



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Contribution à l'étude du Quorum sensing chez *Brucella melitensis*: synthèse et dégradation des phéromones

Rolain, Thomas

Award date:
2006

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



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

Faculté des sciences

**Contribution à l'étude du Quorum Sensing chez *Brucella melitensis* :
synthèse et dégradation des phéromones**

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

Thomas ROLAIN
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>

Contribution à l'étude du Quorum Sensing chez *Brucella melitensis* : synthèse et dégradation des phéromones.

ROLAIN Thomas

Résumé

L'image d'organisme isolé et autonome que l'on se fait d'une bactérie s'avère être de plus en plus sujet à controverse. En effet, il apparaît que les bactéries sont capables de communiquer entre elles via diverses molécules signal qu'elles produisent et qui diffusent dans le milieu. Ces molécules signal s'accumulent au fur et à mesure que la densité cellulaire augmente. Elles sont capables de réguler l'expression de gènes en se fixant sur des régulateurs transcriptionnels modifiant ainsi leur activité. Les acyles homosérines lactones (AHL's) sont des molécules signal spécifiques des bactéries Gram négatives et sont produites par une enzyme appelée AHL synthétase. Depuis quelques années, il a été mis en évidence que certaines espèces bactériennes étaient également capables de dégrader les AHL's. Deux types d'enzymes sont responsables de cette activité de dégradation : les AHL lactonases et les AHL acylases.

Brucella melitensis, est une bactérie Gram négative pathogène, responsable d'une fièvre ondulante aussi appelée «fièvre de Malte». Au laboratoire, deux types d'AHL's ont été détectées dans le milieu de culture de *Brucella*. Cependant, jusqu'à présent, aucune AHL synthétase classique n'a été découverte. Il a été démontré que la protéine ACP (acyl carrier protein), donneuses de chaînes acyles, interagit avec l'AHL synthétase lors du processus de synthèse des AHL's. Dès lors, nous avons réalisé un test double-hybride utilisant les deux ACP's de *Brucella* comme «appâts» dans le but d'identifier les AHL synthétases de cette bactérie. Les candidats obtenus suite à ce crible double hybride seront vérifiés ultérieurement.

A l'opposé de la recherche d'une AHL synthétase, nous nous sommes intéressés aux processus de dégradation des AHL's chez *Brucella*. En effet, suite à des recherches d'homologies de séquences protéiques avec d'autres bactéries, une AHL acylase a été découverte chez *B. melitensis*. Lors de ce mémoire, nous avons caractérisé cette enzyme en déterminant sa spécificité de substrat, son taux de production ainsi que la taille des sous-unités qui la composent.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2006

Promoteur: Prof. J.-J. Letesson

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier le professeur Jean-Jacques Letesson. D'une part, pour m'avoir permis de réaliser mon mémoire dans son laboratoire et d'autre part pour son implication tout le long de mémoire et ses nombreux encouragements. Je me souviens encore de mon premier TP de microbiologie durant lequel vous m'aviez montré démonstration à l'appui qu'il valait mieux annoter les boîtes de pétri du côté agar (Mais pourquoi avez-vous interverti mes couvercles ??). Qui sait, cet événement fut peut-être un des précurseurs de mon engagement sous les drapeaux de l'URBM... ?

Je ne remercierais probablement jamais assez mes deux tuteurs, Julien et Sophie ou Sophie et Julien (voilà, comme ça il n'y a pas de jaloux) pour m'avoir encadré avec tant de zèle durant toute la durée de ce mémoire. Merci pour votre grande patience et votre gentillesse à tout les deux. Tous les moments passés avec vous resteront probablement gravés à jamais, tant mieux, ce furent de bons moments.

Je ne peux évidemment pas omettre de mentionner mes «collègues». Un grand merci à vous tous : Matthieu, Lionel, Blandine et Delphine. Durant ce mémoire, nous avons passé ensemble des moments très agréables et souvent très délirants. Une ambiance incroyable, inoubliable tout simplement. Merci aussi à tous les autres membres du laboratoire : Le professeur Xavier De Bolle pour ses explications, sa présence et sa gentillesse, à Marie «Quorum Sensing» pour ses encouragements et son aide lors de la correction de ce mémoire, à Yohann et à petite Marie (maman levure) pour leurs explications plus que nécessaire lors de mes débuts avec le double hybride.

Un tout grand merci également à Nico, Richard, Gégé, Christian, Alex, Ben, Monique et Monique, Allan et Maxime.

Je ne remercierais probablement jamais assez mes parents, mon frère ainsi que le reste de ma famille pour les encouragements qu'ils m'ont donnés tout le long de ces quatre années qui ne furent pas de tout repos (et oui il faut bien l'avouer).

Merci d'avance à vous les membres du jury, pour l'attention et le temps que vous allez consacrer à la lecture de ce mémoire.

Table des matières

A) Introduction :	2
1) Avant-propos :	2
2) Quorum Sensing ou communication bactérienne :	2
2.1 Définition :	2
2.2 Quelques exemples de Quorum Sensing :	3
2.3 Principe et éléments propres au système de Quorum Sensing :	4
2.3.1 Principe de base :	4
2.3.2 Les différents systèmes de communication :	4
2.3.2.1 Dialogue intra-espèces (AI-1) :	4
A) Chez les Gram positives :	4
B) Chez les Gram négatives :	5
2.3.2.2 Dialogue inter-espèces (AI-2) :	5
2.3.2.3 Dialogue inter-règnes (AI-3) :	6
2.3.3 Rôle de certains éléments intracellulaires dans la communication bactérienne :	6
A) Petits ARNs interférents :	6
B) Petites molécules signal intracellulaires :	7
3) Le Quorum Sensing chez les bactéries Gram négatives :	8
3.1 Les acyles-homosérines lactones (AHL's) :	8
3.2 Les synthétases d'AHL's :	9
3.2.1 Classification :	9
3.2.2 Mécanisme général de la synthèse des AHL's :	9
3.2.3 Synthétases appartenants à la famille LuxI :	10
3.2.4 AHL synthétases appartenants à la famille LuxM et AinS :	10
3.2.4.1 LuxM :	10
3.2.4.2 AinS :	10
3.2.5 La synthétase putative HdtS :	11
3.3 Les régulateurs transcriptionnels du Quorum Sensing:	11
4) Le Quorum Quenching :	12
4.1 Stratégies d'interférence dépendantes de l'action enzymatique :	12
4.1.1 Les AHL lactonases :	12
4.1.2 L'AHL acylase :	13
4.2 Stratégies d'interférence indépendantes de l'action enzymatique :	13
5) Les biosenseurs :	14
5.1. Définition d'un biosenseur.....	14
5.2. Les biosenseurs d'AHL's : principe.....	14
6) Le genre <i>Brucella</i> et la brucellose :	15
6.1 Généralités :	15
6.2 Historique :	15
6.3 Caractéristiques microbiologiques et génétiques :	15
6.4 La brucellose :	15
6.5 Les mécanismes d'infection de <i>Brucella</i> :	16
7) <i>Brucella melitensis</i> et le Quorum Sensing :	17
7.1 Les AHL's :	17
7.2 La synthetase :	17
7.3 Les régulateurs du Quorum Sensing :	17
B) Objectifs du mémoire	19
C) Résultats :	21
1) Caractérisation de l'AHL acylase putative de <i>Brucella melitensis</i> :	21

1.1	<i>Brucella melitensis</i> possède-t-elle une AHL acylase ?	22
1.1.1	Utilisation des plasmides pBBR mcs1- <i>aiiD</i> _{melitensis} et <i>aiiD</i> _{suis} :	22
1.1.2	Analyse de la dégradation d'AHL's par les AHL acylases putatives de <i>B. melitensis</i> et de <i>B. suis</i> :	23
1.1.2.1	La longueur de la chaîne acyle influence-t-elle l'éventuelle activité AHL acylase ?	23
1.1.2.2	La substitution de la chaîne acyle influence-t-elle l'éventuelle activité AHL acylase ?	25
1.2	Analyse de la production de l'AHL acylase chez <i>Brucella melitensis</i> :	25
1.2.1	Construction et intégration du plasmide pSK- <i>aiiD</i> -eGFP dans le génome de <i>Brucella melitensis</i> :	26
1.2.2	Analyse de la production de l'acylase chez <i>Brucella melitensis</i> :	27
1.3	Test de sécrétion de l'acylase putative de <i>Brucella melitensis</i> :	28
1.3.1	Construction du plasmide pBBR mcs1- <i>aiiD</i> _{melitensis} -13myc :	28
1.3.2	Construction de <i>B. melitensis</i> pBBR mcs1- <i>aiiD</i> -13myc :	29
1.3.3	Analyse de la sécrétion de l'AHL acylase chez <i>Brucella melitensis</i> :	29
1.4	Détermination de la taille de l'AHL acylase putative de <i>Brucella melitensis</i> :	29
1.4.1	Construction des plasmides pBBR mcs1-Lumio™- <i>aiiD</i> et pBBR mcs1- <i>aiiD</i> -Lumio™ :	30
1.4.2	Analyse du nombre et de la taille des sous-unités composant l'AHL acylase :..	30
1.5	<i>aiiD</i> de <i>Brucella melitensis</i> : AHL acylase ou pénicilline acylase ?	31
1.5.2	Analyse de la nature de l'AHL acylase de <i>Brucella melitensis</i> :	32
1.6	Analyse de l'activité du promoteur de l'AHL acylase de <i>Brucella melitensis</i> :	33
1.6.1	Construction du plasmide pJD27 <i>PaiiD</i> :	33
1.6.2	Construction de <i>B. melitensis</i> pJD27- <i>PaiiD</i> :	34
2)	Recherche de la synthétase d'AHL de <i>Brucella melitensis</i> :	37
2.1	Principe du Double-Hybride et ORFéome de <i>Brucella melitensis</i> :	37
2.1.1	Principe du Double Hybride :	37
2.1.2	ORFéome de <i>Brucella melitensis</i> et pool d'ORF's :	38
2.2	Double-Hybride appliqué à la recherche de l'AHL synthétase de <i>Brucella melitensis</i> :	39
2.2.1	AHL synthétase et acyle carrier protéine chez <i>Brucella melitensis</i> :	39
2.2.2	Obtention des vecteurs «appâts» pVV212-BMEI111 et pVV212-BMEI1475 ainsi que les vecteurs «proies» pVV213-ORFéome :	40
2.2.3	Transformation des levures MAV103 par les plasmides pVV212-BMEI111 et pVV212-BMEI1475 ainsi que les levures MAV203 par pVV213-ORFéome :	41
2.2.4	Crible Double-Hybride :	41
2.3	Analyse des résultats :	42
D)	Conclusions et perspectives:	46
1)	Caractérisation de l'AHL acylase putative de <i>B. melitensis</i> :	46
1.1	Analyse de l'activité de dégradation de l'AHL acylase putative de <i>Brucella melitensis</i> :	46
1.2	Analyse de la production de l'AHL acylase de <i>Brucella melitensis</i> :	47
1.3	Analyse de la sécrétion de l'AHL acylase de <i>Brucella melitensis</i> :	47
1.4	Caractérisation de la taille de l'acylase :	47
1.5	<i>aiiD</i> de <i>B. melitensis</i> : AHL acylase ou pénicilline acylase :	48
1.6	Analyse de l'activité du promoteur de l'AHL acylase de <i>B. melitensis</i> :	48
1.7	Conclusions générales :	49
1.8	Perspectives :	49
2)	Recherche de la synthétase d'AHL's de <i>B. melitensis</i> :	50

