci et scellons avec une solution de VALAP pour éviter tous risques de contamination et de propagation. Les échantillons sont alors prêts pour l'observation au microscope.

Contrôle négatif

Tout d'abord, nous nous sommes demandés si la présence du pBBR1MCS1-GW suffisait à provoquer un phénotype particulier. Si cela était le cas, l'analyse des mutants de surexpression serait remise en cause et ne permettrait aucune conclusion quant au lien possible entre les protéines candidates et nos deux protéines d'intérêts. Voici différentes micrographies obtenues en microscopie photonique (DIC) montrant les bactéries contenant le vecteur d'expression pBBR1MCS1-GW. L'analyse des micrographies nous permet de faire trois observations :

1. Comme dit précédemment, *Brucella abortus* 544 est un petit coccobacille de 1,2 µm de long et 0,8 de large. De plus, elle ne présente pas de phénotype anormal comparé à la souche sauvage.
2. Sur cette micrographie, nous observons évidemment des bactéries à différents stades du cycle cellulaire. Alors que certaines semblent être en phase d'accroissement cellulaire (flèche noire pleine), préparant ainsi leur division future, d'autres semblent terminer leur division et s'apprêtent à finir la cytokinèse (flèche noire en pointillée).
3. Nous devinons l'asymétrie de la division, toutefois discrète, en observant attentivement les bactéries indiquées soit par une flèche blanche pleine pour la grande cellule soit par une flèche blanche en pointillée pour la petite cellule.

Nous concluons donc que le vecteur d'expression dépourvu de *cds* ne perturbe pas la bactérie et que la souche *B. abortus* 544 contenant le pBBR1MCS1-GW représente notre contrôle négatif.

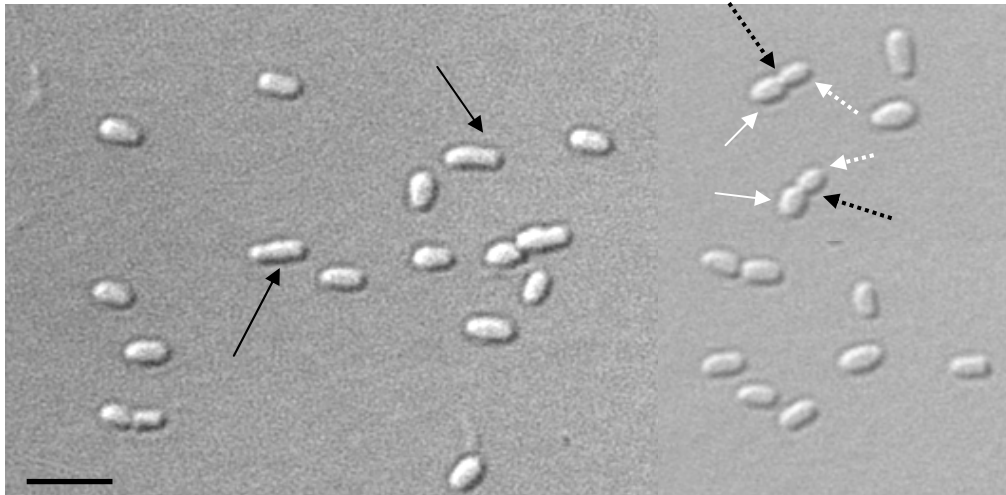


Figure 24. Micrographies obtenues en microscopie photonique de *B. abortus* 544 contenant le vecteur d'expression pBBR1MCS1-GW. Les barres d'échelle valent 2 μ m.

Ensuite, toutes les comparaisons de phénotypes se feront par rapport aux mutants de surexpression de PdhS (contrôle positif) qui exhibent des phénotypes particuliers par rapport au phénotype sauvage. Une observation minutieuse dévoile trois morphologies particulières. Pour commencer, certaines bactéries prennent l'aspect de triade en forme d'Y, indiquées par une flèche noire pointillée, résultant probablement d'une division anarchique ou d'un mauvais placement du pôle. Nous pouvons facilement imaginer qu'après une division banale de deux bactéries, celles-ci ne terminent pas l'étape de cytokinèse et une seconde division s'opère pour l'une d'elles lors de laquelle une cellule fille « bourgeonne » dans le plan de l'ancien septum. Une deuxième apparence radicalement aberrante présente de multiples ramifications, indiquée par une flèche blanche pleine. Potentiellement, elle représenterait une triade ayant subi maintes divisions. Pour finir, un certain nombre de bactéries se présente sous forme de « minicells-like », indiquées par une flèche noire pleine, probablement vides d'ADN chromosomique et résultant vraisemblablement d'une septation à proximité des pôles cellulaires. Néanmoins, il faut remarquer qu'une minorité de bactéries n'arborent pas l'un de ces trois phénotypes. À côté de cela, certaines bactéries présentent un phénotype similaire au phénotype sauvage. Ceci dit, elles ne représentent qu'une minorité parmi une majorité de « morphologies monstrueuses ».

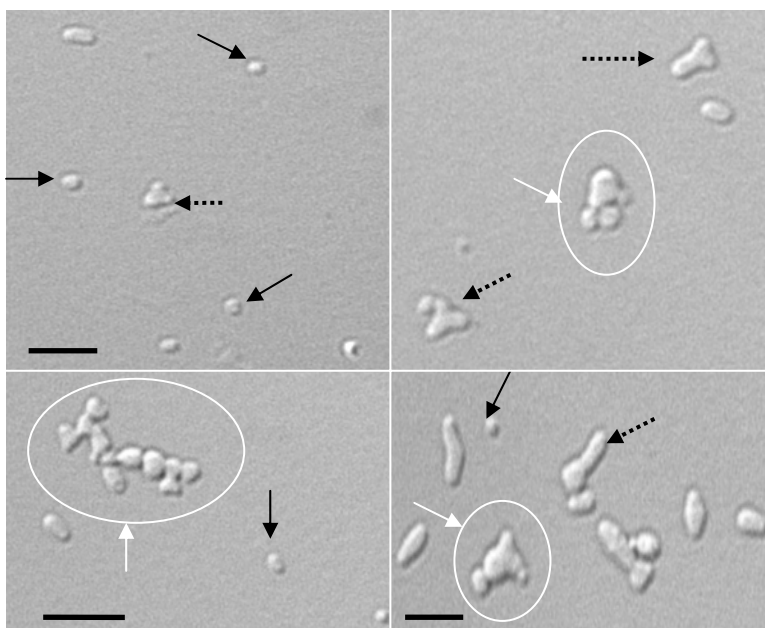


Figure 25. Micrographies obtenues en microscopie photonique représentant *B. abortus* 544 contenant le vecteur d'expression pBBR1MCS1-*pdhS*. Les barres d'échelle valent 2 μ m.

Test des interactants putatifs de PdhS

Nous pouvons commencer la caractérisation et la comparaison des mutants de surexpression des interactants putatifs de PdhS.

➤ Mutant de surexpression pBBR1MCS1-*bmei0738*

L'observation des micrographies a mis en évidence trois phénotypes :

1. Une mince proportion de minicells indiquées par une flèche noire pleine.
2. Un faible pourcentage de triades indiquées par une flèche noire pointillée.
3. Par contre, nous avons observé une quantité plus importante de bactéries à multiples ramifications. Celles-ci sont indiquées par une flèche pleine blanche.

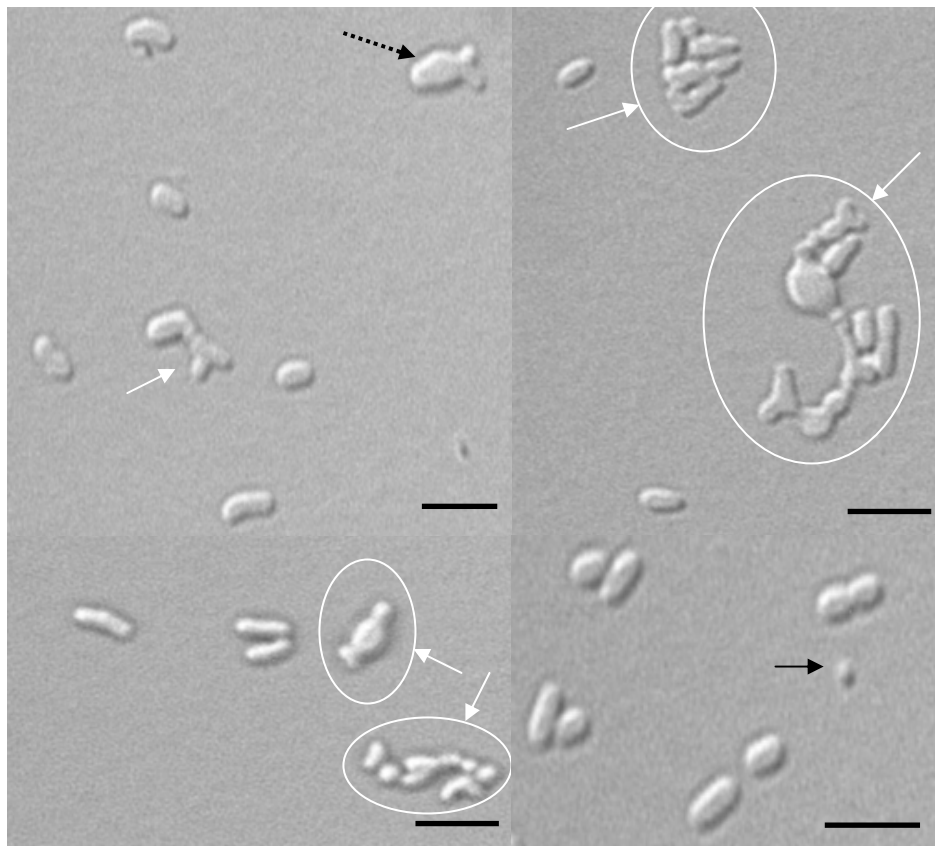


Figure 26. Micrographies obtenues en microscopie photonique représentant des bactéries contenant le vecteur d'expression pBBR1MCS1-*bmei0738*. Les barres d'échelle valent 2 μ m.

En bref, nous observons un phénotype moins marqué que celui du mutant de surexpression de PdhS.

➤ Mutant de surexpression pBBR1MCS1-*bmei0422*

En ce qui concerne le mutant *bmei0422*, son phénotype est beaucoup moins prononcé comparé à celui de *bmei0738*. Excepté une très légère tendance à former des minicells (flèche noire pleine) et des triades (flèche noire pointillée), ce mutant ne semble pas avoir de problème morphologique sérieux. Nous retrouvons bien deux phénotypes associés à la

surexpression de PdhS mais ces phénotypes ne représentent pas plus d'un quart de la population globale.

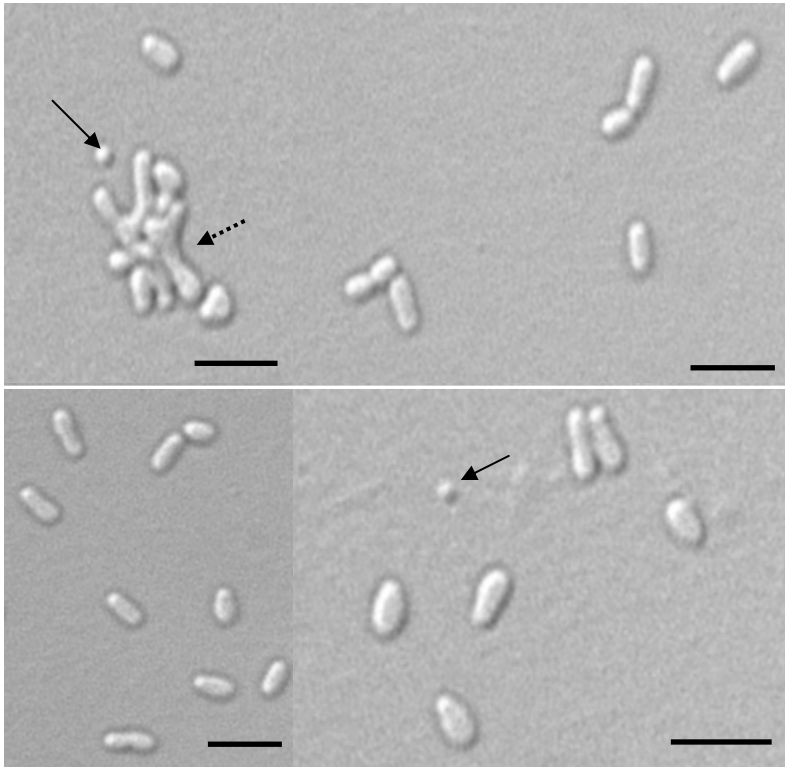


Figure 27. Micrographies obtenues en microscopie photonique DIC représentant *B. abortus* 544 contenant le vecteur d'expression pBBR1MCS1-*bmei0422*. Les barres d'échelle valent 2 μ m.

➤ **Mutant de surexpression pBBR1MCS1-*bmeii1051***

La surexpression de la protéine BMEII1051 n'induit que très légèrement un phénotype. De rares minicells-like (flèche noire pleine) et de rares triades (flèche noire pointillée) viennent s'ajouter à cette population dont le phénotype est quasiment identique au phénotype de la souche sauvage.

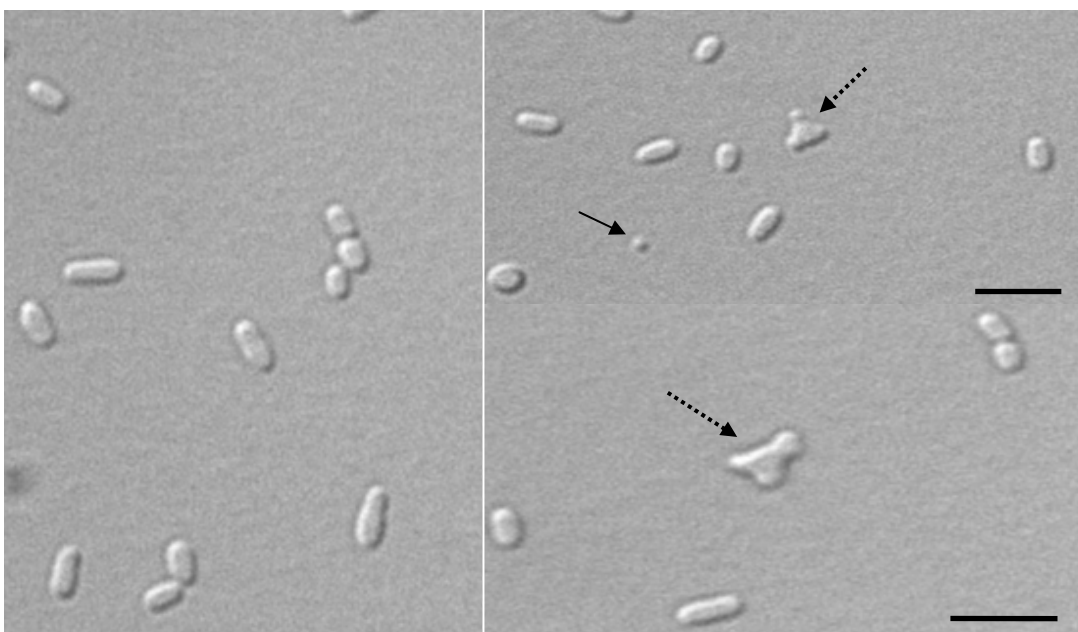


Figure 28. Micrographies obtenues en microscopie photonique représentant *B. abortus* 544 contenant le vecteur d'expression pBBR1MCS1-*bmeii1051*. Les barres d'échelles valent 2 μ m.

Test des interactants putatifs de DivK

➤ Mutant de surexpression pBBR1MCS1-*divK*

Les bactéries surexprimant *divK* semblent avoir une taille plus petite que celle des sauvages ou contenant pBBR1MCS1-GW. C'est le seul phénotype observable et constant. Nous n'écartons pas la présence de triades mais celles-ci sont présentes occasionnellement.