2.1 Avantages et inconvénients d'une approche double hybride :	50
2.2 Analyse des résultats obtenus par double hybride :	50
2.3 Perspectives :	51
E) Matériel et méthodes	54
1). Matériel	54
1.1 Solutions et milieux	54
1.1.1 Solutions d'antibiotiques et autres	54
1.1.2 Milieux de culture	54
1.1.3 Solutions d'acides aminés	55
1.2) Souches et plasmides	55
2). Méthodes	55
2.1) Techniques relatives à l'ADN	55
2.1.2 Extraction d'ADN plasmidique	55
2.1.3 Restriction d'ADN plasmidique purifié	55
2.1.3.1 Restriction diagnostique	55
2.1.3.2 Restriction préparative	56
2.1.6 Electrophorèse en gel d'agarose	56
2.1.7 Extraction d'ADN d'un gel d'agarose	56
2.1.8 Réaction de ligation	56
2.1.9 Test blanc-bleu ou α -complémentation	57
2.1.10 Clonage Gateway™	57
2.1.11 Polymerase Chain Reaction (PCR)	58
2.2) La conjugaison bactérienne	58
2.3) Transformation	59
2.4) Techniques relatives aux protéines : analyse de l'expression d'une protéine par Western Blot	60
2.5) Techniques relatives aux protéines : analyse sur gel de polyacrylamide de protéines fusionnée au tag Lumio™ :	62
2.6) Méthodes de détection de la dégradation de N-acyl homosérine lactones	62
2.7) Technique double hybride levure	63
2.8) Pool d'ORF's de <i>Brucella</i>	63
2.9) Crible double hybride en levure visant à trouver les partenaires des 2 ACP's de <i>Brucella melitensis</i> dénommées : BMEI1111 et BMEI1475	64
F) Bibliographie	68

ABRÉVIATIONS COURANTES

3AT : 1, 2, 4-triaminotriazole

aa : acide aminé

AD (Activation Domain) : domaine de transactivation du facteur de transcription Gal4p

C-terminal : extrémité carboxy-terminale

D. O. : densité optique

DB (DNA Binding) : domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4p

N-terminal : extrémité amino-terminale

dNTPs : déoxynucléosides triphosphates

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

ORF : open reading frame, phase ouverte de lecture : portion de séquence d'ADN qui débute au codon d'initiation (ATG, méthionine) et finit au codon « Stop ».

pb : paires de bases

PCR : polymerase chain reaction, réaction en chaîne de la polymérase

PEG : polyéthylèneglycol

rpm : rotations par minute

β -Gal : β -galactosidase

TE : Tris-EDTA

X-Gal : 5-bromo 4-chloro 3-indoyl, β -D-galactopyranoside

2YT : 2 X yeast extract

ACP : acyl carrier protein

AHL : acyle homosérine lactone

AI : auto-inducteur

bla : β -lactamase

cat : chloremphénilcol-acétyltransférase

cml : chloremphénilcol

kan : kanamycine

IPTG : isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

LB : Lucia Bertani

MOI : multiplicity of infection

nal : acide nalidixique

QS : quorum sensing

RLU : Relative Light Unit

Rpm : Rotation par minute

SAM : S-adénosyl méthionine

Tet : tétracycline

MCI : minimal inhibitory concentration

TCA : tris acide acétique EDTA

TAE : acide trichloroacétique

UAS : upstream activating sequence

P.M. : poids moléculaire

INTRODUCTION

A) Introduction :

1) *Avant-propos* :

Bien souvent, lorsque l'on nous parle de microorganismes comme les bactéries, la première image qui nous vient à l'esprit est celle d'une cellule isolée et autonome. Il est intéressant de se rendre compte que cette représentation tombe de nos jours de plus en plus en désuétude. Il a en effet été démontré que les bactéries peuvent se regrouper pour former ce que l'on appelle des «communautés bactériennes», lesquelles ne manquent pas alors de nous faire penser à un organisme multicellulaire. Cette capacité de regroupement qu'ont acquis les bactéries leur a permis de réaliser des tâches qui auraient été impossibles si elles avaient été entreprises individuellement. Quoiqu'il en soit, il n'est pas possible de concevoir que ces organismes unicellulaires puissent se regrouper les uns avec les autres et élaborer des stratégies communes sans utiliser un système de communication approprié. On en est peu à peu venu à désigner ce langage bactérien par le terme «Quorum Sensing» (QS), système reposant sur la synthèse, la diffusion et la détection de petites molécules chimiques.

2) *Quorum Sensing ou communication bactérienne* :

2.1 Définition :

Le QS est un système qui permet aux bactéries de communiquer entre-elles mais également d'obtenir des informations sur leur densité de population dans l'environnement (Fuqua *et al.*, 1994). Les bactéries sont capables de produire des molécules chimiques, diffusibles à travers leurs membranes. Ces molécules sont appelées phéromones ou autoinducteurs (AI) et leur concentration est directement corrélée à la densité cellulaire. En effet, ces phéromones s'accumulent dans le milieu environnant au fur et à mesure que le nombre de bactéries qui les produisent augmente. Ces dernières sont également capables de «sentir» le taux d'autoinducteurs dans l'environnement, ce qui leur fournit des renseignements quant au nombre de leurs congénères présents dans le milieu et qui leur permet donc de «réagir» en conséquence via une modification de l'expression génique. Le terme «Quorum Sensing» fait donc référence à la capacité de «percevoir» quand une densité de population minimale, ou quorum est atteinte.

Plusieurs critiques ont néanmoins été émises à l'encontre d'un tel modèle notamment par Rosemary J. Redfield (Redfield, 2002). Elles s'adressent notamment aux mécanismes d'évolution sous-tendant le phénomène de QS. L'évolution ne pouvant selon certains évolutionnistes n'agir que sur des cellules isolées et non pas sur un groupe cellulaire, dès lors condamné à disparaître faute de pression de sélection suffisante. Comment en effet ne pas imaginer une cellule utilisant les signaux de ses consœurs sans elle-même en produire, évitant ainsi un coût énergétique important (que représente la synthèse de molécules) ? Cette bactérie «tricheuse» bénéficierait de cette manière d'un avantage certain sur ses congénères. Rosemary J. Redfield tente par ailleurs d'apporter une nouvelle vision du Quorum Sensing, elle-même

préférant le terme de «Diffusion Sensing». En effet, l'augmentation du taux d'autoinducteurs dans l'environnement ne peut pas être automatiquement corrélée à une densité cellulaire élevée. Il suffit d'imaginer une situation dans laquelle la bactérie serait confinée dans un milieu où le phénomène de diffusion et de flux de particules serait limité. Dans un tel environnement, seules quelques bactéries suffiraient à saturer le milieu en autoinducteurs de par leur propre production (Figure 1).

2.2 Quelques exemples de Quorum Sensing :

- L'exemple le plus connu car étant le premier système de communication bactérienne mis en évidence, est celui de la production de lumière par une bactérie marine *Vibrio fischeri*. Cette bactérie vit dans un milieu aquatique marin où elle est non luminescente mais peut également établir une relation symbiotique avec certaines espèces de calamars (dont *Euprymna scolopes*) en s'installant dans les organes lumineux de ces derniers. Là, *V. fischeri* a accès à une source de nutriments ce qui lui permet de proliférer rapidement. Une fois un certain seuil de densité de population atteint, les bactéries produisent de la lumière. Les calamars utilisent cette lumière pour effrayer leurs prédateurs ou attirer leurs proies. Il semblerait également que cette émission de lumière permette aux calamars de mimer la lumière émise par la lune, empêchant ainsi les prédateurs de les repérer grâce à leur ombre (Whitehead *et al.*, 2001).
- La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste, responsable de maladies nosocomiales. Cette bactérie infecte souvent les personnes souffrant de tuberculose, de brûlures sévères ou encore immunodéprimées. *P. aeruginosa* utilise le QS pour neutraliser les mécanismes de défense de son hôte. En effet, une production de facteurs de virulence par un faible nombre de bactéries mène à une réponse de défense efficace de la part de l'hôte qui est alors capable de neutraliser les pathogènes. Cependant, l'expression coordonnée des gènes de virulence par une population bactérienne ayant atteint une certaine densité permet à *P. aeruginosa* de ne sécréter des facteurs de virulence qu'à partir du moment où ils seront en quantité suffisante pour surpasser les mécanismes de défense de l'hôte. Ces facteurs de virulence altèrent de cette façon l'équilibre qui s'est établi entre les défenses de l'hôte et les toxines bactériennes menant ainsi à l'invasion des vaisseaux sanguins et à la dissémination du pathogène dans l'organisme hôte en entier (Van Delden and Iglewski, 1998).
- Un autre exemple de QS peut être illustré par les *Streptococcus gordonii* et *Veillonella atypica* qui colonisent la plaque dentaire. On sait que la colonisation de la cavité buccale par *V. atypica* ne peut avoir lieu que si *S. gordonii* est présente au préalable. En effet, cette dernière relâche de l'acide lactique qui est la principale source de carbone de *V. atypica*. Il a par ailleurs été démontré que *V. atypica* produit une molécule chimique diffusible induisant l'expression des gènes codants pour les enzymes impliquées dans la production de l'acide lactique chez *S. gordonii* (Keller and Surette, 2006).

2.3 Principe et éléments propres au système de Quorum Sensing :

2.3.1 Principe de base :

Bien que l'on soupçonne l'existence d'un très grand nombre de systèmes apparentés au QS, jusqu'à ce jour seuls trois ont été découverts et définis en fonction de la nature des phéromones produites. Le premier système de communication est basé sur la libération d'autoinducteurs 1 (AI-1) qui peuvent être soit des oligopeptides chez les bactéries Gram positives (Dunny and Leonard, 1997), soit des acyles homosérines lactones (AHL) chez les bactéries Gram négatives (Eberhard *et al.*, 1981). Le second système est quant à lui basé sur la libération d'autoinducteurs 2 (AI-2) identifiés comme étant des furanosyl borate diesters (Schauder *et al.*, 2001). Jusqu'à présent, le dogme établi par les scientifiques veut que l'on parle préférentiellement d'AI-1 dans le cas de communication entre bactéries d'une même espèce, d'AI-2 pour les cas de communication entre bactéries d'espèces différentes et d'AI-3 pour le dialogue entre procaryotes et eucaryotes (Sperandio *et al.*, 2003). Toutefois, de plus en plus il apparaît que les signaux de type AI-1 émis par une espèce peuvent être détectés par d'autres espèces bactériennes, ce qui met à mal la classification énoncée ci-dessus (Keller and Surette, 2006). Quoiqu'il en soit, et bien qu'ils présentent chacun des différences au niveau de leurs composants, ces trois modes de communication bactérienne sont basés sur le même principe de fonctionnement. On pourrait résumer ce principe comme ceci : les bactéries produisent une molécule chimique diffusible qui s'accumule dans le milieu, mais aussi dans l'espace intracellulaire de la bactérie et y modifie l'expression de certains gènes cibles par l'intermédiaire de régulateurs transcriptionnels spécifiques.

2.3.2 Les différents systèmes de communication :

2.3.2.1 Dialogue intra-espèces (AI-1) :

A) Chez les Gram positives :

Comme signalé plus haut, le QS chez les bactéries Gram positives est basé sur l'émission active et la perception d'oligopeptides de tailles très variables (Figure 2). Les oligopeptides sont sécrétés via des ABC transporteurs (ATP binding cassette), la membrane cellulaire étant par nature imperméable à ceux-ci. Lorsqu'une concentration critique en oligopeptides est atteinte dans le milieu, ces derniers vont alors se fixer sur le domaine d'un senseur appartenant à un système à deux composants qui va déclencher via son domaine histidine kinase cytoplasmique une cascade de transduction du signal aboutissant à la phosphorylation d'un régulateur spécifique. Ce dernier change ainsi de conformation et peut alors aller se fixer sur l'ADN où il va réguler l'expression de gènes cibles (Figure 3).

Le Quorum Sensing basé sur l'émission de peptides est crucial pour plusieurs bactéries Gram positives car il permet de réguler de nombreux processus physiologiques. Par exemple, *Bacillus subtilis* et *Streptococcus pneumoniae* utilisent des peptides pour réguler la compétence bactérienne tandis que *Enterococcus faecalis* et les Staphylocoques utilisent ce système de QS basé sur l'émission de peptides pour réguler des gènes impliqués dans la virulence (Camara *et al.*, 2002).

B) Chez les Gram négatives :

Ces bactéries communiquent en émettant des signaux appelés acyles homosérines lactones (AHL's). Ce système de dialogue a été observé pour la première fois chez *V. fisheri* (Nealson, 1977) et est basé sur deux protéines cruciales pour le phénomène de Quorum Sensing. (Figure 4). La première, LuxI, est une enzyme responsable de la synthèse des AHL's et la seconde, LuxR, un régulateur transcriptionnel qui possède un domaine de liaison aux AHL's et un autre à l'ADN (hélix-turn-hélix). Les AHL's produites par l'AHL synthétase diffusent à travers la membrane et lorsqu'elles atteignent un certain seuil de concentration, se lient aux régulateur transcriptionnel LuxR. Grâce à des changements conformationnels, les complexes ainsi formés vont pouvoir se fixer sur les promoteurs des gènes cibles et ainsi réguler leur transcription. Cela se traduit entre autres chez *V. fisheri* par une augmentation de la luminescence, le complexe LuxR-AHL se fixant au niveau du promoteur des gènes responsables de la production de lumière, gènes qui sont regroupés dans l'opéron *luxCDABEGH*.

Il a part ailleurs été démontré que les AHL's avaient un rôle stabilisateur au niveau des protéines LuxR et qu'en leur absence, ces dernières avaient tendance à être dégradées plus rapidement (Zhu and Winans, 1999).

2.3.2.2 Dialogue inter-espèces (AI-2) :

La communication de type AI-2 permet un dialogue entre des bactéries d'espèces différentes, qu'elles soient Gram positives ou Gram négatives. La phéromone utilisée dans ce type de communication est une furanosyl borate diester (Chen *et al.*, 2002) (Figure 5) et a été caractérisée la première fois chez *Vibrio harveyi*. Cette bactérie possède deux systèmes de Quorum Sensing, basés respectivement sur les AI-1 et les AI-2. Chaque système synthétise et détecte une phéromone pour contrôler la production de lumière.

Chez *V. harveyi*, c'est l'enzyme LuxS qui est responsable de la synthèse des AI-2. Ensuite, selon le principe de QS habituel, les molécules signal de type AI-2 vont s'accumuler dans le milieu jusqu'à atteindre une concentration seuil à partir de laquelle elles seront détectées par le senseur LuxP du système à deux composants LuxPQ.

A faible densité de population et donc en absence de molécules signal, il y a une autophosphorylation du senseur LuxP, ce qui déclenche une cascade de phosphorylation dans laquelle on retrouve LuxU et LuxO en tant qu'intermédiaires. Ce dernier étant phosphorylé va en conjonction avec un facteur σ_{54} activer la transcription de petits ARN de régulation. Ils déstabilisent le messenger encodant pour la protéine LuxR qui dès lors n'est plus en mesure d'activer la transcription des gènes situés dans l'opéron *luxCDABEGH*, ce qui entraîne une diminution de la production de lumière (Figure 6).

A haute densité de population et donc en présence d'un grand nombre de molécules signal, LuxQ reconnaît les AI-2 complexées à un récepteur périplasmique appelé LuxP et va perdre son activité kinase au profit d'une activité phosphatase. Cela va entraîner la déphosphorylation de LuxU et de LuxO qui deviendront inactifs et ne pourront plus activer la transcription des petits ARNs de régulation. L'ARNm codant pour la protéine LuxR ne sera alors plus déstabilisé, ce qui permettra dès lors l'activation de la transcription de l'opéron *luxCDABEGH*.

2.3.2.3 Dialogue inter-règnes (AI-3) :

On savait déjà que les cellules eucaryotes pouvaient communiquer entre-elles par l'intermédiaire d'hormones endocrines telles que les hormones stéroïdiennes, les hormones polypeptidiques. Toutefois, il a été démontré récemment qu'elles étaient également capables d'établir des interactions avec des bactéries et cela en passant par un système de QS. L'équipe de Sperandio est la première à avoir démontré l'existence de ce nouveau type de communication basé sur une ou des molécules actuellement non identifiée(s), mais considérée(s) jusqu'à présent comme étant une hormone et dénommée AI-3. (Sperandio *et al.*, 2003)

Les exemples d'interactions entre des cellules eucaryotes et des bactéries par l'intermédiaire d'autoinducteurs sont nombreux. On peut citer celui de la 3-oxo-N-dodécanoyl-L-homosérine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL) de *Pseudomonas aeruginosa* qui possède une activité vasodilatatrice et qui peut stimuler la réponse inflammatoire et moduler l'activité immunitaire chez les mammifères (Smith *et al.*, 2002), (Telford *et al.*, 1998). Les cellules eucaryotes animales ne sont pas les seules à pouvoir interagir avec les bactéries via un système de QS. En effet, lorsque l'on expose les racines de la plante *Medicago truncatula* à des doses physiologiques d'AHL's, il s'ensuit une augmentation du taux de certaines protéines. Les AHL's agissent sur les mécanismes de défense, de réponse au stress, de régulation transcriptionnelle mais aussi de réponses aux hormones végétales.

Il est cependant réducteur de penser que ces interactions ne se font que dans un sens. En effet, les cellules eucaryotes sont elles-mêmes capables de produire des signaux interférant avec le QS des bactéries. Cela leur permet notamment d'établir des relations symbiotiques avec des procaryotes ou encore d'empêcher une prolifération bactérienne qui pourrait s'avérer dangereuse. On peut citer comme exemple le cas de *P. aeruginosa* dont les AHL's sont dégradées par une enzyme sécrétée par l'épithélium pulmonaire des individus infectés (Dong and Zhang, 2005). Les stratégies d'interférences seront détaillées ultérieurement.

2.3.3 Rôle de certains éléments intracellulaires dans la communication bactérienne :

A) Petits ARNs interférents :

On sait maintenant que de petits ARNs interviennent dans le QS de *V. harveyi* et de *P. fluorescens* (Kay *et al.*, 2006). Ces ARNs sont indispensables au bon fonctionnement du système de communication et permettent de diminuer l'expression de certains gènes régulateurs comme *luxR* chez *V. harveyi*.

L'équipe d'Elizabeth Kay a décrit de manière précise la contribution de ces ARNs dans le système de QS de *V. harveyi* et de *P. fluorescens*. Il a été démontré qu'à faible densité cellulaire et donc en absence de signal, les trois senseurs kinases de *V. harveyi* (LuxN, LuxQ et CqsS) s'autophosphorylent puis transmettent leur résidu phosphate le long d'une cascade de phosphorylation contenant les intermédiaires LuxU puis LuxO (Kay *et al.*, 2006).