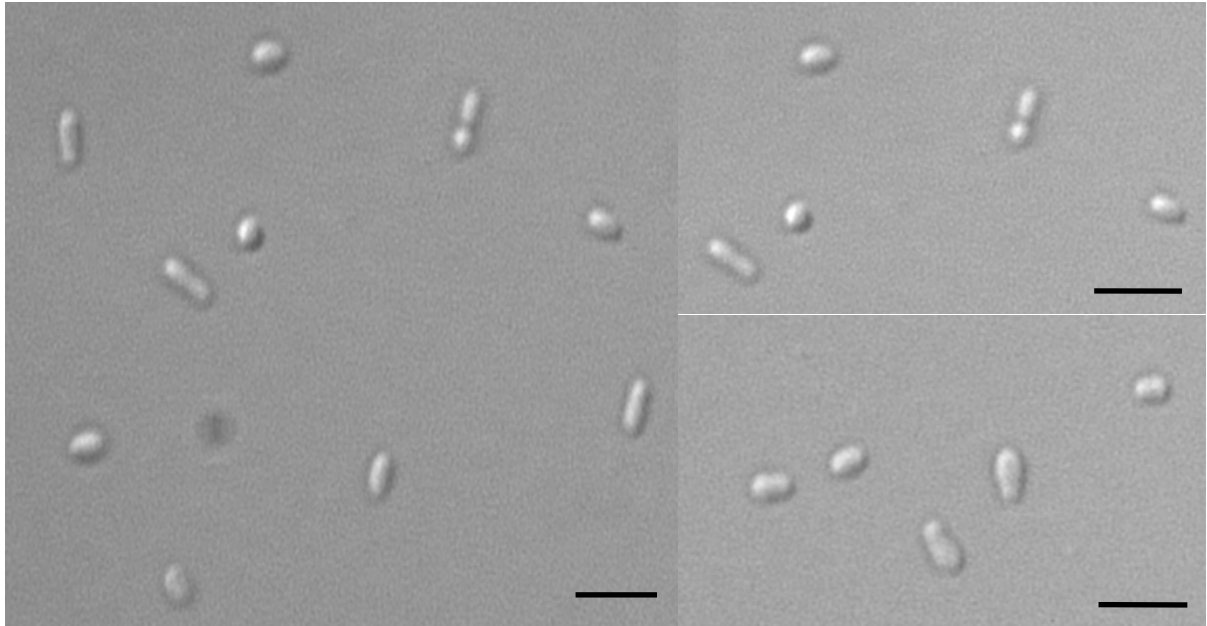
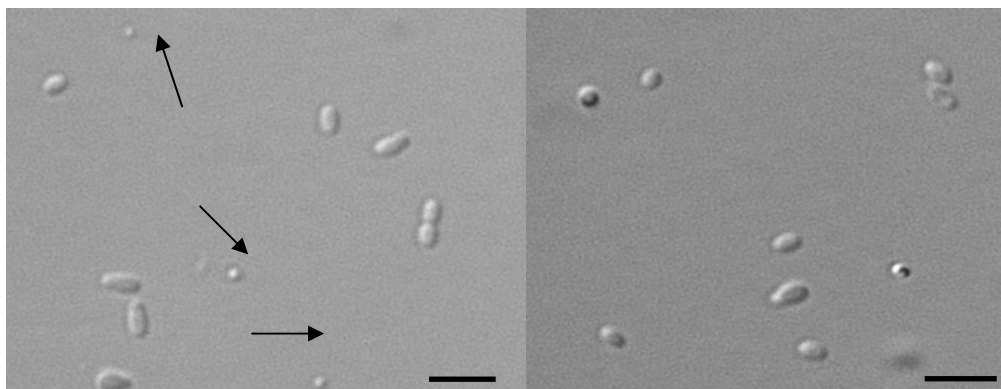


Figure 29. Micrographies obtenues en microscopie photonique représentant des bactéries contenant le vecteur d'expression pBBR1MCS1-*divK*. Les barres d'échelle valent toutes 2 μm .

➤ Mutant de surexpression pBBR1MCS1-*bmei0587*

Nous observons la même tendance que pour le mutant de surexpression de *divK*, c'est-à-dire une possible diminution de la taille des bactéries. Nous pouvons observer une proportion importante de minicells (flèche noire pleine). Ce mutant présenterait donc un phénotype similaire au mutant de surproduction de DivK.



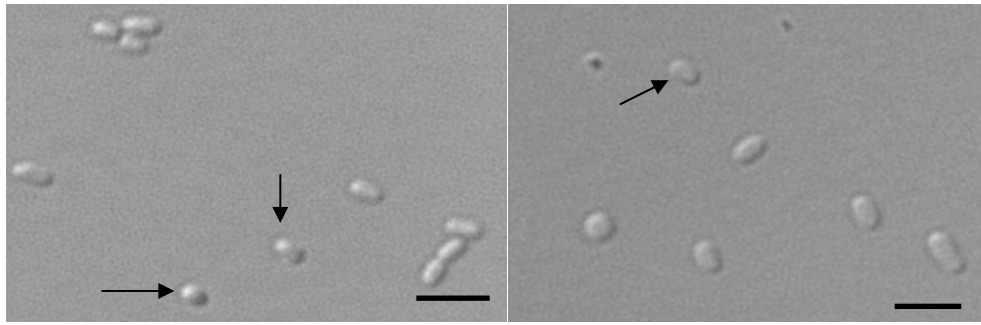


Figure 30. Micrographies obtenues en microscopie photonique représentant *B. abortus* 544 contenant le vecteur d'expression pBBR1MCS1-*bmei0587*. Les barres d'échelle

➤ **Mutant de surexpression pBBR1MCS1-*bmei0282***

La surexpression de la protéine candidate BMEI0282 ne semble pas avoir d'effet significatif sur la morphologie des bactéries.

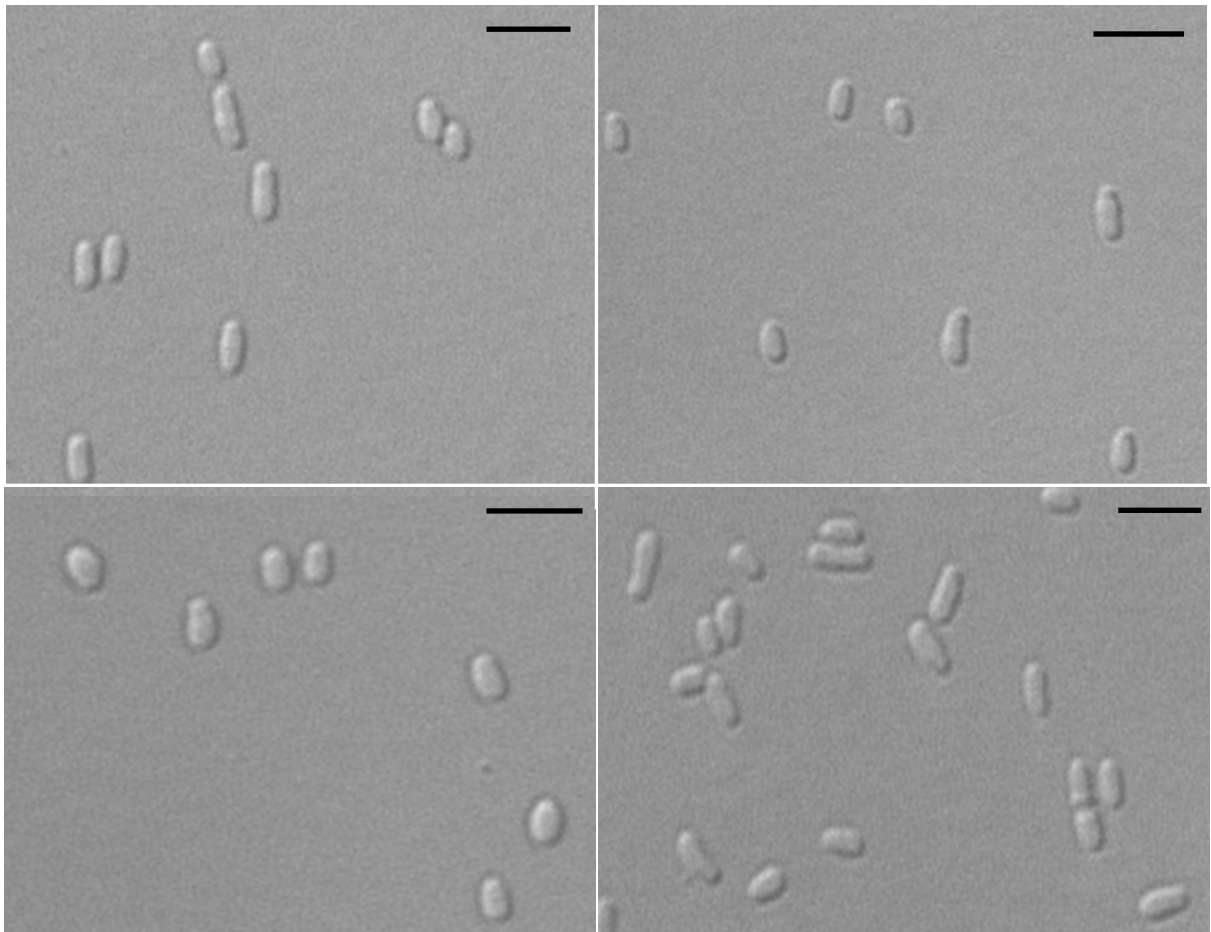


Figure 31. Micrographies obtenues en microscopie photonique de *B. abortus* 544 contenant le vecteur d'expression pBBR1MCS1-*bmei0282*. Les barres d'échelles valent 2 μ m.

Discussion

La surexpression de deux candidats potentiels de PdhS, BMEI0738 et BMEI0422, présente des aberrations morphologiques semblables à celles observées pour la surexpression de *pdhS*. Comme DivK, les bactéries surexprimant *bmei0587*, ont tendance à avoir une taille plus petite que celle de la souche sauvage. Nous n'avons pas mis en évidence de phénotype

pour la surepression de l'ORF BMEII1051, partenaire putatif de PdhS ainsi que pour BMEII0282, partenaire putatif de DivK. Nous pouvons facilement imaginer que si la surproduction protéique perturbe intensément la bactérie, nous allons avoir une sélection des bactéries qui ne surproduisent plus la protéine. L'hypothèse d'une « perte » de plasmide doit être écartée car nous avons utilisé une pression de sélection, le chloramphénicol, permettant de sélectionner les bactéries qui ont gardé le plasmide qui confère la résistance à cet antibiotique. Toutefois, il est possible qu'il n'y ait plus de surproduction protéique suite à une mutation dans le *Plac* qui le rend inactif. De même, l'apparition d'un codon STOP dans la séquence codante d'une protéine suite à une mutation pourrait produire une protéine plus petite et non fonctionnelle. Pour peu que la protéine complète soit toxique, les bactéries contenant le plasmide muté prendrons le pas sur celles qui surproduisent la protéine fonctionnelle. Une autre hypothèse qui expliquerait l'absence de phénotype serait que PdhS soit le facteur limitant de la phosphorylation de DivK. Dans le cas d'une surexpression de *divK*, pour une même quantité de protéine PdhS, la même quantité de protéine DivK serait phosphorylée alors que si on surexprime PdhS, la quantité de DivK phosphorylée serait plus élevée et cela expliquerait que la surproduction de PdhS provoque d'aussi lourdes aberrations phénotypiques. Il convient de signaler que toute la population de mutants de surexpression de *pdhS* n'a pas le même phénotype et il est possible que certaines bactéries aient plus de copies du plasmide par rapport à d'autres et les bactéries qui ont plus de plasmide sont vouées à mourir. Il est possible que la proportion de surproduction soit plus importante pour DivK et qu'il est normal que nous n'observions pas de phénotypes.

Nous pourrions faire une surexpression des candidats dans le mutant de surexpression de PdhS ou DivK et voir si le phénotype est identique ou même aggravé ou si le phénotype est restauré c'est-à-dire identique au phénotype sauvage. Ceci fournira *in fine* une information sur le rôle antagoniste ou non entre les protéines interactantes potentielles et nos deux protéines d'intérêt. Une autre expérience serait tout simplement de tenter de déléter les gènes codant pour les partenaires identifiés, afin d'examiner leur morphologie.

Ultérieurement, pour DivK et ses interactants, il serait intéressant d'utiliser la cytométrie de flux ; technique automatisée permettant de mesurer certaines caractéristiques physiques telles que la taille et la forme d'une particule en mouvement dans une suspension et passant devant un faisceau laser excitateur. Pour PdhS et ses interactants, un marquage membranaire avec un anticorps anti-LPS couplé à une molécule fluorescente sera nécessaire et une discrimination des cellules mortes par l'utilisation de fluorophores particuliers donnera une quantification de la proportion des cellules mortes par rapport aux cellules vivantes.

Localisation subcellulaire

Notre second test consiste en la localisation des candidats chez *B. abortus* et va tenter d'apporter une nouvelle information et de renforcer ainsi le lien éventuel existant entre PdhS ou DivK et leurs interactants respectifs. Cette expérience est en mesure de nous donner *in fine* une information sur la distribution cytoplasmique ou polaire d'une protéine grâce à l'ajout d'une étiquette protéique fluorescente. En observant la localisation d'une protéine hybride chez *Brucella abortus* 544 sauvage, il faut garder à l'esprit les interférences potentielles avec une copie sauvage de cette protéine toujours présente. En ce qui concerne les protéines périplasmiques ou ancrées en membrane plasmiques, nous n'avons pas tenté de les localiser parce que l'YFP (ou d'autres protéines fluorescentes d'ailleurs) est non fonctionnel dans le périplasme (milieu oxydant, présence de protéases, absence de chaperonnes...).

Construction des souches

La localisation subcellulaire nécessite l'élaboration d'un plasmide qui permettra de produire des protéines en fusion traductionnelle avec une étiquette fluorescente. L'approche utilisée pour la construction de ce plasmide est un clonage de type Gateway (GWTM). Comme mentionné précédemment, nous disposons déjà des vecteurs d'entrée clonés avec les séquences codantes d'intérêt. Une simple réaction LR a permis d'insérer les *cds* d'intérêt dans un vecteur de destination pMR10*cat-yfp*, afin d'obtenir un vecteur d'expression qui permet d'obtenir une fusion traductionnelle en C-terminale entre chaque protéine d'intérêt et la molécule fluorescente YFP (yellow fluorescent protein). Cette fusion est sous le contrôle du promoteur *Plac* (promoteur constitutif). Les produits de réaction sont ensuite transformés en *E. coli* DH10B et les transformants sont sélectionnés sur un milieu contenant du chloramphénicol. Les vecteurs d'expression sont récupérés par minipréparation d'ADN plasmidique. Une PCR et une restriction diagnostic (*HindIII*) ont permis de vérifier les différentes constructions plasmidiques. Afin d'introduire les plasmides pMR10*cat-cds-yfp* dans la souche *B. abortus* 544, des conjugaisons ont été réalisées avec des bactéries donneuses *E. coli* S17-1 préalablement transformées avec le plasmide d'intérêt.

Préparation et analyses de la localisation subcellulaire des différents candidats

La réalisation de cette expérience se déroule comme suit : l'avant veille, nous ensemençons en cultures liquides (2YT) sept souches de *B. abortus* 544, cinq possédant chacune une construction différente clonée avec la séquence *bmei0422*, *bmei0738*, *bmei1051*, *bmei0587* ou *bmei0282* et deux possédant le vecteur contenant la séquence de *pdhS* ou *divK* qui nous serviront de contrôle positif. Tous les ensemencements ont été faits en triplicats. La veille, nous contrôlons la DO⁶⁰⁰ de manière à ce que les différentes cultures atteignent une DO⁶⁰⁰ de 0,5 le jour J. Ensuite, après avoir préparé les agarose pad, nous déposons 1 µl de chaque culture sur l'agarose. Puis, nous recouvrons le tout d'une lame porte objet, découpons au moyen d'un scalpel l'agarose non couvert par celle-ci et scellons avec une solution de VALAP pour éviter tout risque de contamination et de propagation. Les échantillons sont enfin prêts pour l'observation au microscope.

Attardons-nous pour commencer sur le pattern de localisation de PdhS-YFP. Celui-ci constitue notre référence car, pour rappel, nous cherchons un partenaire qui pourrait se situer à un moment donné au même pôle que PdhS.

L'analyse des micrographies en épifluorescence nous apporte les observations suivantes :

- Les cellules ne présentent pas de morphologies particulières. Celles-ci n'ont pas l'air d'être perturbée par la présence du vecteur et ni par le fait que l'expression de *pdhS-yfp* soit découplée du promoteur natif.
- PdhS-YFP se localise effectivement dans +/- 90% des cas à un pôle et jamais aux deux pôles simultanément.
- Il semble se localiser au vieux pôle de la grande cellule. En effet, observons attentivement les cellules en cours de cytokinèse indiquées par une flèche noire pleine. Nous devinons d'une part une grande et une petite cellule et d'autre part, nous remarquons que PdhS-YFP localise à chaque fois au pôle de la grande cellule et au vieux pôle.

- Il n'y a pas de localisation dans les petites cellules nouvellement divisées. D'ailleurs, nous n'observons pas de localisation dans les petites cellules indiquées par une flèche noire pointillée. Selon notre hypothèse, il faut attendre un certain « temps de latence » avant que PdhS relocalise au vieux pôle. Tout ce passe comme si, PdhS localise au vieux pôle lorsque la petite cellule débute sa « différenciation » en grande cellule (indiquée par une flèche en pointillée blanche).
- En considérant que la grande cellule chez *B. abortus* est l'équivalent de la cellule stalkée chez *C. crescentus*, nous pouvons ainsi comparer le pattern de localisation de PdhS à celui de DivJ. DivJ se localise qu'au pôle stalkée des cellules stalkées et prédivisionnelles chez *C. crescentus* et PdhS localise qu'au vieux pôle de la grande cellule et des cellules prédivisionnelles chez *B. abortus*.

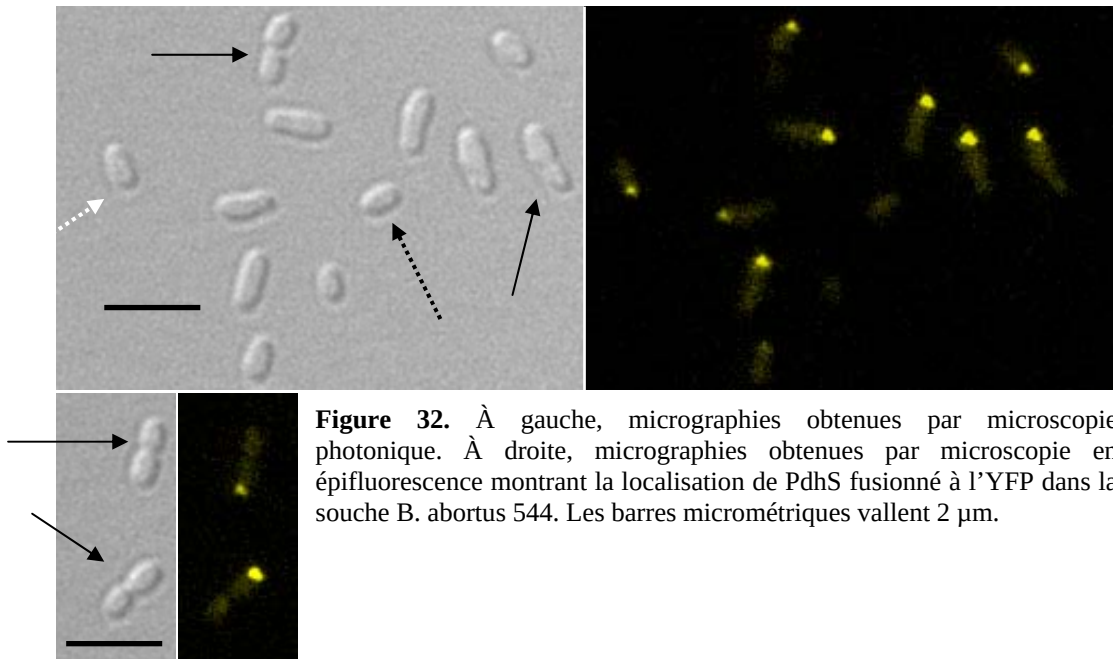


Figure 32. À gauche, micrographies obtenues par microscopie photonique. À droite, micrographies obtenues par microscopie en épifluorescence montrant la localisation de PdhS fusionné à l'YFP dans la souche *B. abortus* 544. Les barres micrométriques valent 2 μ m.

➤ Localisation subcellulaire de BMEI0422-YFP chez *B. abortus* 544.

Les cellules ne présentent pas de morphologie particulière (comparable à la morphologie des bactéries sauvages). L'analyse des micrographies nous a permis de faire l'observation suivante : la protéine de fusion BMEI0422-YFP, ayant un pattern de localisation diffus dans le cytoplasme dans tous les types cellulaires, ne présente pas le même pattern de localisation que PdhS-YFP

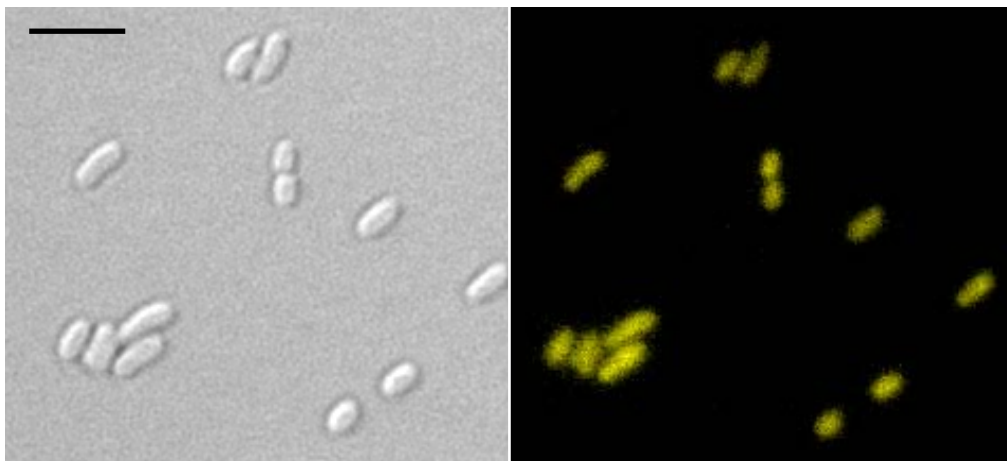


Figure 33. À gauche, micrographies obtenues par microscopie photonique. À droite, micrographies obtenues par microscopie en épifluorescence montrant la localisation de la BMEI0422 fusionnée à l'YFP dans la souche *B. abortus* 544. Toutes les barres d'échelles valent 2 μ m.

➤ **Localisation subcellulaire de BMEI0738-YFP chez *B. abortus* 544.**

L'analyse des micrographies a révélé plusieurs observations :

- Il n'y a pas de morphologie particulière.
- Nous n'observons pas de localisation claire comparée à celle de PdhS-YFP vu que nous avons un signal nettement plus faible comparé au signal observé pour la localisation de PdhS-YFP.
- Dans approximativement 10% des cas, la protéine BMEI0738 en fusion avec la molécule fluorescente YFP se localise à un des deux pôles. Elle ne localise jamais aux deux pôles simultanément. Cette localisation est à chaque fois indiquée par l'intermédiaire d'une flèche blanche pleine. Quand il y a localisation, elle semble localiser au vieux pôle.

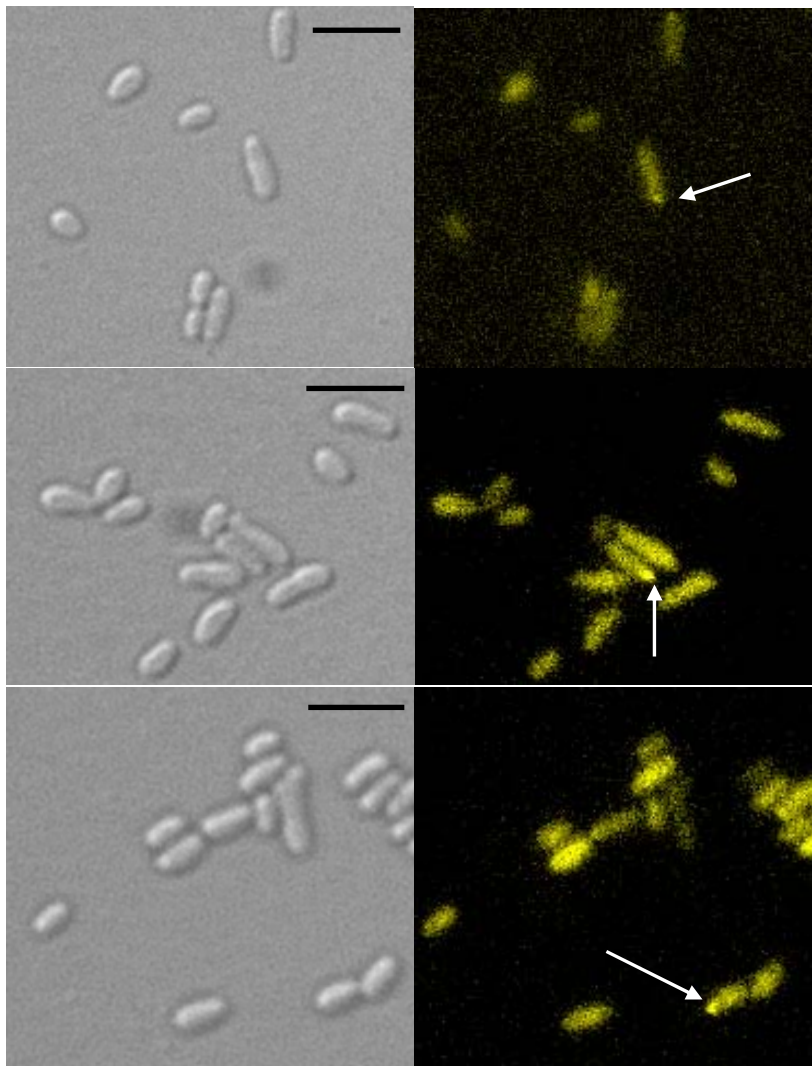


Figure 34. À gauche, micrographies obtenues par microscopie photonique. À droite, micrographies obtenues par microscopie en épifluorescence montrant la localisation de la BMEI0738 fusionnée à l'YFP dans la souche *B. abortus* 544. Toutes les barres d'échelles valent 2 µm.

➤ **Localisation subcellulaire de BMEII1051-YFP chez *B. abortus* 544.**

L'analyse des micrographies a révélé plusieurs observations :

- Les cellules ne présentent pas de morphologies particulières.
- La BMEII1051 en fusion avec la molécule fluorescente YFP se localise à un des pôles dans une majorité des cas, soit dans les cellules qui semblent être de type « petites

cellules » (flèche noire pleine), soit dans les cellules prédivisionnelles (flèche noire pointillée), soit dans les cellules qui semblent être en phase de croissance (flèche blanche).

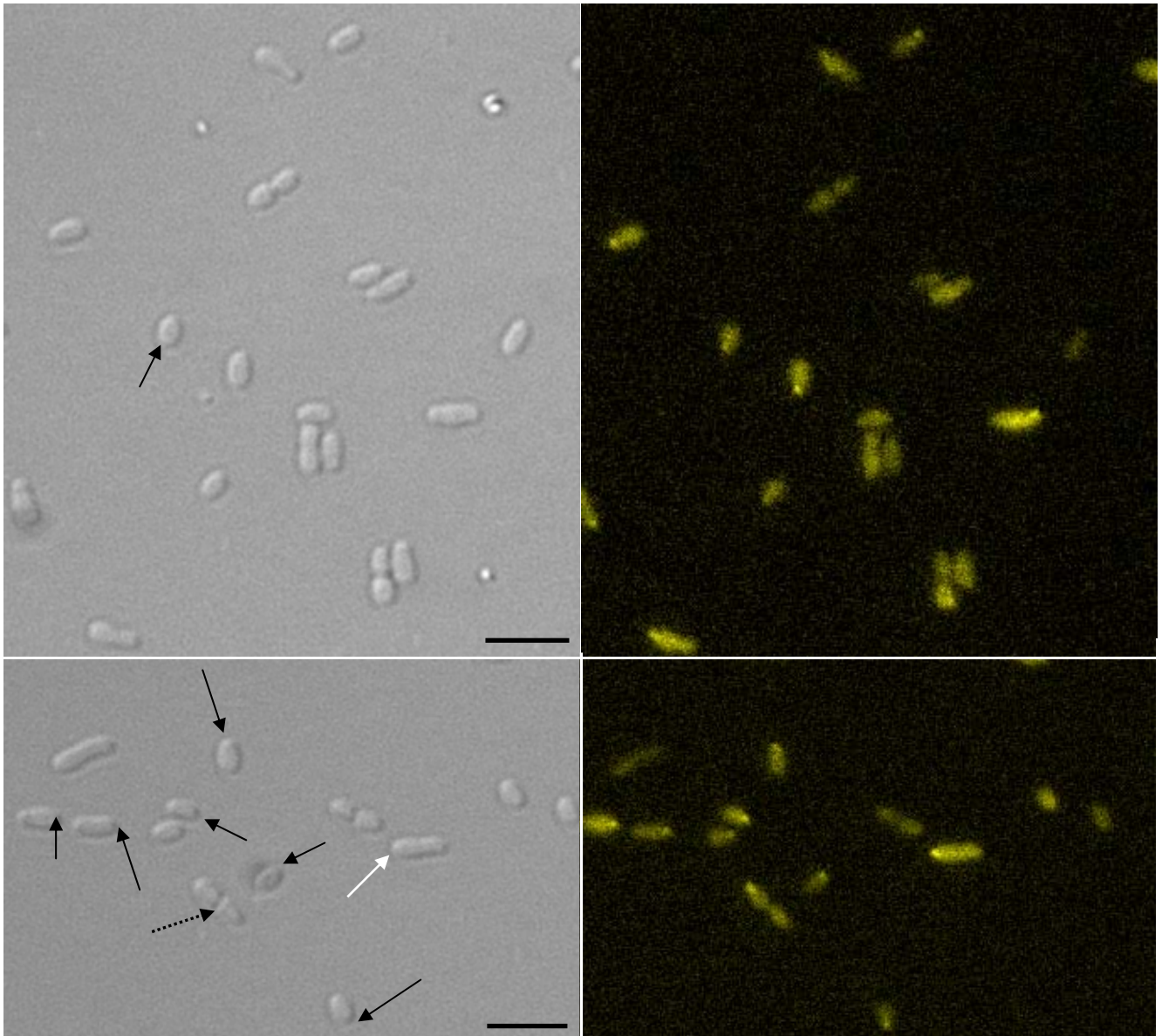


Figure 35. À gauche, micrographies obtenues par microscopie photonique. À droite, micrographies obtenues par microscopie en épifluorescence montrant la localisation de la BMEII1051 fusionnée à l'YFP dans la souche *B. abortus* 544. Les barres d'échelles valent 2 μ m.

Passons maintenant au pattern de localisation pour les deux interactants de DivK-YFP qui constitue notre référence.

➤ Localisation subcellulaire de DivK-YFP chez *B. abortus* 544.

L'analyse des micrographies a révélé plusieurs observations :

- Il n'y a pas de phénotype particulier.
- DivK-YFP localise dans une portion significative de la population à un pôle et jamais aux deux pôles simultanément et le reste, il est diffus dans le cytoplasme.

- Il semble se localiser à l'un des deux pôles dans les cellules qui s'accroissent (flèche blanche pleine) et semble avoir une distribution diffuse dans le cytoplasme des cellules prédivisionnelles (flèche blanche pointillée).

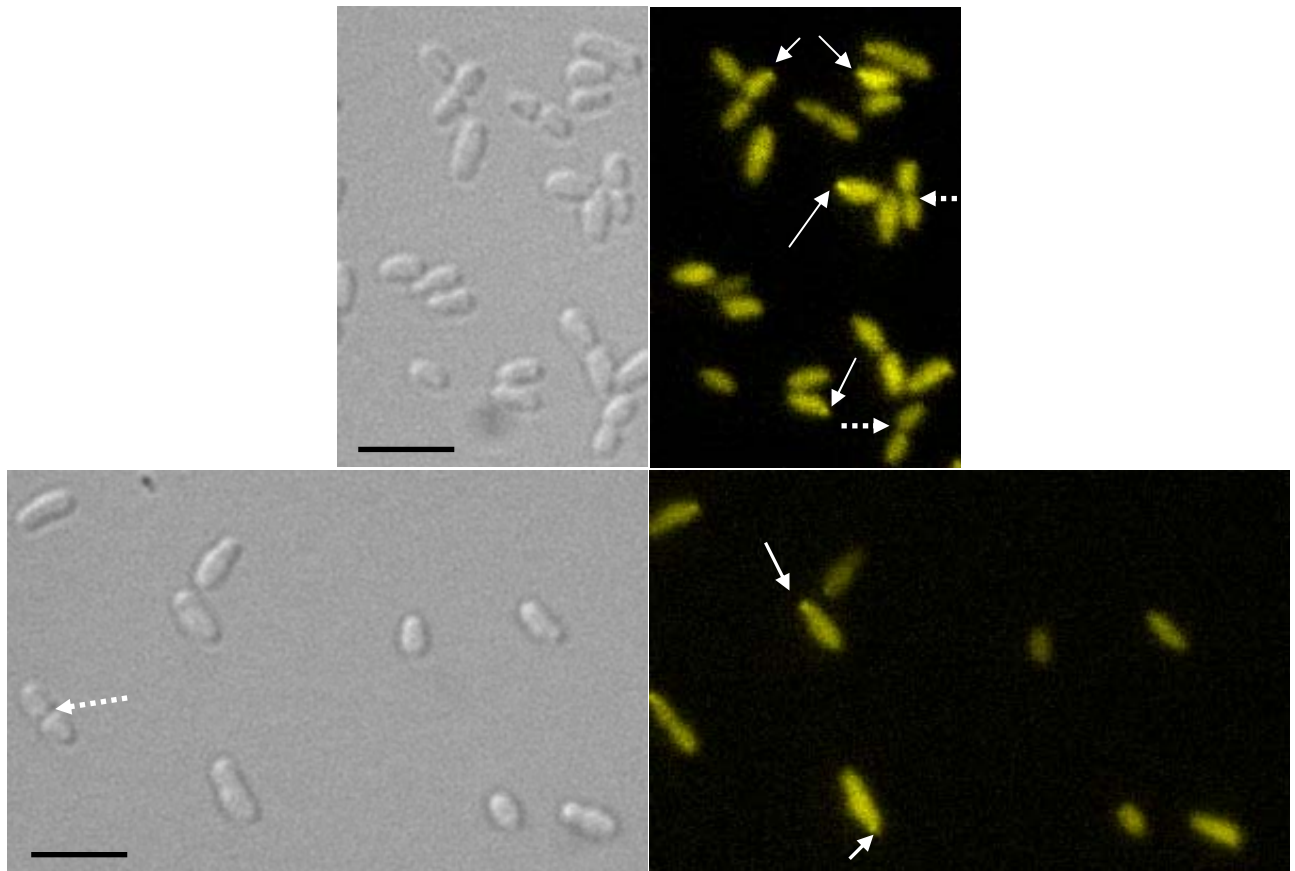


Figure 36. À gauche, micrographies obtenues par microscopie photonique. À droite, micrographies obtenues par microscopie en épifluorescence montrant la localisation de DivK fusionnée à l'YFP dans la souche *B. abortus* 544. Les barres d'échelles valent 2 μ m.

➤ Localisations subcellulaires de BMEI0587-YFP et de BMEII0282-YFP

Pour chaque expérience, les cellules ne présentent pas de phénotype particulier. L'analyse des micrographies (non montrées) nous a permis de faire l'observation suivante : la BMEI0587 et la BMEII0282 ont un pattern de localisation diffus dans le cytoplasme dans tous les types cellulaires.