Ce dernier n'est rien d'autre qu'un facteur de transcription qui, en association avec un facteur sigma appelé σ_{54} (RpoN), active l'ARN polymérase qui va permettre la transcription de gènes appelés Qrr (quorum regulatory RNA) et codants pour de petits ARNs. Ces petits ARNs Qrr sont capables avec l'aide de la protéine Hfq de s'hybrider aux transcrits de LuxR et de les déstabiliser. Ce faisant, ils contrôlent donc négativement l'expression du régulateur LuxR, qui n'est donc plus à même d'aller se fixer sur les régions promotrices des gènes codants pour la bioluminescence chez *V. harveyi* (Figure 7A).

Par contre, lorsque la population de *Vibrio harveyi* atteint une certaine densité et que les signaux de QS s'accumulent dans le milieu extracellulaire, il s'ensuit une déphosphorylation des senseurs LuxN, LuxQ et CqsS mais aussi des intermédiaires LuxU et LuxO composant la cascade de phosphorylation. De ce fait, les petits ARNs Qrr ne sont plus transcrits et ne peuvent plus interférer avec la traduction des ARNm de *luxR* qui peuvent donc être traduits librement et ainsi activer l'expression des gènes codants pour la bioluminescence (Figure 7B).

B) Petites molécules signal intracellulaires :

Le décodage par la bactérie de signaux extracellulaires nécessite dans certains cas une transduction du signal à travers la membrane cellulaire. En ce qui concerne les signaux dépendants du Quorum Sensing, ceux-ci peuvent directement diffuser à travers la membrane ou encore en se fixer à des récepteurs membranaires et ainsi déclencher une cascade de phosphorylation aboutissant à une cascade de messagers secondaires intracellulaires.

Il existe une multitude de messagers secondaires chez les bactéries, les plus connus étant l'adénosine 3, 5' monophosphate (cAMP) ou encore la guanosine-3, 5-bis (pyrophosphate) (ppGpp) (Camilli and Bassler, 2006). Ces deux messagers secondaires ont comme point commun qu'ils peuvent tout les deux réguler l'expression de gènes : l'AMPc en agissant comme régulateur allostérique sur des facteurs de transcription et les ppGpp en altérant l'activité de l'ARN polymérase à laquelle ils se lient (Reiness *et al.*, 1975).

Récemment, un autre messager intracellulaire a attiré la curiosité des scientifiques. Il s'agit de l'acide cyclique 3,5' diguanylique (cdiGMP). Ce composé est synthétisé par la diguanylate cyclase et dégradé par la phosphodiesterase A, toutes deux étant des protéines membranaires sensibles à des stimuli environnementaux tels que l'oxygène moléculaire, les électrons ou encore les photons. Des recherches récentes (Camilli and Bassler, 2006) ont indiquées qu'il était impliqué au niveau de différents senseurs extracellulaires mais aussi dans la régulation de nombreux processus cellulaires dépendant du Quorum Sensing. Ce messager est donc capable de réguler l'expression de certains gènes et cela bien que l'on ne connaisse pas encore son mécanisme d'action avec précision (Figure 8).

Le cdiGMP est impliqué dans la synthèse de cellulose, formée par de nombreuses bactéries. Il intervient de cette manière dans la formation des biofilms chez certaines bactéries. Les biofilms sont des structures abritant une communauté bactérienne, leur permettant ainsi de vivre en équilibre avec leur environnement et de s'organiser pour exploiter les ressources disponibles. Dans le cas de bactéries pathogènes, ils leur offrent une protection face au système immunitaire de l'hôte, mais aussi aux substances bactéricides comme les antibiotiques (Sutherland, 2001). La matrice extracellulaire constitue la partie la plus

importante des biofilms et est essentiellement composée d'exopolysaccharides, mais aussi de nombreux polymères formés à partir de protéines, lipides et acides nucléiques.

3) Le Quorum Sensing chez les bactéries Gram négatives :

Le Quorum Sensing chez les bactéries Gram négatives a été découvert en 1970 par J. W. Hastings et ses collaborateurs chez *V. fisheri*. Comme il a déjà été dit plus tôt dans ce mémoire, le phénomène QS est basé sur l'émission et la détection d'acyles homosérines lactones (AHL's). Etant donné que ce travail aborde l'étude du QS chez la bactérie Gram négative *Brucella melitensis* 16M pour laquelle des AHL's ont été détectées dans le milieu extracellulaire (Taminiau *et al.*, 2002), nous n'allons plus détailler par la suite que le système de communication spécifique aux AHL's.

3.1 Les acyles-homosérines lactones (AHL's) :

Les AHL's sont des molécules composées d'un anneau homosérine lactone (HSL) et d'une chaîne acyle dont la taille est comprise entre 4 et 18 carbones. Il existe donc différents types de chaînes acyles dont la spécificité dépend de différents facteurs tels que : (i) la longueur de la chaîne, (ii) le fait qu'elle soit saturée ou insaturée, (iii) la présence de substitutions sur le troisième atome de carbone (Figure 9). Ces substitutions consistent généralement au greffage d'un groupement hydroxyle (CH-OH) ou carbonyle (C=O) que l'on dénomme aussi groupement oxo. La longueur de la chaîne acyle ainsi que les différentes substitutions possibles confèrent aux signaux du Quorum Sensing une spécificité capitale pour leur reconnaissance par un récepteur (Parsek *et al.*, 1999).

Les AHL's sont des molécules chimiques possédant des propriétés amphiphiles grâce à l'hydrophobicité de la chaîne acyle et à la nature hydrophile du groupement HSL. De ce fait, ces molécules sont capables de diffuser à travers les membranes plasmiques des bactéries. Toutefois, il a été mis en évidence chez *P. aeruginosa* qu'un transport actif était nécessaire pour l'exportation des AHL's munies d'une longue chaîne acyle (Pearson *et al.*, 1999).

Il est courant de distinguer deux états d'AHL's : un état actif lorsque l'AHL à toujours un anneau lactone refermé et une chaîne acyle intègre et un état inactif lorsque l'anneau lactone est ouvert ou que la chaîne acyle a été clivée. L'inactivation des molécules signal peut être d'origine diverse. En effet, certaines enzymes sont capables de dégrader les AHL's que ce soit en clivant la chaîne acyle ou l'anneau lactone. Ces enzymes sont produites par certaines espèces bactériennes pour interférer avec le système de QS de leurs compétiteurs ; celles-ci seront détaillées en profondeur dans la section Quorum Quenching (QQ) de ce travail (chapitre 4). Toutefois, certains facteurs environnementaux tels que la température ou le PH permettent eux aussi une inactivation des AHL's en agissant principalement sur leur anneau lactone (Yates *et al.*, 2002).

3.2 Les synthétases d'AHL's :

3.2.1 Classification :

A ce jour, trois familles de synthétases ont été caractérisées sur base d'homologies de séquences protéiques. La première famille est composée de protéines homologues à la synthétase appelée LuxI et découverte chez *V. fischeri* tandis que la seconde est composée de protéines homologues à deux synthétases proches : LuxM et AinS, découvertes respectivement chez *V. harveyi* et *V. fischeri* (Bassler *et al.*, 1993). Il existerait une troisième catégorie de synthétase, homologue à une enzyme dénommée HdtS, mise en évidence quant à elle chez *P. fluorescens* (Laue *et al.*, 2000). L'existence de cette troisième famille reste cependant très controversée.

On sait maintenant qu'une même bactérie peut synthétiser différents types d'AHL's ainsi que dans certains cas de l'AI-2. Un bon exemple pour illustrer cela est la bactérie marine *V. harveyi* connue pour posséder plusieurs systèmes de QS (Kuo *et al.*, 1994). Les différentes familles de synthétases seront détaillées dans les paragraphes suivants.

3.2.2 Mécanisme général de la synthèse des AHL's :

Les AHL's sont produites par une AHL synthétase à partir de S-adénosyl-L-méthionine (SAM) et d'une acyle carrier protéine (acyle-ACP) qui apporte le groupement acyle nécessaire à la formation des AHL's. Le schéma représentant la synthèse des AHL's est présenté à la figure 10. Lors de cette réaction de synthèse, la chaîne acyle est présentée à l'AHL synthétase par l'ACP. L'AHL synthétase va permettre de catalyser la réaction d'acylation qui consiste au greffage du groupement acyle sur la SAM. L'ACP est alors libérée et la réaction de lactonisation qui aboutit à la formation de l'anneau lactone à lieu par l'intermédiaire d'une attaque nucléophile interne à la SAM. C'est cette lactonisation qui entraîne la libération de l'AHL néoformée mais aussi d'autres produits de la réaction comme la 5'-méthylthioadenosine (5'-MTA) (Parsek *et al.*, 1999).

Le mécanisme de synthèse des AHL's est un mécanisme unique en son genre de par le fait que les substrats utilisés adoptent des rôles différents de leurs fonctions cellulaires habituelles. En effet, le substrat SAM agit habituellement dans la cellule comme donneur de méthyles et l'acyle-ACP est quant à elle impliquée dans la voie de biosynthèse des acides gras (Val and Cronan, 1998).

Comme décrit plus haut, les AHL's peuvent différer entres-elles par la longueur de leurs chaînes acyles, la nature de la substitution sur leur troisième carbone ou encore leur degré de saturation. Tous ces facteurs sont fonctions de la spécificité de l'AHL synthétase envers telle ou telle longueur de chaîne acyle, mais aussi de la disponibilité des acyles-ACP disponibles dans l'environnement intracellulaire.

3.2.3 Synthétases appartenants à la famille LuxI :

Découverte chez *V. fisheri*, LuxI a été la première synthétase d'AHL's mise en évidence. Le mécanisme de synthèse des AHL's par LuxI est semblable à celui expliqué dans le paragraphe précédent. Des études réalisées par mutagenèse aléatoires et dirigées ont permis de mettre en évidence les résidus importants dans les interactions entre LuxI et son substrat (Hanzelka *et al.*, 1997) (Figure 11). On peut ainsi définir trois régions distinctes dans la séquence en acides aminés du polypeptide LuxI en fonction de leur rôle dans le processus de synthèse des AHL's. Sur la figure 11, les lettres situées au dessus du diagramme correspondent aux acides aminés conservés à 100% chez les homologues de LuxI tandis que les lettres situées en dessous du diagramme correspondent aux mutations effectuées durant l'étude. La région rouge est considérée comme étant le site actif de l'AHL synthétase. La région orange qui contient beaucoup moins de résidus conservés serait quant à elle importante pour la conformation du site actif. Enfin, on suppose que la région jaune est la région impliquée dans la fixation du substrat (Hanzelka *et al.*, 1997).