Tableau récapitulatif représentant les résultats obtenus pour les deux expériences réalisées :

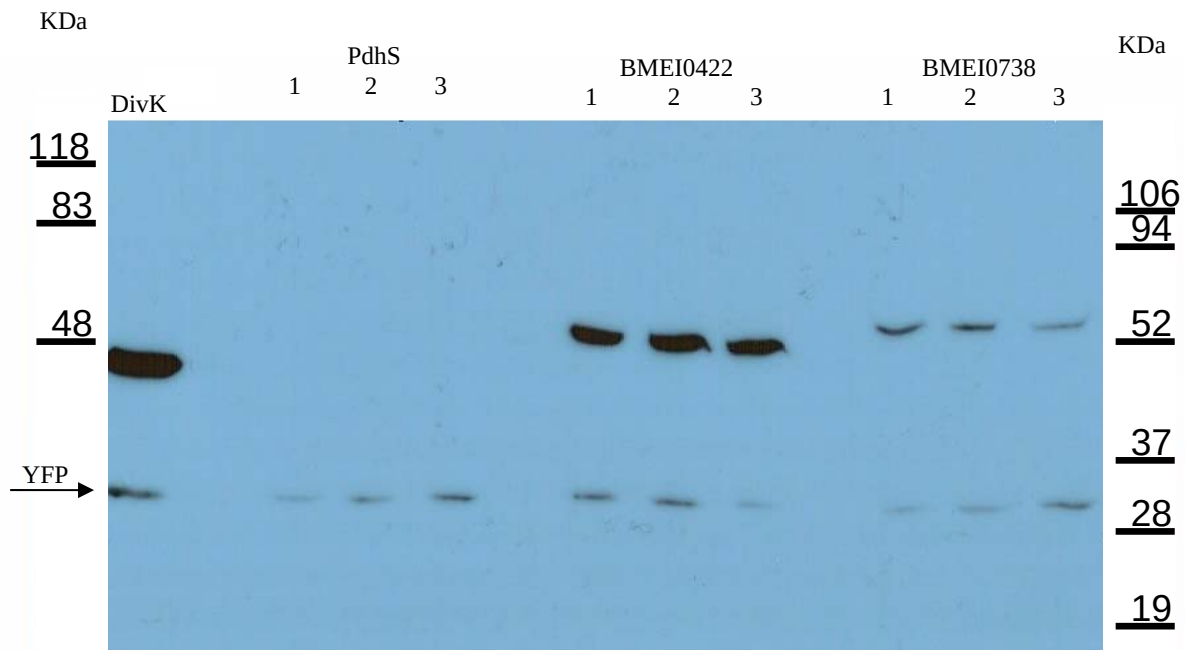
ORF	Mutants de surexpression pBBR1MCS1- <i>cds</i>	Localisations subcellulaires pMR10 <i>cat-cds-yfp</i>
Crible PdhS CTL- <i>pdhS</i> (CTL+) <i>bmei0738</i> <i>bmei0422</i> <i>bmeii1051</i>	MC(-), T(-) et M(-) MC(+), T(+) et M(+) MC(+/-), T(+/-) et M(+/-) MC(+/-), T(+/-) et M(-) MC(+/-), T(+/-) et M(-)	/ Polaire (CTL+) Polaire (parfois) Diffus dans le cytoplasme Polaire (majorité des cas)

Crible DivK	<i>divK</i> (CTL+) <i>bmei0587</i> <i>bmei0282</i>	Diminution de taille Diminution de taille Phénotype sauvage	Polaire (parfois) Diffus dans le cytoplasme Diffus dans le cytoplasme
Légende	MC pour minicell	T pour triade	M pour "monstre"

Comme nous n'observons pas de localisation pour certaines protéines candidates, nous nous sommes demandé si la fusion traductionnelle entre les protéines candidates et l'YFP était instable, et le cas échéant, si elle était dégradée ou protéolysée rendant impossible l'observation d'une localisation chez *B. abortus* 544. Nous avons réalisé un Western blot qui permettra *in fine* de s'assurer que les protéines de fusion sont stables chez *B. abortus* 544.

Pertinence des résultats

Pour le Western blot, nous utilisons les mêmes échantillons qui ont servi pour la microscopie en épifluorescence. La culture est inactivée pendant 1h dans un bain à 80°C. Après avoir centrifugé chacune des cultures, nous les avons resuspendues dans 5 ml de PBS1X afin de mesurer leur DO⁶⁰⁰. Ensuite, après une seconde centrifugation, nous avons de nouveau resuspendu les culots dans du PBS1X en s'arrangeant pour qu'ils soient à une DO⁶⁰⁰ de 6. Nous avons utilisé un anticorps primaire de souris anti-GFP qui reconnaît aussi l'YFP et un anticorps de chèvre anti-anticorps de souris conjugué à la peroxydase. La démarche suivie pour la réalisation du Western blot est expliquée dans le chapitre Matériels et méthodes. Après révélation, nous obtenons le film autoradiographique ci-dessous.



Analyse des résultats

Voici un tableau récapitulatif des profils attendus :

	DivK-YFP	PdhS-YFP	BMEI0422-YFP	BMEI0738-YFP	YFP
Poids moléculaires attendus	~43 KDa	~141 KDa	~44 KDa	~53 KDa	~27 KDa

Nous avons utilisé deux contrôles positifs : DivK-YFP et PdhS-YFP.

Par extrapolation et par comparaison avec les marqueurs de poids moléculaire, chaque bande se trouve à la taille attendue. Par conséquent, la stabilité des protéines de fusion BMEI0422-YFP et BMEI0738-YFP chez *B. abortus* 544 est confirmée.

Les bandes correspondant à PdhS-YFP sont indétectables. Néanmoins, sur le film photographique, nous commençons à percevoir un faible signal pour le troisième échantillon. En effet, les protéines à haut poids moléculaire ont plus de difficultés à être transférées sur la membrane de nitrocellulose et ce résultat n'est donc pas étonnant. Pour chaque échantillon, nous observons une bande à +/- 27 KDa correspondant à la YFP. Nous proposons deux hypothèses expliquant la présence de la YFP non fusionnée. Premièrement, la séquence encodant la YFP contient un codon ATG et la présence d'une séquence comparable à un RBS (ribosome binding site) en amont de l'ATG suffirait à activer la traduction de l'YFP seule indépendamment de la traduction de la protéine d'intérêt hybride. Deuxièmement, la fusion peut être instable et subir un clivage entre la protéine d'intérêt et l'YFP.

Par manque de temps, nous n'avons pas réalisé de Western blot pour les protéines de fusion BMEI0282, BMEI0587 et BMEI1051. Ce serait donc la première chose à faire.

Discussion

Nous observons une localisation polaire pour la BMEI0738 et la BMEI1051, deux partenaires putatifs de PdhS, ce qui renforce notre hypothèse de départ. Pour savoir si elle localise au vieux pôle de la future petite cellule ou à celui de la future grande cellule, une perspective à court terme serait de colocaliser la BMEI0738 et PdhS d'une part et la BMEI1051 et PdhS d'autre part, celui-ci étant un marqueur du vieux pôle de la grande cellule. Suite à la mise en évidence d'un pattern de localisation particulier et intéressant pour ces deux protéines, nous avons envisagé de colocaliser BMEI0738-EGFP et PdhS-YFP d'une part et BMEI1051-EGFP et PdhS d'autre part. Pour cela, nous avons cloné, suite à une réaction LR, les gènes *bmei0738* et *bmei1051* dans le vecteur de destination pSKoriT-GW-*egfp-Kan^R*. Les vecteurs d'expression ont été validés par restriction diagnostic (*Sac*I). Actuellement, nous ne disposons pas encore des données de colocalisation mais les travaux sont en cours.

Néanmoins, il s'agit d'être prudent, il est possible que la localisation polaire rapportée ici ne soit pas due à la propriété intrinsèque de la protéine. Une précipitation de la protéine chimérique est par exemple susceptible de se produire à l'intérieur de la bactérie dans la mesure où cette protéine est en surabondance. Généralement, elle survient aux deux pôles, mais il n'est théoriquement pas exclu que le précipitat aille se loger à l'un d'eux uniquement. Une solution pour repousser l'hypothèse d'une précipitation serait d'observer l'expression de la fusion *cds-yfp* dans un contexte chromosomique sous contrôle du promoteur natif, cas plus proche du contexte général du réseau bactérien. Si le pattern de localisation est identique pour les deux types de construction, alors l'hypothèse d'une localisation polaire sera renforcée. Signalons au passage que la séquence codante *bmei0738* a été clonée dans le vecteur de destination pKSoriT-GW-*yfp-Kan^R*. Le vecteur d'expression a été validé par restriction diagnostic (*Pvu*II). La propriété non répliquative de ce plasmide implique son intégration au locus d'intérêt pour qu'il puisse se maintenir dans la population, avec comme résultante le gène *bmei0738* fusionné à l'*yfp* sous le contrôle de son promoteur natif ainsi que la copie sauvage de *bmei0738* sans promoteur, le tout dans un contexte chromosomique.

Nous pourrions également tenter de localiser les protéines candidates par immunofluorescence, technique permettant de visualiser la position intracellulaire d'une protéine sur des cellules fixées en utilisant un anticorps qui reconnaît directement notre protéine ou une fusion avec un tag. Ce tag de quelques acides aminés est sensé poser moins de

problèmes structuraux ou fonctionnels à la protéine que l'YFP. La liaison spécifique d'un anticorps « anti-tag » peut être visualisée en microscopie à fluorescence si l'anticorps est couplé à une molécule fluorescente. Puisque les bactéries sont fixées au support solide, il est possible de prendre un instantané de la position des protéines dans la bactérie. Le problème majeur rencontré avec l'immunofluorescence, c'est que les protéines cytoplasmiques associées de manière transitoire à la membrane peuvent perdre leur localisation subcellulaire, vraisemblablement à cause de la fixation. Remarquons que ce problème de précipitation pourrait être définitivement résolu par l'utilisation de la technique du time-lapse. Cette technique vise à suivre pas à pas en temps réel une cellule ou un groupe de cellules vivantes. Le précipitat est incapable de se mouvoir d'un pôle à l'autre ou de disparaître une fois formé et donc en time-lapse, nous pourrions facilement discriminer entre une localisation dynamique d'une protéine et un précipitat.

Nous n'observons pas de localisation pour la BMEI0422, partenaire putatif de PdhS ainsi que pour la BMEI0587 et la BMEI0282, partenaires putatifs de DivK. Encore une fois, il est possible que l'absence de localisation ne reflète pas la réalité mais un artefact expérimental. L'ajout d'une protéine fluorescente de 27 kDa (YFP) peut être délétère pour la localisation de la protéine et peut éventuellement modifier la stabilité de celle-ci. Cette fusion n'est peut-être pas idéale pour le repliement tridimensionnel correct de la protéine et peut rendre par conséquent la protéine non localisable. D'autre part, l'YFP peut éventuellement masquer un domaine nécessaire pour l'interaction avec d'autres protéines, altérant de cette manière sa localisation. Comme mentionné précédemment, cette séquence placée à une extrémité de la protéine pourrait constituer un site reconnu par des enzymes de dégradation. La détermination de la présence des protéines de fusion en Western blot est donc nécessaire. Par exemple, on sait que chez *C. crescentus*, la protéine CtrA est non fonctionnelle lorsqu'elle est fusionnée à une molécule fluorescente à son extrémité C-terminale. Par contre, elle l'est lorsque la fusion avec la molécule fluorescente est en N-terminal.

Ne perdons pas de vue que *Brucella* est un pathogène et qu'il est probable que certaines protéines localisent uniquement dans un contexte infectieux et cela dans le but d'accomplir une fonction spécifique à un stade particulier de l'infection. Il serait donc intéressant d'observer et de comparer les patterns de localisation des protéines candidates dans des bactéries en culture liquide ou en infection (en macrophage par exemple).

Conclusions générales et perspectives

La division asymétrique chez *Brucella* spp. génère une petite et une grande cellule. Nous sommes donc en droit de nous interroger sur son rôle, sur les fonctions spécifiques possibles des cellules filles dans son cycle de vie libre mais aussi dans son processus infectieux. Dans les cas de *Caulobacter crescentus* et *Bacillus subtilis*, l'asymétrie morphologique sous-tend une asymétrie fonctionnelle. Cette propriété s'applique-t-elle à *Brucella* spp. En d'autres termes, l'asymétrie morphologique observée s'inscrit-elle dans une asymétrie fonctionnelle et donc une différenciation ? *C. crescentus*, érigé en paradigme de la différenciation procaryotique, est à ce titre un allié puissant pour la compréhension des mécanismes menant à l'asymétrie, qui semble être un trait commun chez les α -protéobactéries. Celle-ci est étroitement contrôlée par un réseau de régulation, au sein duquel un régulateur de réponse, CtrA, agit comme un véritable goulot d'étranglement en assimilant les diverses informations relatives à la division, relayée par des acteurs appartenant aux systèmes à deux composants, et en transmettant la réponse appropriée via la régulation de gènes requis pour l'établissement de cette réponse. *Brucella* spp. possède des orthologues de chacune des protéines impliquées dans ce réseau complexe ainsi qu'un acteur supplémentaire, PdhS, autour du lequel un grand flou persiste quant à sa fonction.

La recherche d'interactants et la caractérisation phénotypique subséquente, ont permis d'isoler plusieurs partenaires physiques potentiels. Pour la protéine d'intérêt PdhS, nous avons d'une part, la BMEI0738 qui est une protéine qui ne possède pas de segments transmembranaires prédits et qui est conservée chez certaines α_2 -protéobactéries telles *Mesorhizobium loti* et *Agrobacterium tumefaciens* et d'autre part, la BMEII1051 qui encode une fumarate hydratase impliquée dans le cycle de Krebs. Pour la protéine d'intérêt DivK, nous avons la BMEI0587 qui est une protéine hypothétique sans segments transmembranaires prédits. Les protéines hypothétiques ne nous éclairent pas sur la fonction de PdhS et DivK mais il se pourrait que ces petites protéines hypothétiques soient des adaptateurs polaires qui feraient partie d'un complexe multiprotéique incluant PdhS et ses partenaires protéiques.

La délétion du domaine N-terminal de PdhS, pour lequel aucun domaine de fonction présumée n'a pu être mis en évidence à ce jour, a mis en lumière sa nécessité dans les interactions avec ses interactants potentiels, en contraste avec la délétion du domaine C-terminal qui n'a aucun effet sur celles-ci. Inversément, un test 2H en levure précédent a montré que le domaine C-terminal de PdhS est nécessaire et suffisant pour l'interaction avec DivK. À partir de ces données expérimentales, nous confirmons en quelque sorte la dissection de PdhS en au moins deux domaines de fonction spécifique : un premier intervenant dans les interactions avec d'autres protéines et conditionnant sa localisation (N-terminal) et un second essentiel à son interaction avec DivK, vraisemblablement une fonction de (dé)phosphorylation (C-terminal).

Un moyen supplémentaire d'éclairer partiellement la nature fonctionnelle de PdhS et par la même occasion de confirmer les rôles concurrents de DivJ et PleC, serait de tenter de combiner la surexpression de *pdhS* soit avec la surexpression de *divJ* ou *pleC* soit avec un

mutant null de ces deux gènes. Deux cas de figure se présenteraient : soit une aggravation du phénotype, conduisant vraisemblablement à la mort bactérienne, soit une restauration partielle ou totale du phénotype sauvage. Les fonctions présumées seront alors respectivement similaires et antagonistes dans le cas de la surexpression (et inversement dans le cas des mutants null). La mise en évidence, dans le cas de la surexpression de PdhS, d'autres altérations morphologiques similaires à celles observées pour les mutants de surexpression de CtrA, présuppose une action indirecte sur celui-ci, sans doute par l'entremise d'une autre protéine qui d'une manière ou d'une autre jouerait sur l'activité de CtrA.

Une perspective envisageable serait d'intégrer le pKSoriT-bmei0738-yfp d'une part et le pKSoriT-bmei1051-yfp d'autre part dans le génome de la souche *B. abortus* 544 contenant le gène *pdhS-cfp* pour observer en time-lapse la dynamique de distribution de leur produit protéique et confronter leur pattern de localisation simultanément. Il serait également intéressant de tester l'interaction entre la protéine BMEI0587 et CtrA dans un test double hybride en levure puisque si cette protéine est en fait l'histidine phosphotransférase recherchée, elle ferait le lien entre DivK et CtrA et que d'une manière ou d'une autre, elle devrait interagir avec ce dernier.

Brucella n'est pas un parasite intracellulaire obligatoire dès lors une infection eucaryote n'exprime qu'une partie de son cycle de vie, l'autre partie non négligeable, se déroulant sous une forme libre dans la nature. À ce titre, les différentes expériences de localisation exposées précédemment pourront être réalisées de telle manière à confronter les patterns de localisation en fonction des « deux styles de vie » de *Brucella* ; au cours d'une vie libre (culture liquide) et à certaines étapes du cycle infectieux (par exemple en cellules HeLa).

La présence d'un nouveau partenaire dans le réseau de régulation de CtrA, par rapport à la situation chez *C. crescentus*, interpelle quant à son rôle dans ce réseau de régulation. PdhS, témoin de la plasticité du réseau de régulation, aurait-il un rôle dans la virulence de *Brucella* spp. ? Ne perdons pas de vue que *C. crescentus* reste un modèle prédictif qui permet d'ébaucher des pistes menant à la dissection complète du pathway CtrA chez *Brucella* spp. mais qu'il n'est pas un modèle pour l'étude des mécanismes conduisant à la virulence. Dans l'optique d'appréhender le rôle de PdhS dans un contexte d'infection, il serait intéressant d'étudier, e.g. en modèle murin, la cinétique d'infection de souches bactériennes contenant une mutation ponctuelle dans le gène *pdhS* altérant l'une ou l'autre de ses fonctions.

Plusieurs protéines bactériennes, dont celles essentielles au processus infectieux de certains pathogènes, sont connues pour leur localisation soit polaire, soit bipolaire. Celles-ci incluent l'appareil de sécrétion de type II de *Vibrio cholerae*^(Scott et al., 2001), l'appareil de transfert d'ADN de type IV d'*Agrobacterium tumefaciens*^(Kumar and Das, 2002) et les protéines IcsA et ActA respectivement pour *Shigella flexneri* et *Listeria monocytogenes*, pour ne citer qu'elles^(Goldberg et al., 1993, Kocks et al., 1993). Ces deux dernières protéines localisent au vieux pôle de la bactérie et réquisitionnent l'actine de la cellule eucaryote durant l'infection^(Brandon et al., 2003). L'assemblage de cette queue d'actine fournit alors la force propulsive pour le mouvement et la dissémination intracellulaires. En d'autres mots, la localisation unipolaire de ces deux protéines rend possible une mobilité unidirectionnelle.

Puisque la localisation des protéines est essentielle à leur fonction et déterminante pour la différenciation de *Brucella* spp. ainsi que pour la majorité des bactéries et que la localisation de certaines protéines a un rôle important dans la virulence, nous nous interrogeons plus que jamais sur la fonction potentielle de PdhS chez *Brucella* spp. dans le processus de différenciation et/ou de virulence.

La BMEI1051 encodant une fumarate hydratase impliquée dans le cycle de Krebs n'avait à première vue aucun lien fonctionnel avec PdhS. Le plus curieux est qu'une protéine impliquée dans le métabolisme central présente un pattern de localisation subcellulaire, qui

plus est similaire à celui de PdhS. Néanmoins, une étude récente a montré que l'homologue de PdhS chez *Sinorhizobium meliloti*, nommé CbrA, affecte la production de succinoglycan^(Gibson *et al.*, 2006). Celui-ci est un exopolysaccharide qui joue un rôle critique dans le processus de nodulation chez *S. meliloti*. C'est un polymère de sous-unités répétées d'octasaccharides (un galactose et sept glucoses) qui peut être substitué avec des groupements acétyl, pyruvyl et succinyl. À ce titre, le succinate, intermédiaire du cycle de Krebs, augmente l'intérêt porté à cette enzyme. Nous pouvons imaginer que ce succinate intervient dans la modification du succinoglycan chez *Brucella* spp. Ceci reste une hypothèse. Il faudrait tout d'abord savoir si *Brucella* spp. produit également un exopolysaccharide de ce type et si PdhS participe à sa production. La transposition n'est en aucun cas une simple et superflue vérification et, sans une preuve tangible, aucune conclusion ne peut être tirée à propos de la fonction de PdhS chez *Brucella* spp.

Matériels et méthodes

Matériel et méthodes

Souches et plasmides

Souches

Bactéries

***Escherichia coli* DH10B**

Cette souche est utilisée pour l'amplification d'un plasmide ou d'un produit de ligation. L'introduction de cet ADN circulaire s'effectue suivant la technique dite de transformation bactérienne. Génotype : F- *mcrA* D(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) 80*lacZ*ΔM15 D*lacX*74 *deoR* *recA1* *endA1* *araD*139 D (*ara*, *leu*)7697 *galU* *galK* l- *rpsL* *nupG*. (GibcoBRL(Invitrogen))

***Escherichia coli* S17-1λpir**

Cette souche possède le plasmide RP4 intégré dans son génome qui lui permet de transférer par conjugaison un plasmide pourvu d'une origine de transfert. De plus, elle est résistante à la streptomycine, à la septinomucine et au triméthoprim. Génotype : *recA* *thi* *pro* *hsdR*⁻ M⁺ RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7 lysogénisé avec le phage λpir.

***Escherichia coli* DB3.1**

Cette souche résistante à la toxine CcdB grâce à un allèle *gyrA*462 est utilisée pour l'amplification de plasmide gatewayTM. Génotype : F- *gyrA*462 *endA*-D(*sr1-recA*) *mcrB* *mrr* *hsd20*(rB-,mB-) *supE*44 *ara14* *galK2* *lacY1* *proA2* *rpsL* l- *leu* *mtl1*. (Invitrogen)

***Brucella abortus* 544**

La souche utilisée pour ce travail est *B. abortus* biovar 544, rendue résistante à l'acide nalidixique (Nal^R) au laboratoire de biologie moléculaire, FUNDP, Namur.

Levures – *Saccharomyces cerevisiae*^(Walhout and Vidal, 2001)

Les deux souches, MaV103 et MaV203, utilisées sont isogéniques à l'exception de leur type sexuel. La première est MATa, et la seconde est MATα, ce qui permet des expériences de mating utilisant ces deux souches. MaV103 et MaV203 partagent le même génotype pour les caractéristiques double-hybride (*leu2-3, 112* *trp-901* *his3*Δ200 *ade2-1* *gal4*Δ *gal80*Δ *SPAL10::URA3* *GAL1::lacZ* *GAL1::HIS3@LYS2* *can1R* *cyh2R*).

Plasmides

pDONR201

Ce plasmide commercialisé par Invitrogen life Technologie est conçu pour le clonage en système GatewayTM (GW) de fragments d'ADN d'intérêt. Il contient des sites de recombinaison *attP1* et *attP2* situés de part et d'autre d'une cassette contenant le gène *ccdB* toxique pour certaines souches de *E. coli* et un gène de résistance au chloramphénicol. Le plasmide porte en outre un gène de résistance à la kanamycine et une origine de réplication (pUC ori) fonctionnelle chez *E. coli*. Il est utilisé dans des réactions BP impliquant l'échange de la cassette contre un fragment d'intérêt bordé des sites *attB1* et *attB2*. Le produit de recombinaison est alors appelé vecteur d'entrée.

pVV212^(Van Mullem et al., 2003)

Ce vecteur est dérivé du pGBT9 (Bartel *et al.*, 1993) dans lequel a été inséré une cassette de clonage GatewayTM. Il contient des sites de recombinaison *attR1* et *attR2* situés de part et d'autre d'une cassette contenant le gène *ccdB* et un gène de résistance au chloramphénicol. Le plasmide porte un gène de résistance à l'ampicilline et deux origines de réplication ; l'une fonctionnelle chez *E.coli* (ColE1) et l'autre chez la levure (2μ). La séquence codant le domaine de liaison à l'ADN (BD) du facteur de transcription Gal4 en amont de la cassette Gateway permettra la fusion traductionnelle avec un gène d'intérêt. Afin de le sélectionner le pVV212 en levure, il possède un marqueur d'auxotrophie codant TRP1, une enzyme impliquée dans la biosynthèse du tryptophane. Il est sous le contrôle du promoteur du gène codant pour l'alcool déshydrogénase 1 (*padh1*).

pVV213^(Van Mullem et al., 2003)

Ce vecteur est dérivé du pACTII (Fromont *et al.*, 1997) dans lequel a été inséré une cassette de clonage GatewayTM. Il contient des sites de recombinaison *attR1* et *attR2* situés de part et d'autre d'une cassette contenant le gène *ccdB* et un gène de résistance au chloramphénicol. Le plasmide porte un gène de résistance à l'ampicilline et deux origines de réplication ; l'une fonctionnelle chez *E.coli* (ColE1) et l'autre chez la levure (2μ). La séquence codant le domaine de transactivation (AD) du facteur de transcription Gal4 en amont de la cassette GW permettra la fusion traductionnelle avec un gène d'intérêt. Afin de le sélectionner le pVV213 en levure, il possède un marqueur d'auxotrophie codant LEU2, une enzyme impliquée dans la biosynthèse de la leucine. Il est sous le contrôle du promoteur du gène codant pour l'alcool déshydrogénase 1 (*padh1*).

pMR10*cat-yfp* ^(Régis Hallez, thèse en cours)

Ce plasmide est dérivé du pMR10-*cat* (Robertson *et al.*, 2000), auquel a été rajouté, à proximité du promoteur *Plac*, des sites *attR1* et *attR2* de part et d'autre d'une cassette contenant le gène *ccdB*, ainsi qu'un gène de résistance au chloramphénicol. Ces sites permettent l'échange de la cassette avec un fragment d'ADN d'intérêt présent dans un vecteur d'entrée via une réaction LR. *In fine*, nous obtenons, sous le contrôle du promoteur *Plac*, une fusion traductionnelle entre la protéine d'intérêt et une molécule fluorescente (YFP).

Pour information, le pMR10-*cat* est un plasmide réplcatif chez *Brucella* spp. à faible nombre de copies (origine RK2oriV), possédant un gène de résistance à la kanamycine et un gène de résistance au chloramphénicol.

pBBR1MCS-1-GW

Dérivé du pBBR1MCS-1^(Kovach et al., 1995), ce plasmide a été rendu compatible au système gateway (Régis Hallez, thèse en cours). C'est un plasmide compatible avec le pMR c'est-à-dire qu'ils peuvent coexister dans la même bactérie.

Le pBBR1MCS-1, plasmide à moyen taux de réplication (10 à 15 copies par cellules), permet entre autre l'étude de la surexpression protéique. Il porte une origine de réplication REP (origine compatible avec la machinerie de réplication de *Brucella*). Il peut également se trouver en présence de plasmides contenant d'autres origines de réplication comme ColE1 et p15A. On y trouve également un gène de résistance au chloramphénicol (*cat*).

pKSoriT-Gateway-yfp-Kan^R

Ce plasmide est un dérivé de pBluescript KS (Stratagene) dans lequel une origine de transfert conjugatif oriT a été clonée. Il porte le gène *bla* (résistance à l'ampicilline) et une origine de réplication ColE1 (origine non fonctionnelle chez *Brucella* ; ce plasmide est dit non réplcatif ou intégratif chez cette bactérie). Il contient des sites de recombinaison *attR1* et *attR2* situés de part et d'autre d'une cassette contenant le gène *ccdB* et un gène de résistance au chloramphénicol. Il permet la fusion traductionnelle entre la protéine d'intérêt et la yellow fluorescent protein (YFP), protéine fluorescente. Il est sous le contrôle du *Plac*.

pSKoriT-Gateway-egfp-Kan^R

Ce plasmide est un dérivé de pBluescript SK (Stratagene) dans lequel une origine de transfert conjugatif oriT a été clonée. Il porte le gène *cat* (résistance au chloramphénicol) et une origine de réplication ColE1 (origine non fonctionnelle chez *Brucella* ; ce plasmide est dit non réplcatif ou intégratif chez cette bactérie). Il contient des sites de recombinaison *attR1* et *attR2* situés de part et d'autre d'une cassette contenant le gène *ccdB* toxique pour certaines souches de *E. coli* et un gène de résistance au chloramphénicol. Il permet la fusion traductionnelle entre la protéine d'intérêt et la enhanced green fluorescent protein (EGFP), protéine fluorescente. Il est sous le contrôle du *Plac*.

Milieux de culture

Les milieux sont autoclavés 20 minutes à 121°C sous une pression de 20 bars. Le milieu est refroidi à environ 55°C puis additionné des antibiotiques ou autres additifs avant d'être coulé dans des boîtes de Petri.

Milieux de culture pour bactéries

Milieux riches pour *E. coli* : milieu Luria Bertani (LB)

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

Milieux riches pour *Brucella abortus* : milieu 2YT

Pour un litre d'eau désionisée	Forme liquide	Forme solide
Mix pour LB liquide	20 g	35 g
Hydrolysate de caséine (peptone)	6 g	6 g
Yeast extract	5 g	5 g
Agar	-	1 g

Milieux SOC

Pour un litre d'eau désionisée :

2% tryptone	2,5 mM chlorure de potassium	10 mM chlorure de magnésium	20 mM glucose
0,5% extrait de levure	10 mM chlorure de sodium	10 mM sulfate de magnésium	

Milieux de culture pour levures**Milieu riche : YPD**

Pour un litre d'eau désionisée	Forme liquide	Forme solide
Glucose	20 g	20 g
Bacto peptone 2%	20 g	20 g
Yeast extract 1%	10 g	10 g
Agar	-	20g

Milieu minimum : SD (concentré 100X)

Pour un litre d'eau désionisée	Forme liquide	Forme solide
Glucose	20 g	20 g
Yeast Nitrogen Base w/o amino acid	6,75 g	6,75 g
Agar	-	20 g

Milieu synthétique

Le milieu synthétique est réalisé en ajoutant dans le milieu les acides aminés et bases azotées à raison de 1 ml de solution stock pour 100 ml de milieu.

Acides aminés et bases azotées concentrées 100X

Adénine sulfate	2 g/l	Uracile	2 g/l	L-Leucine	3 g/l	L-Méthionine	10 g/l
L-Tryptophane	2 g/l	L-Histidine-HCl	3 g/l	L-Lysine-HCl	3 g/l		

Tampons et solutions

- Fabrication du gel d'agarose**

Bromure d'éthidium	Solution d'alourdisseur	Tampon TAE 50x
Solution de 2mg/ml H ₂ O	glycérol 50% EDTA 100mM SDS 1% Bleu de bromophénol ou méthyl orange	Tris-HCl pH 8,0 40mM EDTA 50mM Acide acétique glacial 57,1ml/litre

- Tampon PBS 20X**

Pour un litre d'eau désionisée			
KH ₂ PO ₄ 2mM	4 g/l	KCl 2,7 mM	4 g/l
Na ₂ HPO ₄ 10 mM	22,98 g/l	NaCl 137 mM	160 g/l

- **Tampon TE**

Tris-HCl pH 8.0	10 mM	EDTA	1 mM
-----------------	-------	------	------

- **Solution d'acétate de lithium (LiAc) 10X**

Porter 10,2 g de LiAc à un volume de 100 ml avec de l'eau désionisée, ensuite autoclaver.

- **Poly éthylène glycol (PEG) 40%**

Porter 40 g de PEG 4000 à un volume de 100 ml avec de l'eau désionisée. Ensuite, stériliser au moyen d'un filtre de 0,45 µm (Millipore).

- **Mélange PEG4000 (40%)/TE/LiAc**

LiAc 10X	1/10ème de volume	TE 10X	1/10ème de volume	PEG 40%	8/10ème de volume
----------	-------------------	--------	-------------------	---------	-------------------

- **Solution de 3-Amino-1,2,4-Triazole (3AT) 2M**

Porter 42,04 g de 3AT à un volume de 250 ml avec de l'eau désionisée, stériliser au moyen d'un filtre de 0,22 µm (Millipore). Conserver à 4°C.

- **Z buffer**

Pour un litre d'eau désionisée	Pesée
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	10,67 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5,5 g
KCl	0,75 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,246 g

A autoclaver ensuite.

- **4% X-gal**

Dissoudre 40 mg de 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside (X-gal) dans 1 ml de N,N-diméthylformamide. Emballer dans un papier alu et conserver à -20°C.

- **Solution β-gal**

Pour chaque boîte	Boîte de Petri 15 cm	Boîte de Petri 9 cm
Z buffer	5 ml	3 ml
4% X-gal	120 µl	72 µl
β-mercaptoéthanol	13 µl	7,8 µl

- **Solution de blocking (Western blot) pour 1l**

PBS stock 20X	50 ml	Tween	500 µl
Lait en poudre	50 g	H ₂ O	950 ml

- **PBS-Tween 0,05% (Western blot) pour 1L**

PBS stock 20X	50 ml	H ₂ O	950 ml	Tween20	500 µl
---------------	-------	------------------	--------	---------	--------

- **Tampon de chargement protéique 5X (Western blot) (28 ml)**

Glycérol 50%	10 ml	Tris 1,5M pH 6,8	13 ml
β-mercaptoéthanol 5%	5 ml	Bleu de bromophénol	0,0005 g
SDS 10%	2 g		

- **Tampon de transfert (Western blot) : Towbin buffer**

Tris	48 mM	SDS	0,04%
Glycine	39 mM	Méthanol	200 ml

Porter à un volume de 1L avec de l'eau désionisée

- **Tampon SDS PAGE (Western blot)**

Tris base	30,35 g	Glycine	144 g	SDS	10 g
-----------	---------	---------	-------	-----	------

Porter à un volume de 1L avec de l'eau désionisée

- **Running gel**

Stacking gel

Pour 20 ml	Pour 6 ml		
H ₂ O	8,4 ml	H ₂ O	3,6 ml
38,5% Acrylamide mix	6,2 ml	30% Acrylamide mix	780 µl
1,5M Tris (pH8.8)	5 ml	1,5M Tris (pH8.8)	1,5 ml
10% SDS	200 µl	10% SDS	60 µl
10% APS	200 µl	10% APS	60 µl
TEMED	8 µl	TEMED	6 µl

- **Antibiotiques**

Nom	Abrév.	Solution de dissolution	Concentration stock (1000X)
Acide nalidixique	Nal	NaOH 0,2N	25 mg/ml
Ampicilline	Amp	H ₂ O	100 mg/ml
Chloramphénicol	Cm	Ethanol 100%	20 mg/ml
Kanamycine	Kan	H ₂ O	50 mg/ml

Les antibiotiques sont filtrés stérilement avec un filtre 0,22 µm de porosité avant d'aliquoter et de dilués 1000 fois lors de l'utilisation dans un milieu.