Plusieurs modèles sont actuellement proposés pour expliquer l'ordre dans lequel les interactions entre l'AHL synthétase, l'ACP et la SAM ont lieu. Le premier propose que LuxI se fixe en premier lieu sur l'ACP apportant le groupement acyle et qu'ensuite la SAM vienne se fixer au complexe enzyme-ACP (Hanzelka *et al.*, 1997). Le second modèle, actuellement favorisé propose que l'interaction se fasse d'abord entre l'enzyme et la SAM et ensuite avec l'ACP (Figure 12) (Parsek *et al.*, 1999).

3.2.4 AHL synthétases appartenants à la famille LuxM et AinS :

3.2.4.1 LuxM :

Cette seconde famille d' AHL synthétase a été caractérisée chez deux espèces du genre *Vibrio* : LuxM chez *V. harveyi* et AinS chez *V. fisheri*. Bien que provenant d'organismes différents, ces synthétases ont été classées dans la même famille car elles possèdent 34% d'identité de séquences. (Gilson *et al.*, 1995).

V. harveyi est une bactérie marine bien connue pour sa bioluminescence due au phénomène de Quorum Sensing. La régulation de l'opéron *luxCDABEGH* fait intervenir trois types de signaux qui fonctionnent en parallèle (Henke and Bassler, 2004). Le premier signal est une AHL : la N-(3-hydroxybutanoyl)-L-homosérine lactone (3-hydroxy-C₄-HSL). Le second signal est une AI-2 caractérisée comme étant une 3A-méthyl-5,6-dihydro-furo (2,3-D) dioxaborole-2,2,6,6A-tetraol. Quoiqu'il en soit, la production de 3-hydroxy-C₄-HSL chez *V. harveyi* dépend bel et bien d'une AHL synthétase de type LuxM, puisqu'un mutant pour celle-ci ne produit plus d'AHL's.

3.2.4.2 AinS :

V. fisheri est capable de produire plusieurs types d'autoinducteurs. Chez cette bactérie, la production de 3-oxo-L-hexanoyl-L-HSL (3-oxo-C₆-HSL) est dirigée par LuxI alors que celle de la N-(3-oxooctanoyl)-L-homosérine lactone (C₈-HSL) est dirigée par une synthétase

appelée AinS (Kuo *et al.*, 1994). AinS n'a pas d'homologies de séquences avec les synthétases de la famille LuxI, mais bien avec LuxM de *V. harveyi*.

AinS, tout comme LuxI, produit son AHL à partir de l'anneau lactone apporté par la SAM et de la chaîne acyle apportée par l'ACP (plus précisément une octanoyl-ACP). Des études ont toutefois montrés que la chaîne acyle pouvait également être amenée par un acyle-CoA (octanoyl-CoA) (Hanzelka *et al.*, 1999). Cette caractéristique diffère des AHL synthétases de type LuxI qui n'utilisent que l'acyle-ACP comme source de chaîne acyle.

3.2.5 La synthétase putative HdtS :

La synthétase HdtS a été découverte chez *P. fluorescens* F113 par l'équipe de Laue (Laue *et al.*, 2000) et a été définie comme produisant trois types d'AHL's : la 3-hydroxy-C₁₄-HSL ; la C₁₀-HSL et la C₆-HSL. Cette enzyme ne possédant pas d'homologies de séquences avec LuxI ou LuxM-AinS peut constituer une nouvelle famille de synthétase. Cependant, Il n'a jamais été démontré que les homologues d'HdtS chez d'autres bactéries pouvaient synthétiser des AHL's.

3.3 Les régulateurs transcriptionnels du Quorum Sensing:

Tout comme pour les synthétases d'AHL's, on classe les régulateurs transcriptionnels en familles suivant les homologies de séquences qu'ils ont entre eux. Le premier régulateur du Quorum Sensing a été découvert chez *V. fisheri* et est appelé LuxR. Il s'agit d'un polypeptide de 250 acides aminés localisé au niveau de la face cytoplasmique de la membrane interne chez *A. tumefaciens*. Ce régulateur est le chef de file d'une famille de régulateurs transcriptionnels partageant entre eux que 18 à 25% d'identité. Trois domaines fonctionnels ont été caractérisés : un domaine N- terminal qui permet la liaison du régulateur avec les AHL's (Hanzelka *et al.*, 1997), un domaine de multimérisation (la majorité des régulateurs agissent sous forme multimérique) (Choi and Greenberg, 1992) et enfin un domaine C-terminal de liaison à l'ADN, indispensable à la régulation transcriptionnelle.

Les régions d'ADN sur lesquelles les homologues de LuxR viennent se placer sont connues sous le nom de «Lux boxes». Elles sont constituées d'une séquence répétée de 20 paires de bases localisées généralement 40 paires de bases en amont des gènes que régulent les homologues de LuxR. La plupart des gènes cibles des régulateurs du QS possèdent une «lux box». Cependant, certains en sont dépourvus.

Il existe plusieurs hypothèses concernant la manière dont les régulateurs de type LuxR sont activés et se fixent sur l'ADN pour réguler l'expression des gènes cibles. La première considère que le régulateur interagit tout d'abord avec son AHL spécifique. Cette liaison entraîne un changement de conformation du régulateur qui lui permet de dimériser et de se fixer sur l'ADN où, avec une ARN polymérase il régule l'expression des gènes. Cette première hypothèse a été vérifiée pour les régulateurs LuxR de *V. fisheri* et TraR d'*A. tumefaciens* mais on sait maintenant qu'elle n'est pas applicable à tous leurs homologues. En effet, une seconde hypothèse soutient que les régulateurs transcriptionnels sont capables de se fixer sur l'ADN sous forme dimérique et cela en absence d'AHL's. Cette liaison du régulateur empêche l'accès de l'ARN polymérase à l'ADN incapable dès lors de transcrire les gènes en

aval. C'est notamment le cas pour CarR et ExpR, régulateurs transcriptionnels d'*Erwinia carotovora* et d'*Erwinia chrysanthemi*.

C'est cette ambiguïté qui mena l'équipe de Qin à poser l'hypothèse selon laquelle il y aurait deux classes de protéines dans la famille LuxR : (i) celles nécessitant la présence d'AHL's pour pouvoir lier l'ADN et agissant le plus souvent comme des activateurs de la transcription, (ii) celles liant l'ADN en absence de molécules signal et dont la liaison aux AHL's provoque par exemple une levée de répression (Qin *et al.*, 2000).

Ces différences au sein d'une même famille de régulateurs permettent donc d'expliquer comment certains homologues de LuxR agissent en tant qu'activateurs de la transcription alors que d'autres agissent en tant que répresseurs.

On distingue deux types de répresseurs qui se différencient de par leur comportement suite à la liaison avec les AHL's : les premiers changent de conformation après avoir lié l'AHL, ce qui déclenche la libération du promoteur et permet donc à la polymérase d'avoir un accès à l'ADN (Qin *et al.*, 2000). Les seconds restent liés à l'ADN en présence d'AHL's, ces dernières provoquant la tétramérisation du régulateur qui se retrouve capable d'induire la transcription des gènes cibles (Welch *et al.*, 2000).

4) Le Quorum Quenching :

Le Quorum Quenching est le terme utilisé pour désigner les stratégies qui peuvent être mises en place par certains procaryotes ou eucaryotes pour perturber les systèmes de communication bactériens. Il est intéressant de constater que ces stratégies d'interférence sont généralement mises en œuvre par des organismes qui n'ont pas la capacité de synthétiser des AHL's.

Il a été prouvé que certains organismes eucaryotes et bactéries pouvaient synthétiser des enzymes capables de dégrader les AHL's. On distingue actuellement deux groupes d'enzymes : les lactonases et les acylases. Toutefois, et bien que la plupart des événements d'inactivation d'AHL's passent par une dégradation enzymatique, le Quorum Quenching ne se résume toutefois pas qu'à cela. En effet, d'autres stratégies d'interférence peuvent perturber le système de Quorum Sensing d'une bactérie mais elles seront détaillées plus en profondeur dans les paragraphes suivants.

4.1 Stratégies d'interférence dépendantes de l'action enzymatique :

4.1.1 Les AHL lactonases :

Le premier gène codant pour une AHL lactonase à été découvert chez une espèce bactérienne Gram positive : *Bacillus subtilis*. Ce gène a été nommé *aiiA* (Dong *et al.*, 2002). Bien que l'on ait découvert la AHL lactonase chez une bactérie Gram positive, il s'est vite avéré que certaines bactéries Gram négatives possèdent des gènes homologues. On a découvert il y a peu que les organismes eucaryotes synthétisent aussi des enzymes de dégradation similaires aux lactonases : les paraoxonases (Chun *et al.*, 2004). Un tableau

reprenant les diverses enzymes de dégradation présentes chez les organismes procaryotes et eucaryotes est illustré à la figure 13.

La AHL lactonase dégrade les AHL's en hydrolysant le lien ester de l'anneau lactone (Dong *et al.*, 2000) (Figure 14). La capacité de clivage de l'enzyme n'est que très peu affectée par la taille ou par la nature de la substitution du troisième carbone de la chaîne acyle.

L'enzyme reconnaît en fait les groupements amides et cétones du premier atome de carbone de la chaîne acyle (Wang *et al.*, 2004).

4.1.2 L'AHL acylase :

Le second groupe d'enzymes capables de dégrader les AHL's est celui des AHL acylases dont le gène est appelé *aiiD*. La première AHL acylase a été découverte chez *Variovorax paradoxus*, une bactérie Gram négative qui ne produit pas d'AHL's ? mais qui se sert de l'AHL acylase pour dégrader les AHL's exogènes et les utiliser comme source d'énergie et d'azote (Leadbetter and Greenberg, 2000). Depuis, d'autres AHL acylases ont été identifiées chez d'autres espèces bactériennes telles que *P. aeruginosa* (Sio *et al.*, 2006) ou *Ralstonia* sp. (Lin *et al.*, 2003). Les AHL acylases dégradent les AHL's en hydrolysant le lien amide situé entre la chaîne acyle et l'anneau lactone (Figure 15). Bien que l'on connaisse encore peu de détails sur l'AHL acylase, l'équipe de Sio a démontré récemment qu'elle était constituée de deux sous-unités. En effet, *aiiD* est transcrit et traduit en un seul polypeptide mais un clivage auto-catalytique survenant post-traductionnellement permet d'obtenir la protéine sous forme active c'est-à-dire constituée d'une petite et d'une grande sous-unité de 18 et 60 kDa respectivement (Sio *et al.*, 2006). Tout comme pour la AHL lactonase ; on retrouve l'AHL acylase chez toutes sortes d'organismes, qu'ils soient procaryotes ou eucaryotes.