- **VALAP**

Vaseline	1/3 de volume	Lanoline	1/3 de volume	Paraffine	1/3 de volume
----------	---------------	----------	---------------	-----------	---------------

Méthodes

Techniques relatives à l'ADN

Polymerase chain reaction (PCR)

Cette technique est utilisée pour amplifier rapidement un fragment d'ADN d'intérêt (amplicon). Les séquences bordant le fragment d'intérêt doivent être connues pour pouvoir concevoir des amorces oligonucléotidiques (encore appelées primers) qui leur sont complémentaires. La matrice d'ADN est dénaturée par chauffage en présence d'un excès d'oligonucléotides et de dNTP's. Le mélange est ensuite soumis à une diminution de température (en fonction des amorces), qui permet l'hybridation spécifique des amorces. La séquence comprise entre les deux amorces est amplifiée par une ADN Polymérase thermorésistante (la *Taq* DNA Polymérase de Biotools ou l'Expand High Fidelity de Roche) à une température optimale pour le fonctionnement de la polymérase. La *Taq* polymérase, vu le taux relativement élevé de mutations introduites, est utilisée dans les cas de PCR diagnostiques alors qu'une enzyme « proofreading » (High Fidelity) est utilisée dans les cas de clonage. Le cycle de dénaturation/hybridation/élongation est répété de 25 à 30 fois. Ce procédé fournit une amplification exponentielle.

Mix

Réactifs	Quantité
Tampon 5X _{Taq} ou 10X _{HF} correspondant à l'enzyme	10 µl ou 5 µl
Mix dNTP's (5 mM pour chaque)	1,2 µl
Amorce 1 (20 µM)	0,5 µl
Amorce 2 (20 µM)	0,5 µl
Taq polymérase ou High Fidelity	0,5 µl
Matrice d'ADN	~20 ng
Eau distillée et autoclavée	Porter à 50 µl (ou 30 µl pour une PCR diagnostique)

Lors d'une PCR dont les amorces sont bordées de site de recombinaison GWTM (*attB1* ou *attB2*), la concentration des primers utilisés est de 100 µM.

Programme

Dénaturation de 5 minutes à 94°C. Dans le cas d'une PCR sur colonie, une étape antérieure de 10 minutes supplémentaires à 94°C est nécessaire.

25 à 30 cycles d'amplification divisés en 3 étapes :

1. 30 secondes (ou 1 minute pour une amplification de fragments compatibles Gateway™) à 94°C pour dénaturer.
2. 30 secondes (ou 1 minute pour une amplification de fragments compatibles Gateway™) à X°C pour hybrider où $X = T_m - 10^\circ\text{C}$
3. Y minute(s) à 72°C pour l'élongation où Y = la taille (Kb) du fragment à amplifier.

Elongation finale de 10 minutes à 72°C

En bonne approximation, la température d'hybridation (T_m) des amorces de moins de 20 pb égale le quadruple de la somme des bases G et C additionné du double de la somme des bases A et T. En bref, la $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$. Ce calcul ne prend en compte que la partie s'hybridant au premier cycle de dénaturation et pas les ajouts de séquence bordante en 5'.

Remarquons que l'ADN génomique peut être remplacé par une culture bactérienne (PCR sur colonies) sans extraction d'ADN. Les bactéries sont alors lysées lors de la première étape de dénaturation à 94°C.

Voici les différentes amorces utilisées au cours de ce mémoire :

Amorces	Séquence (de 5' en 3')	Remarques
iGal4AD	CTATTCGATGATGAAGATACCCACACC	Amplification de la fusion AD-Y en 2H
Gal4term	GAAGTGAACCTGCGGGGTTTTTCAG	
upGemT	GTTTTCCAGTCACGAC	Amplification de la séquence clonée dans le vecteur de destination pBBR1MCS1-GW
downpGemT	GGAAACAGCTATGACCATG	
pMR15 amont	TCAATGATGACCTGGTGCAT	Amplification de la séquence clonée dans le vecteur de destination pMR10cat-yfp
ic/yfp aval	GAAGTCAGGGTCAGCTT	

Électrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN dans un champ électrique en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser sera 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 taille, nous utilisons l'HyperLadder de Bioline. La révélation d'ADN est réalisée grâce au bromure d'éthidium (BrEth), composé fluorescent qui rend la double hélice visible sous UVs en s'intercalant entre ses bases. 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.

Fabrication du gel

1. Dissoudre par chauffage Y g d'agarose dans Z ml de tampon TAE 1X, où Y/Z représente le pourcentage en agarose (dans notre cas 1%).
2. Ajouter 5 µl de bromure d'éthidium.
3. Une fois que la température du flacon atteint ~60°C, couler le gel dans un support adéquat muni d'un peigne délimitant les puits.
4. Charger les échantillons auxquels a été ajouté au moins un dixième de solution d'alourdisseur et charger le marqueur moléculaire en parallèle (5 µl/puits).

Restriction de plasmide

Les enzymes de restriction sont des endonucléases qui permettent de cliver l'ADN double-brin de manière spécifique : elles reconnaissent des sites de restrictions, constitués par une séquence souvent palindromique, de 4 à 6 paires de bases. La coupure peut être décalée d'un brin par rapport à l'autre, formant ainsi des « bouts protrudants ». Dans le cas où cette coupure n'est pas décalée, la restriction génère des bouts francs.

- 1 µl Buffer 10X en fonction de l'enzyme (A, B, L, M ou H).
- Le volume (µl) d'enzyme de Restriction à ajouter est déterminé grâce à la formule : $Q(\text{unité}) = 48,5 * q * np / n\lambda * t$, où q est la quantité en µg du plasmide, np le nombre de sites dans le plasmide, t la taille du plasmide en kb et nλ le nombre de sites dans le phage λ. En général, les enzymes de restrictions sont conditionnées pour avoir 10U/µl. Une unité correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour restreindre complètement 1 µg d'ADN du phage λ.
- X µl de plasmide à restreindre
- Porter à un volume final de 10 µl avec de l'eau distillée.

Incuber une heure dans un bain-marie à 37°C. Les enzymes de restriction et leur tampon proviennent de chez Roche.

Purification sur gel

Pour les purifications d'ADN à partir d'un gel, nous avons utilisé le kit QIAquick™ Gel Extraction Kit de Qiagen. Le protocole est prévu pour extraire et purifier de l'ADN de 70 bp à 10 Kb à partir d'un gel d'agarose standard.

- Exciser le fragment d'intérêt du gel à l'aide d'un scalpel et peser le morceau d'agar.
- Ajouter 3 volumes de *Binding solution* pour un volume de gel.
- Incuber 10 minutes à 55°C pour dissoudre l'agarose.
- Passer la solution de silice du kit au vortex pour bien resuspendre les billes de silice.
- Ajouter 2 µl de cette solution de silice par µg d'ADN; passer au vortex.
- Incuber 10 minutes à 55°C.
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.
- Retirer le surnageant et ajouter au culot 500 µl de solution de lavage du kit
- Resuspendre au vortex.
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.
- Répéter 3 fois l'opération.
- Resuspendre le culot dans 20 µl d'eau stérile.
- Incuber à 55°C pendant 10 minutes.
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.
- Récupérer le surnageant et conserver l'ADN à – 20°C.

Purification sur colonne

Pour les purifications d'ADN sur colonne (après une PCR par exemple), nous avons utilisé le kit MSB Spin PCRapace d'Invitex. Ce protocole est prévu pour purifier et concentrer des fragments d'ADN simple ou double brin de réactions PCR (de 80 pb à 30 kb).

Minipréparation de plasmide

Cette technique permet d'isoler et de purifier les plasmides présents chez les bactéries. La préparation d'ADN plasmidique comprend 5 étapes : la 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 extrait à partir d'une culture bactérienne de 5 ml de LB additionnée ou non d'antibiotique(s), en suivant les instructions du kit Nucleospin® (Marcherey-Nagel).

Séquençage

Pour séquencer les fragments d'ADN, nous avons utilisé le kit ABI PRISM dye terminator de Perkin Elmer. La réaction de séquençage est basée sur le principe de Sanger (1977). Cette technique est basée sur la polymérisation d'un fragment d'ADN par PCR, à partir d'une amorce nucléotidique. Le mélange de réaction contient des déoxynucléotides et des didéoxynucléotides marqués à la fluorescéine. La présence de didéoxyribonucléotides arrête la polymérisation, ce qui permet d'obtenir une population de brins tronqués représentant la séquence d'ADN, chacun émettant à une longueur d'ondes bien précise. Le produit de réaction de séquençage est mis sur gel de polyacrylamide: les brins tronqués de différentes tailles migrent dans le gel. Grâce aux quatre couleurs différentes, représentant chacune un nucléotide, le parcours du gel donne la séquence.

Protocole : kit Perkin Elmer

Le mélange de réaction est réalisé dans un tube de 100 µl :

- Entre 200 et 500 ng d'ADN (bicaténaire) à séquencer.
- 10 picomoles d'amorce.
- 2 µl du mix de réaction (ABI PRISM) contenant les dNTP, les ddNTP, l'enzyme polymérase.
- 6 µl de tampon Tris-HCl MgCl₂.
- Le mélange de réaction est porté à un volume de 20 µl avec de l'eau distillée.

Cycles

1. Dénaturation de 1 minute à 96°C.
2. 25 cycles de :
 - a. 10 secondes à 96°C.
 - b. 10 secondes à 50°C.
 - c. 4 minutes à 60°C.

Clonage Gateway™

Le système Gateway™ est basé sur les réactions de recombinaison intervenant lors de l'intégration et de l'excision du phage λ dans le génome d'*E. coli* (Fig.37). L'intégration implique la recombinaison entre les sites *attP* et *attB* présents respectivement dans l'ADN du phage λ et dans le génome bactérien. Cette réaction génère un génome phagien intégré compris entre les sites *attR* et *attL* néoformés. La réaction d'intégration (réaction BP) requiert deux enzymes : l'intégrase (Int) encodée par le génome du phage ainsi que l'IHF (Integration Host Factor) d'origine bactérienne communément englobées sous le terme BP clonase. Cette intégration est réversible et l'ADN du phage peut être excisé du génome bactérien par recombinaison entre les sites *attR* et *attL*. Cette réaction d'excision est appelée réaction LR. Elle nécessite les facteurs Int et IHF ainsi qu'une protéine additionnelle d'origine phagique (Xis) communément englobées sous le terme LR clonase. Ce système a été adapté pour permettre des clonages faciles en laboratoire. Les composants du système de recombinaison du phage λ ont été modifiés afin d'obtenir des paires de sites à spécificités distinctes et d'améliorer l'efficacité du système. Une différence d'une paire de base suffit à donner la spécificité. Ainsi, les sites *attB1* ne recombinent qu'avec les sites *attP1* et de la même façon, *attB2* avec *attP2*, *attL1* avec *attR1* et *attL2* avec *attR2*. En pratique, ce système nécessite plusieurs étapes (Fig.38). Dans un premier temps, la séquence codante (*cds*) d'un gène est amplifiée au moyen d'une paire d'amorces dont l'extrémité 3' s'hybride sur la séquence d'intérêt et dont l'extrémité 5' contient, pour l'une, le site de recombinaison GW™ *attB1*, pour l'autre, le site *attB2*. Les produits PCR ainsi obtenus sont constitués, outre les sites *attB1* et *attB2* aux extrémités, d'une séquence débutant exactement à l'ATG (correspondant au codon d'initiation de traduction AUG d'une protéine) et continuant sur toute la *cds* jusqu'au pénultième codon, excluant ainsi le codon STOP.

La seconde étape consiste à réaliser une réaction BP des produits PCR en présence d'un vecteur donneur contenant les séquences de recombinaison *attP1* et *attP2* bordant le gène de résistance au chloramphénicol *cat* et le gène de toxicité *ccdB*. La protéine CcdB interfère avec l'ADN gyrase d'*E. coli*, inhibant ainsi la croissance de souches bactériennes « *ccdB* sensibles ». L'ADN gyrase de bactéries « *ccdB* résistantes » n'est pas affectée par CcdB. La réaction est catalysée par le « mix BP clonase » qui contient Int et IHF.

Suite à cette recombinaison, quatre types de produits sont possibles : le produit PCR (*attB1-cds-attB2*), le produit de recombinaison *attR1-ccdB-attR2*, le vecteur donneur *attP1-ccdB-attP2* et le vecteur d'entrée constitué de la *cds* flanquée des sites *attL1* et *attL2*. Les produits de réaction obtenus sont alors transformés dans une souche de bactéries *ccdB* sensibles. De cette manière, seules les bactéries contenant un vecteur recombinant (c'est-à-dire dont la cassette contenant le gène *ccdB* a été remplacée par le produit PCR) seront capables de se multiplier. De plus, l'antibiotique, pour lequel le vecteur donneur code la résistance, est ajouté au milieu et permet ainsi la sélection des bactéries contenant un plasmide. Les vecteurs d'entrée sont récupérés par minipréparation d'ADN plasmidique. Les vecteurs d'entrée obtenus peuvent servir par la suite, pour le clonage en divers vecteurs d'expression.

Ensuite, il ne reste plus qu'à effectuer une réaction LR qui permet la recombinaison d'un vecteur d'entrée contenant les sites *attL1* et *attL2* avec un vecteur de destination contenant les sites *attR1* et *attR2*, pour générer un vecteur d'expression contenant les sites *attB1* et *attB2*. La réaction est catalysée par le mix « LR clonase », contenant Int, IHF et Xis. Suite à cette recombinaison, quatre types de produits sont possibles : le vecteur d'entrée *attL1-cds-attL2*, le vecteur de destination *attR1-ccdB-attR2*, le produit de réaction *attP1-ccdB-attP2* et le

vecteur d'expression *attB1-cds-attB2*. Les produits de réaction obtenus sont alors transformés dans une souche de bactéries *ccdB* sensibles. De cette manière, seules les bactéries contenant un vecteur recombinant seront capables de se multiplier. Les bactéries contenant un plasmide peuvent être sélectionnées par l'ajout de l'antibiotique pour lequel le vecteur de destination code la résistance. Les vecteurs d'expression sont récupérés par minipréparation d'ADN plasmidique.

Réaction BP artificielle	Réaction LR artificielle
1 µl (150 ng) de pDONR201 restreint NcoI	3 µl de vecteur d'entrée
3 µl de réaction PCR du gène d'intérêt	3 µl de vecteur de destination
2 µl de tampon de dilution BP	2 µl de tampon de dilution LR
2 µl d'enzyme clonase BP	0,8 µl d'enzyme clonase LR
2 µl d'H ₂ O distillée	1,2 µl d'H ₂ O distillée
Incubation à 25°C de 2 à 24h, puis la réaction est stoppée en incubant le mélange 10 min. à 37°C avec 2 µl de protéinase K	Incubation à 25°C de 2 à 24h.

Techniques relatives à l'utilisation de bactéries

Préparation de cellules *E.coli* électro-compétentes (DH10B/S17-1)

Jour 1

1. Réveiller la souche à rendre compétente sur LB Agar à 37°C toute la nuit.

Jour 2

2. En fin de journée, lancer une préculture dans 5 ml de LB liquide en grattant si possible une seule colonie.

Jour 3

3. Au matin, verser la totalité de la préculture dans 1,2 L de LB liquide en erlen à contre-pals de type 5 L. Agiter à 37°C.
4. Surveiller la croissance de la culture en prenant la DO⁶⁰⁰ régulièrement. Quand la D.O. atteint plus ou moins 0,5, stopper la croissance sur glace pendant 10 minutes.
Rem : à partir de cette étape, il faut rester en permanence à froid.
5. Répartir la culture dans 6 biberons stériles.
6. Centrifuger 15 minutes à 4000 rpm et à 4°C.
7. Resuspendre dans de l'eau bidistillée stérile et froide (4°C) en répartissant 1,2 l de cette eau pour les 6 biberons.
8. Centrifuger 15 minutes à 4000 rpm et à 4°C.
9. Resuspendre dans 300 ml d'eau bidistillée stérile et froide (4°C) et ensuite la répartir dans 6 falcons (50 ml chacun).
10. Resuspendre dans de l'eau bidistillée+10% glycérol stérile et froide (4°C) et porter à 20 ml dans 2 falcons.
11. Centrifuger 15 minutes à 4000 rpm et à 4°C.
12. Resuspendre chaque culot dans 2,5 ml d'eau bidistillée+10% glycérol stérile et froide (4°C).
13. Aliquoter en eppendorfs stériles posés sur glace.
14. Stocker à -80°C.

Rem : tous les récipients utilisés sont placés à -20°C o/n.

Transformation bactérienne par électroporation

De manière générale, la transformation bactérienne consiste à faire entrer de l'ADN exogène (dans notre cas, un plasmide) dans une bactérie.

Les cellules électrocompétentes *E.coli* DH10B ou S17-1, gardées à -80°C, sont décongelées lentement sur la glace. Stérilement, 60 µl de cellules électrocompétentes et 2 à 7 µl de plasmides sont mis dans un eppendorf. Le contenu de l'eppendorf est mélangé et mis immédiatement sur la glace. Ce même contenu est déposé dans une cuvette^{BIORAD} de 2 mm spécialement conçu pour l'électroporation. Une pulsion est donnée d'après les paramètres déterminer par l'appareil pour l'utilisation de cellules bactériennes *E.coli* et d'une cuvette de 2 mm : 2 kV, capacité de 25 µF, low range=2. La pulsion terminée, 700 µl de milieu SOC doit être immédiatement ajouté aux cellules et le tout doit être transféré dans un eppendorf. Les eppendorfs sont incubés à 37°C pour 1heure maximum sous agitation. On étale ensuite 100 µl du contenu de l'eppendorf sur milieu LB solide contenant un antibiotique. On peut également, après centrifugtion (5' à 5000 rpm), élimination du surnageant et resuspension avec le liquide restant, étaler le reste sur milieu LB solide contenant un antibiotique.

Rem : il existe également une transformation par choc thermique. En début de phase exponentielle de croissance, les bactéries sont rendues artificiellement compétentes par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium (CaCl₂). Celui-ci déstabilise la paroi et la membrane bactériennes les rendant ainsi perméables à l'ADN. L'ADN plasmidique ajouté forme avec le calcium un complexe résistant aux désoxyribonucléases. Ce complexe adhère vraisemblablement à la bactérie. Les bactéries sont ensuite soumises à un choc thermique permettant au complexe de rentrer dans la cellule. Ensuite, un temps d'incubation en milieu riche non sélectif permet aux bactéries de régénérer une paroi normale et aux gènes de résistance introduits de s'exprimer. Les transformants sont enfin isolés sur milieu sélectif.

Contrôle négatif

À un même volume de cellules électrocompétentes utilisées est ajouté un volume d'eau équivalent au volume de plasmide ajouté. La démarche suivie pour l'électroporation est identique à celle exposée précédemment. Après chaque électroporation, les cuvettes sont lavées à l'eau de javel, plongées dans de l'alcool o/n et passées sous UV pendant 3 minutes. Ce contrôle permet de s'assurer que les cuvettes sont bien stériles.

Conjugaison

La conjugaison entre bactéries Gram négatives est un transfert horizontal de matériel génétique. La bactérie donneuse amène, via un pili sexuel, un plasmide conjugatif contenant une origine de transfert vers une bactérie receveuse. La souche donneuse (dans notre cas S17-1) possède le plasmide RP4 intégré dans son chromosome qui code pour les protéines nécessaires au transfert conjugatif.

Protocole en plaque 96 puits

1. Préparer deux précultures : ensemercer, d'une part, 5 ml de LB liquide plus antibiotique(s) approprié(s) avec des *E. coli* S17-1 donneuses transformées avec le

plasmide d'intérêt. D'autre part, ensemercer 10 ml de 2YT liquide d'une colonie de *Brucella abortus* 544 receveuses (Nal^R). À 37°C sous agitation o/n.

2. Le lendemain, mélanger 10 µl (50 µl) de la préculture d'*E.coli* S17-1 et 90 µl (1 ml) de la préculture de *Brucella abortus* 544.
3. Centrifuger 10 minutes à 1000-2000 rpm afin de culotter les cellules. Jeter le surnageant.
4. Ajouter 50 µl (1 ml) de 2YT pour laver les cellules et centrifuger 10 minutes à 1000-2000 rpm.
5. Jeter le surnageant.
6. Ajouter 50 µl de 2YT.
7. Resuspendre et déposer une goutte de bactéries sur un milieu 2YT au centre d'une petite boîte de Petri. Laisser pénétrer la goutte sous hotte sans étaler.
8. Laisser incuber au moins 4 heure à 37°C.
9. Strier la moitié de la goutte sur un milieu 2YT sélectif (acide nalidixique+marqueur du plasmide). L'acide nalidixique est utilisé pour sélectionner les *B.abortus* et éliminer les *E.coli* S17-1 donneuses qui y sont sensibles.
10. Incuber 3-4 jours à 37°C.

Rem : entre parenthèses, figure les volumes correspondant au protocole en eppendorf.

Contrôle négatif

Les bactéries donneuses *E. coli* S17-1 sont étalées sur un milieu sélectif contenant de l'acide nalidixique et les *Brucella* (Nal^R) receveuses sont étalées sur un milieu additionné de l'antibiotique auquel résistent les *E. coli* S17-1 donneuses.

Coloration (de) Gram

Le concepteur éponyme de cette technique a découvert un moyen de distinguer les bactéries pourvues d'une paroi muréique importante et d'une simple membrane plasmique ou celle pourvue de deux membranes circonscrivant une mince paroi muréique. Le procédé est basé sur la capacité d'une bactérie à retenir le bleu de gentiane après sa précipitation, cas des bactéries à paroi épaisse. La safranine, quant à elle, n'est employée que pour visualiser en rouge les bactéries réfractaires au bleu de gentiane. Dès lors, une bactérie rouge est dite Gram négatif, une bactérie bleue Gram positif.

Protocole

1. Sur une lame de verre, mettre une goutte d'eau.
2. Toucher une colonie avec un cure-dents stérile et la déposer sur l'eau.
3. Sécher à la flamme.
4. Fixer les bactéries en ajoutant de l'alcool (Vel, Leuven, Belgium) et passer à la flamme.
5. Ajouter le bleu de gentiane (Merck, Darmstadt, Germany) sur la lame et attendre 1 minute.
6. Ajouter le lugol (Merck, Darmstadt, Germany) pour précipiter le bleu de gentiane et attendre 1 minute.
7. Rincer à l'alcool.

8. Rincer à l'eau.
9. Ajouter la safranine (Merck, Darmstadt, Germany) et attendre 1 minute.
10. Sécher la lame en tapotant avec un papier absorbant.

Techniques relatives à l'utilisation de levures

Test d'interaction protéique en double-hybride

Principe du double-hybride en levure

En guise de rappel, le principe du double-hybride en levure (Fig.39a) se base sur l'observation suivante : un facteur de transcription fonctionnel consiste en deux domaines séparables, un domaine de liaison à l'ADN (BD, binding domain) et un domaine de transactivation (AD, activating domain). Dans le système double-hybride, ces deux domaines sont physiquement séparés et sont chacun fusionnés à une protéine d'intérêt (X et Y, respectivement). L'interaction physique entre BD-X et AD-Y peut reconstituer dans l'espace une structure protéique semblable à un facteur de transcription d'un gène rapporteur, lequel est soumis à une régulation grâce aux sites de liaison à l'ADN de BD placé en amont. Nous utilisons les BD et AD du facteur de transcription Gal4p de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'expression de BD-X et AD-Y est sous le contrôle d'un variant relativement faible du promoteur *ADH1*. Trois gènes rapporteurs, *GAL1::HIS3*, *GAL1::lacZ* et *SPAL10::URA3*, sont intégrés dans le génome des souches de levure utilisées (MaV103 et MaV203) (Fig.39b). Ils contiennent des sites de liaison pour Gal4p dans leurs promoteurs. En général, une interaction en double-hybride est jugée positive quand l'expression d'au moins deux gènes rapporteurs est activée et quand le candidat positif en double-hybride est négatif lors d'un test d'auto-activation (c'est-à-dire de simple-hybride). La réalisation d'un test double-hybride nécessite la construction d'une protéine hybride « appât » codant le produit de la fusion traductionnelle entre le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (BD) et l'ORF d'intérêt X (ici : PdhS ou DivK), ainsi que la construction en parallèle d'une protéine hybride « proie » codant le domaine d'activation de Gal4 (AD) fusionnée elle-même à l'ORF d'intérêt Y (ici : l'ORFéome). Ces plasmides sont transformés dans deux souches de levures haploïdes de type conjugatif différent possédant les gènes rapporteurs sous le contrôle du promoteur cible du BD. Ces deux plasmides sont porteurs de marqueurs d'auxotrophie différents pour permettre la sélection des transformants sur un milieu sélectif. Le croisement nécessaire à l'obtention de diploïdes possédant les deux vecteurs d'intérêt se fait par « spotting ». Il suffit de déposer une goutte (spot) de la première souche et ensuite, lorsque celle-ci est sèche, de déposer par-dessus une goutte de la seconde souche. La présence des deux plasmides dans une seule souche est sélectionnée chez une levure, grâce à sa capacité à croître sur un milieu nécessitant l'expression des marqueurs d'auxotrophie des deux plasmides.

Contrôles du double-hybride en levure

Les six contrôles utilisés sont les suivants :

- 1 : vecteurs AD & DB sans insert (contrôle négatif)
- 2 : exprime une interaction relativement faible (entre DB-Rb et AD-E2F)
- 3 : exprime une interaction relativement forte (entre DB-Fos et AD-Jun)
- 4 : Gal4p complet + vecteur AD sans insert

- 5 : exprime une interaction relativement forte (entre DB-DP et AD-E2F)
- 6 : contrôle pour le test au Cycloheximide (non réalisé dans cette étude)

Transformation de levures par choc thermique

1. Lancer une préculture de MaV103 ou MaV203 en Falcon dans 10 ml de YPD (ou milieu sélectif). Laisser incuber overnight à 30°C.
 2. Lancer la culture dans 1L de YPD en diluant la préculture pour obtenir une DO^{600} de 0,1. Formule : $(D.O. finale_{culture} * Vol final_{culture}) / D.O. initiale_{préculture} = Vol à inoculer$
Incuber à 30°C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une D.O. comprise entre 0,5 et 0,6.
 3. Effectuer 2 lavages à l'eau stérile avec $1/10^{ème}$ du volume de culture (100 ml).
 4. Effectuer 1 lavage au TE(1X)/LiAc(1X) avec $1/10^{ème}$ du volume de culture.
(10 ml TE10X+10 ml LiAc10X+80 ml H₂O stérile).
 5. Resuspendre le culot dans du TE/LiAc pour concentrer les cellules 200X soit 5 ml.
- Rem : toutes les centrifugations pour les lavages se font pendant 10 minutes à 3500 rpm et à 4°C.

Pour chaque transformation, dans un tube Eppendorf stérile, déposer :

- 1 µg d'ADN (5-10 µl)
 - 25 µl d'ADN carrier=sperme de saumon (10 µg/µl) préalablement dénaturé pendant 5 minutes dans de l'eau bouillante et déposé sur glace.
 - 50 µl de levures.
 - 300 µl PEG4000 40%/TE/LiAc.
6. Vortexer et incuber pendant 30' à 1h30 à 30°C.
 7. Incuber ensuite 20' à 42°C.
 8. Centrifuger 1' à 10000 rpm.
 9. Resuspendre le culot dans 200 µl d'eau stérile.
 10. Etaler sur milieu sélectif et incuber à 30°C pendant 2-3 jours.

Test β-Galactosidase^(Walhout and Vidal, 2001)

1. « Spotter » les levures sur un filtre de phosphocellulose déposé sur boîte YPD.
2. Incuber sur la nuit à 30°C.
3. Pour chaque plaque, placer deux filtres de papier Whatman dans une boîte de Petri vide.
4. Verser ~ 200 mL d'azote liquide dans un seau à glace, placer sous hotte.
5. Transférer la solution β-gal dans les boîtes de Petri contenant les papiers Whatman ; s'assurer que tout le papier soit imprégné et enlever les bulles d'air en soulevant les papiers à l'aide d'une pince à épiler.
6. Avec une pince à épiler, saisir le filtre de nitrocellulose qui porte les levures, et le congeler pendant 10 secondes dans l'azote liquide.
7. Placer délicatement le filtre sur le papier Whatman et enlever rapidement les bulles d'air.
8. Incuber à 37°C ; observer régulièrement, et prendre des photos si nécessaire.
9. Incuber toute la nuit à température ambiante, et observer le résultat. Différentes intensités de bleu indiquent différents niveaux d'activation du gène *LacZ*.

Techniques relatives aux protéines

Analyse de l'expression d'une protéine par Western blot

Préparation des échantillons pour *Brucella*

1. La veille, lancer une préculture dans 5 ml de 2YT à une DO^{600} de 0,05.
2. Incuber une nuit à 37°C sous agitation.
3. Inactiver les bactéries 1 heures à 80°C.
4. Centrifuger les cultures 15 minutes à 3000 rpm afin de culotter les cellules.
5. Resuspendre dans 5 ml de PBS1X et mesurer la DO^{600} .
6. Centrifuger les échantillons et ajouter au culot un volume de PBS1X de telle sorte qu'il soient ajustés à une DO^{600} de 6.
7. Ajouter à ce volume un tampon de chargement protéique à base de bleu de bromophénol dont le stock est concentré 5x.
Rem : on veillera à ce que le volume à charger dans les puits soit identique de sorte à assurer une migration équivalente dans toutes les pistes.
8. Faire bouillir les échantillons 10 minutes avant de les charger dans les puits du gel afin de dénaturer les protéines avec le SDS.
9. Enfin, les échantillons sont chargés sur le gel ainsi que le marqueur de poids moléculaire (Low/High Range, Biorad). Ce dernier nous permettra de déterminer par comparaison la gamme de taille des protéines détectées.

La technique du Western blot

Le western blot permet de détecter spécifiquement une protéine grâce à la reconnaissance cognitive via un anticorps. Cette méthode combinant l'électrophorèse en gel de polyacrylamide et la spécificité des anticorps comporte trois étapes :

- La séparation d'un mélange de protéines par une électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes en présence de SDS (SDS-PAGE).
- L'électrotransfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose.
- La détection immunologique de la protéine d'intérêt à l'aide d'anticorps spécifiques c'est-à-dire le Western blot à proprement dit.

Electrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium ou « SDS-PAGE » est une technique de séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire. La séparation se fait dans un réseau tridimensionnel formé par la polymérisation des chaînes de polyacrylamide. Les gels de polyacrylamide sont le résultat de la polymérisation de monomères d'acrylamide. La réaction est initiée par le persulfate d'ammonium (APS) et catalysées par du TEMED (tétraméthylidamide). Suivant les pourcentages d'acrylamide et de bisacrylamide choisis, on peut adapter la taille des pores du gel à la taille des protéines à séparer.

Le β -mercaptoéthanol permet la rupture des ponts disulfures, créant des chaînes polypeptidiques complètement dénaturées. Le SDS, détergent anionique déroule les structures

protéiques et se fixe stoechiométriquement à leurs chaînes, leur conférant une charge négative égale par unité de masse. Dans un champ électrique, les protéines sont donc séparées en fonction de leur poids moléculaire uniquement. Les petites protéines auront moins de difficultés à traverser le réseau de polyacrylamide que les grosses. Elles migreront donc plus rapidement et plus loin (figure 40).

Le gel de polyacrylamide est constitué de deux parties : le stacking gel ou gel de tassement qui a pour rôle de concentrer les protéines avant la séparation, et le running gel ou gel de séparation.

Migration

L'appareil est fixé sur 30-40 mA et le voltage peut varier jusqu'à un maximum de 300 Volts. La durée de migration est fonction du pourcentage du gel.

Transfert sur membrane de nitrocellulose

Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est un transfert de type semi-sec dans du tampon Towbin. Une différence de potentiel est appliquée entre le gel de polyacrylamide et une membrane de nitrocellulose permettant aux protéines chargées négativement d'être transférées sur la membrane de nitrocellulose, formant ainsi une réplique du gel (figure 41).

- **Protocole :**

1. Découper une membrane de nitrocellulose ainsi que 6 papiers Whatman aux dimensions du gel.
2. Les papiers Whatman sont humidifiés dans le tampon de transfert (Towbin).
3. L'ensemble du montage est placé dans l'appareil de transfert (Biorad).
4. Afin que le transfert des protéines soit optimal, l'ampérage doit être égal à 3 mA par cm² de membrane de nitrocellulose. Le voltage peut varier entre 10 V et 14 V.
5. La durée du transfert varie quant à elle entre 30 minutes et deux heures, en fonction de la taille des protéines à faire transférer (la vitesse de transfert des protéines dépend de leur poids moléculaire : plus le poids moléculaire est élevé, plus le transfert sera lent).

Immunodétection

Cette étape se base sur une technique de révélation dite indirecte où un anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt reconnaît son épitope et s'y fixe. Un anticorps secondaire, couplé à la peroxydase (une enzyme qui catalyse une réaction produisant de la lumière), reconnaissant l'anticorps primaire permet de détecter indirectement la protéine d'intérêt (figure 42).

- **Etape de saturation**

Avant de mettre la membrane de nitrocellulose en présence de l'anticorps primaire, une étape préliminaire consiste à saturer les sites non spécifiques de la membrane pour éviter un bruit de fond important lors de la révélation. Pour cela, la membrane est incubée pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation dans une solution de saturation (PBS1X-lait 5%). Cette étape peut aussi se faire à 4°C pendant une nuit.

La membrane est lavée trois fois dix minutes avec du PBS-Tween 0, 05%.

- **Incubation avec l'anticorps primaire**

Par la suite, une réaction de compétition permettra un déplacement des protéines du lait, fixées de manière non spécifiques, en faveur des anticorps primaires dirigés spécifiquement contre un épitope. La membrane de nitrocellulose est déposée dans une solution de PBS-lait 5% contenant l'anticorps spécifique de la protéine d'intérêt à la dilution adéquate, pendant

une heure sous agitation. Après, la solution contenant les anticorps est récupérée et conservée à -20°C. La membrane est alors lavée cinq fois avec du PBS1X-Tween 0,05% pendant trois minutes.