4.2 Stratégies d'interférence indépendantes de l'action enzymatique :

Les exemples de stratégies d'interférence indépendantes de l'action d'une acylase ou d'une lactonase sont multiples :

- L'exemple le mieux caractérisé est celui de l'algue *Delisae pulchra* qui produit des molécules appelées furanones, molécules structurellement similaires aux AHL's synthétisées par une bactérie pathogène pour *D. pulchra* : *Serratia liquefaciens* (Givskov *et al.*, 1996) (Figure 16). Ces furanones entrent en compétition avec les AHL's pour se lier aux régulateurs transcriptionnels homologues à LuxR. Une fois liées, elles augmentent le taux de dégradation protéolytique de ces derniers, ce qui a pour effet d'inhiber tout le système de Quorum Sensing du pathogène (Manefield *et al.*, 2002). L'action des furanones a également été observée chez *V. fischeri* où elles permettent de réprimer la bioluminescence. Elles permettent aussi d'inhiber la production de facteurs de virulence et donc la pathogénicité de *P. aeruginosa*.

- La plante *Pisum sativum* est capable de produire des AHL's qui sont similaires à celles produites par certaines bactéries pathogènes. Cela lui permet de modifier le comportement des bactéries et d'éviter une éventuelle infection (Zhang, 2003) (Zhang and Dong, 2004).

Toutes ces stratégies d'interférence permettent à une espèce bactérienne qui serait en compétition pour l'occupation d'une niche écologique précise de prendre l'avantage sur ses congénères ou encore d'empêcher l'infection par un pathogène. Différentes molécules interférentes sont représentées sur la figure 17.

5) Les biosenseurs :

5.1. Définition d'un biosenseur

Un biosenseur est un organisme biologique capable de détecter la présence de molécules d'intérêts. Les biosenseurs sont utilisés dans des domaines très divers. Nous utiliserons dans le cadre de ce mémoire des biosenseurs capables de détecter la présence d'AHL's.

5.2. Les biosenseurs d'AHL's : principe

Les biosenseurs d'AHL's sont des souches bactériennes qui ne produisent pas d'AHL mais qui expriment néanmoins un régulateur transcriptionnel capable de lier les AHL's et d'activer ainsi un promoteur régulant l'expression de gènes rapporteurs dont le phénotype est facilement observable comme la luminescence (figure 18). L'activation de ces rapporteurs ne peut dès lors avoir lieu que lorsque le biosenseur est en présence d'une source exogène d'AHL's.

Au vu de la diversité des AHL's, il a fallu développer des souches de biosenseurs capables de détecter certains types d'AHL's en particulier. Au laboratoire, nous possédons trois souches de senseurs capables de détecter les AHL's et cela quelle que soit la longueur de leur chaîne acyle c'est-à-dire : quatre, huit ou douze atomes de carbones. Cependant, chacune de ces souches possède une spécificité plus importante pour un type particulier d'AHL's : celles à quatre, huit ou douze atomes de carbones. Les senseurs utilisés sont des souches d'*Escherichia coli* contenant un plasmide senseur portant un gène codant pour un régulateur transcriptionnel et son promoteur cible fusionné à un gène rapporteur l'opéron *luxCDABE* de *Photorhabdus luminescens*, codant pour les protéines nécessaires à la production de lumière.

6) Le genre *Brucella* et la brucellose :

6.1 Généralités :

Brucella spp. est un genre bactérien appartenant à la classe des α -protéobactéries. Ce groupe comprend des bactéries ayant pour caractéristique commune une coévolution avec un hôte animal ou végétal que cela soit dans le cadre d'une relation pathogénique (*Brucella* spp., *Agrobacterium tumefaciens*, *Rickettsia* spp., *Bartonella* spp.) ou d'une relation symbiotique (*Sinorhizobium meliloti*) (Celli *et al.*, 2005). *Brucella* est un pathogène intracellulaire de cellules de mammifères. Il se réplique à l'intérieur des cellules de son hôte que celles-ci soient des phagocytes professionnels ou non. Il existe à ce jour huit espèces de *Brucella* nommées d'après leur hôte préférentiel (Figure 19).

6.2 Historique :

C'est en 1887 que le médecin militaire Bruce, alors établi sur l'île de Malte, isole l'agent pathogène responsable d'une fièvre ondulante aussi appelée «fièvre de Malte». On découvre plus tard que la contamination était due à la consommation de lait de chèvre non pasteurisé. Cet agent infectieux a aussi été isolé chez des bovidés par le vétérinaire danois Bang.

6.3 Caractéristiques microbiologiques et génétiques :

Les *Brucellae* sont de petits coccobacilles dont la taille varie de 0,6 et 0,7 μm de diamètre et de 0,6 à 1,5 μm de long. Ce sont des bactéries Gram négatives décrites comme étant asporulées, aérobies strictes, non-mobiles malgré la présence d'un flagelle et ne possédant pas de capsule.

Brucella possède deux chromosomes circulaires : le premier de 1,2 Mb et le second de 2,2 Mb. Il n'y a aucun plasmide, ni échange génétique chez *Brucella* à l'état naturel (O'Callaghan and MacMillan, 2001).

6.4 La brucellose :

Les bactéries du genre *Brucella* provoquent une maladie connue sous le nom de brucellose. Il s'agit d'une zoonose que l'on retrouve à l'échelle mondiale (Figure 20) avec une prévalence plus importante dans les pays méditerranéens ou en voie de développement. Lorsque la brucellose apparaît dans ces régions, elle constitue souvent un problème économique et social très important, l'agriculture et l'élevage étant les ressources économiques principales.

Bien que chaque espèce de *Brucella* infecte un hôte de prédilection, *B. melitensis*, *B. abortus* et *B. suis* infectent également l'homme. Ce dernier s'infecte en ingérant des aliments d'origine animale contaminés comme le lait ou encore par simple contact avec des animaux infectés. Les bactéries entrent en contact avec l'organisme par inhalation d'aérosols ou par l'intermédiaire de lésions cutanées.

Les symptômes de la brucellose sont très atypiques et peuvent se manifester sous forme de fièvres intermittentes, de tremblements, de douleurs articulaires, de dépressions et de sueurs nocturnes (Sauret and Vilissova, 2002). Les conséquences de cette infection sont l'avortement chez les animaux femelles gestantes et des problèmes de stérilité chez les mâles. À ce jour, aucun vaccin n'est disponible pour l'homme et la maladie ne peut être soignée que par un traitement antibiotique lourd à base de doxycycline et de rifampicine. De ce fait, *Brucella* est classée dans les pathogènes de type III.

6.5 Les mécanismes d'infection de *Brucella* :

Une fois que les *Brucellae* ont pénétré dans l'organisme, elles gagnent les voies lymphatiques où elles pénètrent dans les cellules phagocytaires comme les macrophages et les neutrophiles. Les bactéries vont alors rester dans les nœuds lymphatiques drainant le site de l'inoculation. Elles se propagent par la suite dans tout l'organisme par voie sanguine.

Les *Brucellae* sont capables de pénétrer et de survivre à l'intérieur de cellules phagocytaires professionnelles (comme les macrophages) mais aussi dans des cellules phagocytaires non professionnelles (comme les trophoblastes). Cette stratégie lui permet d'éviter les mécanismes de défense de l'hôte basés sur l'immunité humorale.

La bactérie rentre donc dans la cellule phagocytaire et se retrouve ainsi enfermée dans un phagosome qui va fusionner avec un endosome précoce. A ce stade, *Brucella* doit impérativement éviter la voie classique de fusion phago-lysosomiale pour ne pas être détruite. Elle va pour cela détourner le phagosome et le faire interagir avec un organelle portant des marqueurs membranaires semblables à ceux du réticulum endoplasmique. De cette fusion résulte un organelle appelé vacuole de réplication ou brucellosome, contenant la bactérie et constituant un environnement favorable à sa réplication (Figure 21) (Celli and Gorvel, 2004).

On sait que certains facteurs de virulence jouent un rôle important dans le détournement de la voie de dégradation lysosomiale et de plus en plus d'études sont menées dans le but de les caractériser. Il a été montré que *Brucella* exprimait un LPS particulier lui conférant une protection contre l'action du complément tout en lui permettant de faciliter son entrée et sa survie dans les macrophages (Lapaque *et al.*, 2005) (Porte *et al.*, 1999). Il a aussi été prouvé récemment que *Brucella* produisait du β -glucan cyclique, molécule apparemment indispensable pour éviter la fusion lysosomiale (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005).

On pense que l'appareil de sécrétion de type IV encodé par l'opéron *virB* est lui aussi indispensable à la survie intracellulaire et à la réplication de *Brucella* (Delrue *et al.*, 2001). Les appareils de sécrétion de type IV (SSTIV) sont habituellement caractérisés comme étant des complexes multi-protéique permettant de sécréter des macromolécules telles que de l'ADN ou encore des facteurs de virulences dans le cytoplasme de la cellule hôte (Christie and Vogel, 2000).

7) *Brucella melitensis* et le Quorum Sensing :

Comme toute bactérie pathogène, *Brucella* doit être capable de réguler ses facteurs de virulence avec précision pour pouvoir s'établir chez son hôte eucaryotes. Le Quorum Sensing pourrait être un des mécanismes de base de ce processus de régulation.

7.1 Les AHL's :

Une étude menée par Taminiau et al. a permis de détecter la présence d'AHL's dans le milieu de culture de *Brucella* 16M. Il existerait deux types d'AHL's chez *Brucella melitensis* : la première, la C₁₂-AHL a été caractérisée chimiquement par HPLC et spectrométrie de masse alors que une seconde fut caractérisée par TLC comme étant une 3-oxo-C₁₂-HSL (Taminiau *et al.*, 2002).