- **Incubation avec l'anticorps secondaire**

L'anticorps secondaire est dirigé contre le domaine F(c) de l'anticorps primaire. Il est conjugué à la peroxydase, enzyme permettant l'émission de lumière par l'oxydation d'un substrat peracide (le luminol) en un composé oxydé. L'émission de lumière est amplifiée par la présence d'agents chimiques comme les phénols.

L'anticorps secondaire utilisé Horse Radish Peroxidase (DAKO) est une IgG de chèvre anti-IgG de souris ou de lapin.

La membrane est mise en présence de l'anticorps secondaire à la dilution recommandée par le fabricant (10000X) dans du PBS - lait 5 % sous agitation pendant une heure.

La membrane est lavée trois fois avec du PBS - Tween 0, 05% pendant dix minutes.

- **Révélation**

La technique de détection utilise les réactifs ECL

1. La membrane est recouverte de solution de révélation ECL pendant une minute.
2. La solution de détection et la membrane sont recouvertes d'un film plastique (type SaranWrap), et est placée dans une cassette de révélation. Un film autoradiographique est alors exposé pendant différents temps en fonction de l'intensité du signal obtenu.

Techniques relative à la microscopie

Appareillage

Le microscope employé est un Nikon Eclipse E1000 (objectif 100X, plan Apo) et la caméra permettant la prise de micrographies est une Hamamatsu ORCA-ER. L'huile d'immersion de type DF utilisée, nous est fournie par la société Cargille et a un indice de réfraction (n_D) de 1,5150 +/- 0,0002.

Préparation d'échantillons pour la microscopie

Agarose pad :

1. Préparer une solution de PBS 1X et d'Agarose 1% dans un erlen.
2. Chauffer au microonde afin de dissoudre l'agarose.
3. Déposer 700 µl sur une lame de microscope et recouvrir ensuite d'une seconde lame.
4. Laisser solidifier puis mettre les agarose pads dans une chambre humide pour empêcher qu'ils sèchent.

Lorsque les agarose pads sont prêts :

1. Détacher doucement les deux lames.
2. Déposer 1 µl de culture à DO^{600} adéquate (en pleine phase exponentielle).
3. Recouvrir d'une lame porte objet.
4. Découper, à l'aide d'un scalpel, l'agarose non recouvert par la lame porte objet.
5. Sceller le tout avec une solution de VALAP.

Molécules fluorescentes

Nom	λ excitation en nm	λ émission en nm	Révélation
CFP	440 (violet)	480 (cyan)	Protéine, chimérique ou non
GFP/EGFP	475 (bleu)	509 (vert)	Protéine, chimérique ou non
YFP	480 (bleu)	535 (jaune)	Protéine, chimérique ou non

Bibliographie

- Aderem, A. (2003). Phagocytosis and the inflammatory response. *J Infect Dis* **187** Suppl 2, S340-5.
- Allardet-Servent, A., Bourg, G., Ramuz, M., Pages, M., Bellis, M. & Roizes, G. (1988). DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. *J Bacteriol* **170**, 4603-7.
- Ausmees, N. & Jacobs-Wagner, C. (2003). Spatial and temporal control of differentiation and cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *Annu Rev Microbiol* **57**, 225-47.
- Barnett, M. J., Hung, D. Y., Reisenauer, A., Shapiro, L. & Long, S. R. (2001). A homolog of the CtrA cell cycle regulator is present and essential in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **183**, 3204-10.
- Bellefontaine, A. F., Pierreux, C. E., Mertens, P., Vandenhoute, J., Letesson, J. J. & De Bolle, X. (2002). Plasticity of a transcriptional regulation network among alpha-proteobacteria is supported by the identification of CtrA targets in *Brucella abortus*. *Mol Microbiol* **43**, 945-60.
- Bohin, J. P. (2000). Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **186**, 11-9.
- Boschiroli, M. L., Foulongne, V. & O'Callaghan, D. (2001). Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* **4**, 58-64.
- Boschiroli, M. L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Allardet-Servent, A., Cazevieille, C., Lavigne, J. P., Liautard, J. P., Ramuz, M. & O'Callaghan, D. (2002). Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet Microbiol* **90**, 341-8.
- Brandon, L. D., Goehring, N., Janakiraman, A., Yan, A. W., Wu, T., Beckwith, J. & Goldberg, M. B. (2003). IcsA, a polarly localized autotransporter with an atypical signal peptide, uses the Sec apparatus for secretion, although the Sec apparatus is circumferentially distributed. *Mol Microbiol* **50**, 45-60.
- Briones, G., Inon de Iannino, N., Roset, M., Vigliocco, A., Paulo, P. S. & Ugalde, R. A. (2001). *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect Immun* **69**, 4528-35.
- Celli, J. (2006). Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res Microbiol* **157**, 93-8.
- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D. M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. & Gorvel, J. P. (2003). *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* **198**, 545-56.
- Chen, J. C., Hottes, A. K., McAdams, H. H., McGrath, P. T., Viollier, P. H. & Shapiro, L. (2006). Cytokinesis signals truncation of the PodJ polarity factor by a cell cycle-regulated protease. *Embo J* **25**, 377-86.
- Dermine, J. F., Duclos, S., Garin, J., St-Louis, F., Rea, S., Parton, R. G. & Desjardins, M. (2001). Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J Biol Chem* **276**, 18507-12.
- Domian, I. J., Reisenauer, A. & Shapiro, L. (1999). Feedback control of a master bacterial cell-cycle regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6648-53.
- England, J. C. & Gober, J. W. (2001). Cell cycle control of cell morphogenesis in *Caulobacter*. *Curr Opin Microbiol* **4**, 674-80.
- Erridge, C., Bennett-Guerrero, E. & Poxton, I. R. (2002). Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect* **4**, 837-51.
- Evinger, M. & Agabian, N. (1977). Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. *J Bacteriol* **132**, 294-301.

- Fretin, D., Fauconnier, A., Kohler, S., Halling, S., Leonard, S., Nijskens, C., Ferooz, J., Lestrade, P., Delrue, R. M., Danese, I., Vandenhaute, J., Tibor, A., DeBolle, X. & Letesson, J. J. (2005). The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell Microbiol* **7**, 687-98.
- Gibson, K. E., Campbell, G. R., Lloret, J. & Walker, G. C. (2006). CbrA Is a Stationary-Phase Regulator of Cell Surface Physiology and Legume Symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **188**, 4508-21.
- Gober, J. W. & Marques, M. V. (1995). Regulation of cellular differentiation in *Caulobacter crescentus*. *Microbiol Rev* **59**, 31-47.
- Goldberg, M. B., Barzu, O., Parsot, C. & Sansonetti, P. J. (1993). Unipolar localization and ATPase activity of IcsA, a *Shigella flexneri* protein involved in intracellular movement. *J Bacteriol* **175**, 2189-96.
- Gonin, M., Quardokus, E. M., O'Donnol, D., Maddock, J. & Brun, Y. V. (2000). Regulation of stalk elongation by phosphate in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **182**, 337-47.
- Grunenfelder, B., Rummel, G., Vohradsky, J., Roder, D., Langen, H. & Jenal, U. (2001). Proteomic analysis of the bacterial cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4681-6.
- Hallez, R., Bellefontaine, A. F., Letesson, J. J. & De Bolle, X. (2004). Morphological and functional asymmetry in alpha-proteobacteria. *Trends Microbiol* **12**, 361-5.
- Hecht, G. B., Lane, T., Ohta, N., Sommer, J. M. & Newton, A. (1995). An essential single domain response regulator required for normal cell division and differentiation in *Caulobacter crescentus*. *Embo J* **14**, 3915-24.
- Hinz, A. J., Larson, D. E., Smith, C. S. & Brun, Y. V. (2003). The *Caulobacter crescentus* polar organelle development protein PodJ is differentially localized and is required for polar targeting of the PleC development regulator. *Mol Microbiol* **47**, 929-41.
- Huitema, E., Pritchard, S., Matteson, D., Radhakrishnan, S. K. & Viollier, P. H. (2006). Bacterial birth scar proteins mark future flagellum assembly site. *Cell* **124**, 1025-37.
- Hung, D. Y. & Shapiro, L. (2002). A signal transduction protein cues proteolytic events critical to *Caulobacter* cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13160-5.
- Ireland, M. M., Karty, J. A., Quardokus, E. M., Reilly, J. P. & Brun, Y. V. (2002). Proteomic analysis of the *Caulobacter crescentus* stalk indicates competence for nutrient uptake. *Mol Microbiol* **45**, 1029-41.
- Jacobs, C., Ausmees, N., Cordwell, S. J., Shapiro, L. & Laub, M. T. (2003). Functions of the CckA histidine kinase in *Caulobacter* cell cycle control. *Mol Microbiol* **47**, 1279-90.
- Jacobs, C., Domian, I. J., Maddock, J. R. & Shapiro, L. (1999). Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. *Cell* **97**, 111-20.
- Jacobs, C., Hung, D. & Shapiro, L. (2001). Dynamic localization of a cytoplasmic signal transduction response regulator controls morphogenesis during the *Caulobacter* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4095-100.
- Jahans, K. L., Foster, G. & Broughton, E. S. (1997). The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet Microbiol* **57**, 373-82.
- Jay P. Sanford, David N. Gilbert, Robert C. Moellering Jr. & Sande, M. A. The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy 1997 (Antimicrobial Therapy Inc., Vienna, Virginia 22182 US, 1997).
- Jenal, U. & Fuchs, T. (1998). An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *Embo J* **17**, 5658-69.
- Jumas-Bilak, E., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., O'Callaghan, D. & Ramuz, M. (1998). Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Mol Microbiol* **27**, 99-106.

- Khorchid, A. & Ikura, M. (2006). Bacterial histidine kinase as signal sensor and transducer. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 307-12.
- Kocks, C., Hellio, R., Gounon, P., Ohayon, H. & Cossart, P. (1993). Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly. *J Cell Sci* **105 (Pt 3)**, 699-710.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., 2nd & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175-6.
- Kumar, R. B. & Das, A. (2002). Polar location and functional domains of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer protein VirD4. *Mol Microbiol* **43**, 1523-32.
- Lam, H., Matroule, J. Y. & Jacobs-Wagner, C. (2003). The asymmetric spatial distribution of bacterial signal transduction proteins coordinates cell cycle events. *Dev Cell* **5**, 149-59.
- Lam, H., Schofield, W. B. & Jacobs-Wagner, C. (2006). A landmark protein essential for establishing and perpetuating the polarity of a bacterial cell. *Cell* **124**, 1011-23.
- Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E. & Gorvel, J. P. (2005). *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol* **8**, 60-6.
- Laub, M. T., Chen, S. L., Shapiro, L. & McAdams, H. H. (2002). Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4632-7.
- Lawler, M. L. & Brun, Y. V. (2006). A molecular beacon defines bacterial cell asymmetry. *Cell* **124**, 891-3.
- Margolin, W. (2000). Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 531-48.
- Matroule, J. Y., Lam, H., Burnette, D. T. & Jacobs-Wagner, C. (2004). Cytokinesis monitoring during development; rapid pole-to-pole shuttling of a signaling protein by localized kinase and phosphatase in *Caulobacter*. *Cell* **118**, 579-90.
- McAdams, H. H., Srinivasan, B. & Arkin, A. P. (2004). The evolution of genetic regulatory systems in bacteria. *Nat Rev Genet* **5**, 169-78.
- Moreno, E. (1998). Genome evolution within the alpha Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? *FEMS Microbiol Rev* **22**, 255-75.
- Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M. & Mayer, H. (1990). *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.
- Nhieu, G. T. & Sansonetti, P. J. (1999). Mechanism of *Shigella* entry into epithelial cells. *Curr Opin Microbiol* **2**, 51-5.
- Nierman, W. C., Feldblyum, T. V., Laub, M. T., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Alley, M. R., Ohta, N., Maddock, J. R., Potocka, I., Nelson, W. C., Newton, A., Stephens, C., Phadke, N. D., Ely, B., DeBoy, R. T., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Gwinn, M. L., Haft, D. H., Kolonay, J. F., Smit, J., Craven, M. B., Khouri, H., Shetty, J., Berry, K., Utterback, T., Tran, K., Wolf, A., Vamathevan, J., Ermolaeva, M., White, O., Salzberg, S. L., Venter, J. C., Shapiro, L., Fraser, C. M. & Eisen, J. (2001). Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4136-41.
- Ohta, N., Lane, T., Ninfa, E. G., Sommer, J. M. & Newton, A. (1992). A histidine protein kinase homologue required for regulation of bacterial cell division and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10297-301.

- Ohta, N. & Newton, A. (2003). The core dimerization domains of histidine kinases contain recognition specificity for the cognate response regulator. *J Bacteriol* **185**, 4424-31.
- Oke, V. & Long, S. R. (1999). Bacteroid formation in the Rhizobium-legume symbiosis. *Curr Opin Microbiol* **2**, 641-6.
- Quimet, M. C. & Marczynski, G. T. (2000). Analysis of a cell-cycle promoter bound by a response regulator. *J Mol Biol* **302**, 761-75.
- Pierce, D. L., O'Donnol, D. S., Allen, R. C., Javens, J. W., Quardokus, E. M. & Brun, Y. V. (2006). Mutations in DivL and CckA rescue a divJ null mutant of *Caulobacter crescentus* by reducing the activity of CtrA. *J Bacteriol* **188**, 2473-82.
- Pizarro-Cerda, J., Meresse, S., Parton, R. G., van der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goni, I., Moreno, E. & Gorvel, J. P. (1998). *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* **66**, 5711-24.
- Poindexter, J. S. (1981). The caulobacters: ubiquitous unusual bacteria. *Microbiol Rev* **45**, 123-79.
- Porte, F., Liautard, J. P. & Kohler, S. (1999). Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun* **67**, 4041-7.
- Quon, K. C., Marczynski, G. T. & Shapiro, L. (1996). Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* **84**, 83-93.
- Quon, K. C., Yang, B., Domian, I. J., Shapiro, L. & Marczynski, G. T. (1998). Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 120-5.
- Reisenauer, A., Quon, K. & Shapiro, L. (1999). The CtrA response regulator mediates temporal control of gene expression during the *Caulobacter* cell cycle. *J Bacteriol* **181**, 2430-9.
- Robertson, G. T., Reisenauer, A., Wright, R., Jensen, R. B., Jensen, A., Shapiro, L. & Roop, R. M., 2nd. (2000). The *Brucella abortus* CcrM DNA methyltransferase is essential for viability, and its overexpression attenuates intracellular replication in murine macrophages. *J Bacteriol* **182**, 3482-9.
- Ryan, K. R., Huntwork, S. & Shapiro, L. (2004). Recruitment of a cytoplasmic response regulator to the cell pole is linked to its cell cycle-regulated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7415-20.
- Ryan, K. R., Judd, E. M. & Shapiro, L. (2002). The CtrA response regulator essential for *Caulobacter crescentus* cell-cycle progression requires a bipartite degradation signal for temporally controlled proteolysis. *J Mol Biol* **324**, 443-55.
- Sciochetti, S. A., Lane, T., Ohta, N. & Newton, A. (2002). Protein sequences and cellular factors required for polar localization of a histidine kinase in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **184**, 6037-49.
- Sciochetti, S. A., Ohta, N. & Newton, A. (2005). The role of polar localization in the function of an essential *Caulobacter crescentus* tyrosine kinase. *Mol Microbiol* **56**, 1467-80.
- Scott, M. E., Dossani, Z. Y. & Sandkvist, M. (2001). Directed polar secretion of protease from single cells of *Vibrio cholerae* via the type II secretion pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13978-83.
- Siam, R. & Marczynski, G. T. (2000). Cell cycle regulator phosphorylation stimulates two distinct modes of binding at a chromosome replication origin. *Embo J* **19**, 1138-47.
- Skerker, J. M. & Laub, M. T. (2004). Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Nat Rev Microbiol* **2**, 325-37.
- Stephens, C. (2004). Prokaryotic development: a new player on the cell cycle circuit. *Curr Biol* **14**, R505-7.

- Van Mullem, V., Wery, M., De Bolle, X. & Vandenhaute, J. (2003). Construction of a set of *Saccharomyces cerevisiae* vectors designed for recombinational cloning. *Yeast* **20**, 739-46.
- Viollier, P. H., Sternheim, N. & Shapiro, L. (2002). A dynamically localized histidine kinase controls the asymmetric distribution of polar pili proteins. *Embo J* **21**, 4420-8.
- Viollier, P. H., Sternheim, N. & Shapiro, L. (2002). Identification of a localization factor for the polar positioning of bacterial structural and regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13831-6.
- Walhout, A. J. & Vidal, M. (2001). High-throughput yeast two-hybrid assays for large-scale protein interaction mapping. *Methods* **24**, 297-306.
- Watarai, M., Makino, S., Fujii, Y., Okamoto, K. & Shirahata, T. (2002). Modulation of Brucella-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol* **4**, 341-55.
- Wheeler, R. T. & Shapiro, L. (1999). Differential localization of two histidine kinases controlling bacterial cell differentiation. *Mol Cell* **4**, 683-94.
- Wolf, E., Kim, P. S. & Berger, B. (1997). MultiCoil: a program for predicting two- and three-stranded coiled coils. *Protein Sci* **6**, 1179-89.
- Wu, J., Ohta, N. & Newton, A. (1998). An essential, multicomponent signal transduction pathway required for cell cycle regulation in *Caulobacter*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1443-8.
- Wu, J., Ohta, N., Zhao, J. L. & Newton, A. (1999). A novel bacterial tyrosine kinase essential for cell division and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13068-73.