7.2 La synthetase :

A ce jour, aucun gène codant pour une éventuelle synthétase n'a été détecté chez *Brucella* et ce malgré les diverses stratégies mises en œuvre. Les recherches effectuées par homologies de séquences ont toutefois permis de détecter un homologue à HdtS, synthétase putative de *P. fluorescens* mais des expériences réalisées ultérieurement n'apportèrent pas de confirmations quant à son implication dans la production d'AHL's chez *Brucella*.

7.3 Les régulateurs du Quorum Sensing :

Deux régulateurs transcriptionnels homologues à LuxR chez *Brucella* ont été détectés : Il s'agit de VjbR (Vacuolar Jacking *Brucella* Regulator) et de BabR (*Brucella abortus* regulator). Il a été démontré que VjbR régule l'opéron *virB* qui encode l'appareil de sécrétion de type IV de *Brucella* et le flagelle.

La C₁₂-AHL réprime *virB* et le flagelle (Delrue *et al.*, 2005). Des expériences récentes ont par ailleurs montré que cette répression passe par VjbR (S. Bonnot, données non publiées).

Des résultats issus de puces à ADN ont permis de caractériser plus amplement les régulateurs de *Brucella melitensis*. Il en ressort que BabR régule environ 1% du génome et qu'il a plutôt un rôle de répresseur. Il agit surtout au niveau des protéines de réponse au stress. VjbR régule quant à lui 9% du génome et agit lui aussi comme un répresseur. Il régule l'expression de gènes impliqués notamment dans le métabolisme, les cytochromes et les protéines de surface (S. Bonnot et J. Lemaire, données non publiées).

Objectifs du mémoire

B) Objectifs du mémoire

L'objectif de ce mémoire est de contribuer à l'étude du Quorum Sensing chez *Brucella melitensis* en caractérisant d'une part l'AHL acylase putative prédite dans son génome et en recherchant d'autre part l'enzyme responsable de la synthèse d'AHL's, mise en évidence chez cette bactérie.

L'AHL acylase putative de *Brucella* :

Cette enzyme a été mise en évidence chez *Brucella* suite aux homologues de séquences protéiques qu'elle partage avec l'AHL acylase de *Ralstonia*. Cependant, il s'est avéré que la séquence codant l'AHL acylase putative de *B. melitensis* contenait un codon stop. Dès lors, plusieurs questions se sont posées : l'AHL acylase de *B. melitensis* est-elle fonctionnelle et si oui, possède-t-elle une spécificité de substrat ? Est-elle produite et sécrétée comme chez d'autres espèces par *Brucella* ?

Par ailleurs, des données dans la littérature font référence au fait que les AHL acylases sont composées de deux sous-unités. Sachant que la séquence codant cette enzyme est interrompue par un stop chez *B. melitensis* et se trouve donc sous la forme de deux ORF's distinctes, nous avons déterminé si ce stop délimitait la séparation entre les deux sous-unités.

L'AHL synthétase de *Brucella* :

A ce jour, et bien que des AHL's aient été détectées dans les surnageants de cultures de *Brucella*, aucune AHL synthétase n'a été mise en évidence. Sachant que les AHL synthétases interagissent avec des protéines dénommées ACP (acyl carrier protein), nous avons utilisé une approche double hybride utilisant les deux ACP's de *Brucella* comme appâts lors d'un criblage utilisant 70 pools représentant la totalité des ORF's de *Brucella* afin d'y retrouver l'AHL synthétase.

Résultats

C) Résultats :

1) Caractérisation de l'AHL acylase putative de *Brucella melitensis* :

Le gène *aiiD* de *Brucella melitensis* encode un homologue à une AHL acylase, enzyme capable de dégrader les AHL's. Ce gène bien qu'étant annoté comme pénicilline acylase chez *Brucella* encode une protéine homologue à l'AHL acylase décrite chez *Ralstonia* (Lin *et al.*, 2003) (Figure 1). En effet, les AHL acylases putatives de *B. melitensis* et *B. suis* partagent respectivement 22,8 et 23,2% d'identité avec l'AHL acylase de *Ralstonia*. Il s'avère en outre que la séquence codant pour l'AHL acylase putative de *Brucella melitensis* contient un codon stop et recouvre en fait dans l'annotation du génome de *B. melitensis* deux ORF's (Figure 2). Cette particularité ne se retrouvant pas chez *Ralstonia* ou chez d'autres espèces de *Brucella* telle que *Brucella suis*, plusieurs questions se sont posées : (i) le codon stop a-t-il un effet sur la production de la protéine ainsi que sur sa fonction ? (ii) le ribosome passe-t-il outre ce codon stop ? Pour apporter des éléments de réponses à ces différentes questions, nous avons comparé l'activité de dégradation de l'AHL acylase putative de *B. melitensis* (AiiD_{melitensis}) possédant un codon stop au milieu de sa séquence codante avec celle de l'AHL acylase putative de *B. suis* (AiiD_{suis}), ne possédant pas de codon stop.

AiiDRalato	MMQGFALRGT LAMAALAALAGC R SSTDGR W GL S DTGL S KE I ERTG F GI P	50
AiiDmelita	----- M NV A S A R P AV A R Q I N L Q GL S DT V E I D Y DL W GI P	33
AiiDseuis	----- M NV A S A R P AV A R Q I N L Q GL S DT V E I D Y DL W GI P	33
AiiDRalato	H I E A N D Y A S L E F G M A F A Y A R D N L E L L A D Q V V T Y N E R E R K T F S P F E T V F Y S	100
AiiDmelita	H I Y A H S M D D L F F G N G Y A H A A D R L W Q M D A A R R R A L G R F A A W A G K E A L S S D M	83
AiiDseuis	H I Y A H S M D D L F F G N G Y A H A A D R L W Q M D A A R R R A L G R F A A W A G K E A L S S D M	83
AiiDRalato	F K P I P N L S D A F F K G I F D - E D L R A G Y A Q M S P E A R E L R S Y A G F N F Y K	146
AiiDmelita	L M R R L D L A T V S R A D Y A A L S P E T Q R M C E R Y A Q G V N A W I D S G Q L P A E Y R L L G	131
AiiDseuis	L M R R L D L A T V S R A D Y A A L S P E T Q R M C E R Y A Q G V N A W I D S G Q L P A E Y R L L G	131
AiiDRalato	D T P A N F P A A C R N A A W V F P T L G D M R M G E E K A Q A S A S A M L A G V A A P	186
AiiDmelita	E R P E R W E G W H C V L Y M R Q R G I L M G S L W F K L W R A A A F A R I G P D C L H L L R Y E D	161
AiiDseuis	E R P E R W E G W H C V L Y M R Q R G I L M G S L W F K L W R A A A F A R I G P D C L H L L R Y E D	161
AiiDRalato	P S R T P V A E R E L P P Q A V D F V A L D R E L Q L R D - ----- M P I S S M S W A F G	236
AiiDmelita	S G T E R F V Y P Q E Q S A D R W S I S L E E L R P A I E G L M K L F P H D A T G G G S N W A V D	231
AiiDseuis	S G T E R F V Y P Q E Q S A D R W S I S L E E L R P A I E G L M K L F P H D A T G G G S N W A V D	231
AiiDRalato	A D A F A N R R G V L S N P H F P N T T N R F Y Q V H L T V P G K L D V M G A S I A A F P L V V	266
AiiDmelita	A R H S K T G M P I V A G D P H A Y E I P G M Y A Q I H L T C D - S F D V L G L S V P G V P G F P	261
AiiDseuis	A R H S K T G M P I V A G D P H A Y E I P G M Y A Q I H L T C D - S F D V L G L S V P G V P G F P	261
AiiDRalato	S I G F N K D V A W T H T S T G R R F T L F E L K L A E G D P T T V L V D S T P H R M T T F T V A	336
AiiDmelita	H F A H N E E M A W C V T H A F A D I H O L Y V E D F S G L P H G A Y R T E K G T E K A Q H R V E A	331
AiiDseuis	H F A H N E E M A W C V T H A F A D I H O L Y V E D F S G L P H G A Y R T E K G T E K A Q H R V E A	331
AiiDRalato	F D V K L P D G R L E R R T H T F R D F L F G P V L S M P S G G M P W T T Q K A V A L R D A R R N	366
AiiDmelita	Q V R G G --- E D V Q I D Y W A T R H G P L I L G S P E E G K G I A L K S V Q L Q P G D R --	371
AiiDseuis	Q V R G G --- E D V Q I D Y W T T R H G P L I L G S P E D G K G I A L K F V Q L Q P G D R --	371
AiiDRalato	T R S V D S W L H T S Q A R D F A G I R Q A E N L S I P W V N T A T D R N S R A L F A D V S T T	436
AiiDmelita	-- S L D C L L P M L T A S S I T E F Y D M M E P W G L I D H N L V S A D K K G N I G V L V R A K I	424
AiiDseuis	-- S L D C L L P M L T A S S I T E F Y D M M E P W G L I D H N L V S A D K K G N I G V L V R A K I	424
AiiDRalato	P D V P A A E L Q R C A F S F L A G K L F K D A S L V L L D S R G T C N W Q V D P A S P V P G L V	486
AiiDmelita	P V R - D R L N G W L P M P G W T G A H E W R G M L P F E R S P R E E N P A S S V A G H A A V	472
AiiDseuis	P A R - D R L N G W L P M P G W T G A H E W R G M L P F E R S P R E E N P A S G - -----	463
AiiDRalato	A P A R M P V L E R D D Y V A N S N D - S S W L T N P A Q K L F S F P V M G S V D F P Q R L P F R	537
AiiDmelita	R A K P T R G K S R S G V V T A N N R T V P D D W P D Y I C T D C H P A T R A K R I R S R L E S E	522
AiiDseuis	----- V V T A N N R T V P D D W P D Y I C T D C H P A T R A K R I R S R L E S E	501
AiiDRalato	I G L I E I G R R L A G T D S F P G N R I D L P N L Q A M I F S N A N L A S Q V L G D L L A A C K	587
AiiDmelita	T P F S P S D M L S I L H D D V S A P A A E I A Q K L R A I T P K S E P A R H L L S M L A G W Q G D	572
AiiDseuis	T P F S P S D M L S I L H D D V S A P A A E I A Q K L R A I T P K S E P A R H L L S M L A G W Q G D	551

AiiDRalato	A T P L -- A P D R D F R D G C A A L G Q W N F T S N K D A R F K H L F R E F W M R A K D I A Q F H	634
AiiDmelita	M A P N K L A P T A Y M A I R Q E M T R I L A R V S D L A G V A D T E I S R L P P G V S P F T H L W	622
AiiDsuia	M A P N K L A P T A Y M A I R Q E M T R I L A R V S D L A G V A D T E I S R L P P G V S P F T H L W	601
AiiDRalato	A V E F D P A D P V H T P R G L R M N D A T V R T A V F K A K E A V G A V R K A G F A L D A P L G	664
AiiDmelita	W A L P D Q L R R N D T S L L G G M S W D E L L L E A V E T V A Q T F D P Q P W G D A H R P I F R H	672
AiiDsuia	W A L P D Q L R R N H T S L L G G M S W D E L L L E A V E T V A Q T F D P Q P W G D A H R P I F R H	651
AiiDRalato	T Y Q A R H A P D G S I L H G G E E Y E S V L N K L Q T L P I G F K S L P V Y F G T S Y I R T F T	734
AiiDmelita	P L A G A F P E Q A A V L A P T S R Y V G G D G C V L A T G S L P Q S G A T A A Y G P V A K Y I W	722
AiiDsuia	P L A G A F P E Q A A V L A P T S R Y V G G D G C V L A T G S L P Q S G A T A A Y G P V A K Y I W	701
AiiDRalato	F D D Q G P V K D A L T Y G E S T D H A S P H A F D Q M R A Y S G K H W N R L P F S E A A R A D	764
AiiDmelita	D L A D W D A S S W V V F H G A S G D P A S P H Y R D Q N E R W A R G E Q V P A C Y S R E N V R A N	772
AiiDsuia	D L A D W D A S S W V V F H G A S G D P A S P H Y R D Q N E R W A R G E Q V P A C Y S R E N V R A N	751

Figure 1 : Alignement des séquences protéiques encodées par les *aiiD* de *Ralstonia*, *Brucella melitensis* et *Brucella suis*. En rouge, les acides aminés identiques. En vert, les acides aminés similaires, c'est-à-dire partageant les mêmes propriétés physico-chimiques.

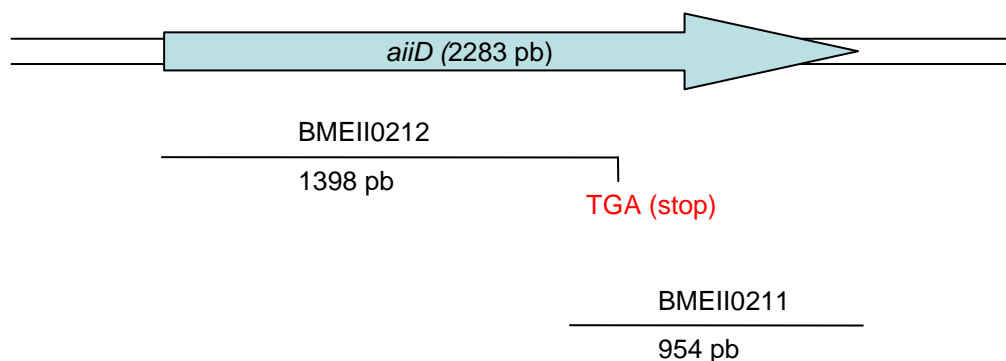


Figure 2 : Représentation de la séquence codante de l’AHL acylase putative de *Brucella melitensis* (flèche bleue). *aiiD* est annotée dans l’ORFéome comme étant composée de deux ORF’s : BMEII0212 et BMEII0211 de 1398 et 954 pb respectivement.

1.1 *Brucella melitensis* possède-t-elle une AHL acylase ?

Afin de vérifier que la protéine encodée par *aiiD* possède une activité AHL acylase et afin de voir si la présence d’un codon stop dans le gène *aiiD* empêche sa production, nous avons réalisé un test de dégradation des AHL’s.

1.1.1 Utilisation des plasmides pBBR mcs1-*aiiD*_{melitensis} et *aiiD*_{suia} :

Les plasmides pBBR-mcs1 *aiiD*_{melitensis} et pBBR-mcs1 *aiiD*_{suia} portant le gène codant l’AHL acylase putative de *B. melitensis* ou celle de *B. suis* respectivement, ont été utilisés (Figure 3). Ils contiennent le gène de résistance au chloramphénicol et ont été construits par Julien Lemaire (thèse en cours). Ces plasmides ont été introduits par transformation dans des souches de *E. coli* DH10B compétentes.

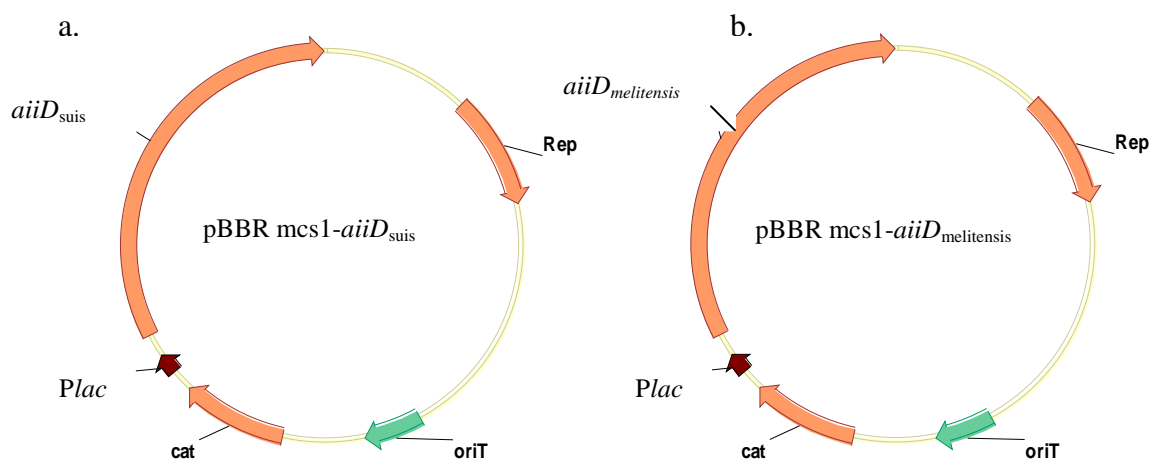


Figure 3 : Illustration des plasmides : (a) pBBR mcs1-*aiiD*_{suis} et (b) pBBR mcs1-*aiiD*_{melitensis}. Les gènes sont placés sous la dépendance du promoteur fort Plac. *cat* (chloramphénicol acétyltransférase) : gène de résistance au chloramphénicol ; oriT : origine de transfert du plasmide ; Rep : origine de réplication du plasmide.

1.1.2 Analyse de la dégradation d'AHL's par les AHL acylases putatives de *B. melitensis* et de *B. suis* :

L'analyse de la dégradation est effectuée sur des *E. coli* pour éviter de manipuler *Brucella*, pathogène de classe III qui implique de nombreuses contraintes comme celle de travailler dans un laboratoire de type BL3.

Afin de déterminer si les AHL acylases putatives de *Brucella melitensis* et de *B. suis* sont capables de dégrader les AHL's. Dans ce but, des AHL's synthétiques ont été ajoutées dans le milieu de culture d'*E. coli* DH10B pBBR mcs1-*aiiD*_{melitensis} et pBBR mcs1-*aiiD*_{suis}. Nous avons ensuite déterminé le taux de dégradation des AHL's grâce à un test de détection basé sur des biosenseurs.

Comme expliqué dans l'introduction de ce travail, la diversité des molécules signal du QS repose sur : (i) la longueur de leur chaîne acyle et (ii) la nature de la substitution du carbone C₃. Nous avons donc décidé de tester la capacité de dégradation de l'AHL acylase putative en fonction de ces deux critères.

1.1.2.1 La longueur de la chaîne acyle influence-t-elle l'éventuelle activité AHL acylase ?

L'estimation de la quantité d'AHL's dans le milieu est rendue possible grâce à un biosenseur capable de détecter la présence d'AHL's et d'y répondre en produisant de la lumière. Les souches biosenseurs utilisées sont des *E. coli* JM109 transformées avec les plasmides pSB1075, pSB401 ou pSB1142. Ces biosenseurs détectent tous les types d'AHL's

avec toutefois une spécificité plus importante pour un type particulier d’AHL’s : celles à courtes, moyennes ou longues chaînes acyles respectivement.

Des cultures en milieu LB de la souche *E. coli* pBBR *mcs1- aiiD_{melitensis}* et pBBR *mcs1-aiiD_{suis}* ont été réalisées. Trois aliquots de 2 ml de ces cultures ont été prélevés pour ensuite y ajouter respectivement de la C₄-HSL, de la C₈-HSL et de la C₁₂-HSL. Nous avons utilisé une culture de *E. coli* contenant le pBBR *mcs1* vide comme contrôle négatif. Ces cultures ont ensuite été incubées pendant 3 heures à 37°C pour permettre à la protéine AiiD de dégrader éventuellement les AHL’s ajoutées dans le milieu.

A chaque culture, nous avons ajouté 2 ml de culture du biosenseur adéquat, c’est-à-dire celui ayant le plus d’affinité pour l’AHL’s synthétique rajoutée précédemment. Les cocultures sont ensuite placées pendant 3 heures à 37°C pour permettre au système rapporteur du biosenseur de détecter les AHL’s et de produire de la lumière.

La luminescence produite par les biosenseurs est mesurée à l’aide d’un luminomètre afin de quantifier les RLU (Relative Light Unit).

Les résultats obtenus sont présentés à la figure 4. Une diminution de luminescence est observée pour tous les types d’AHL’s (C₄-HSL, C₈-HSL et C₁₂-HSL) lors des cocultures du biosenseur avec les souches *E. coli* pBBR *mcs1-aiiD_{melitensis}* et pBBR *mcs1-aiiD_{suis}* par rapport aux cocultures réalisées avec *E. coli* pBBR *mcs1* vide (contrôle négatif).

Ces résultats nous permettent de faire plusieurs constatations : (i) les AHL acylases de *B. suis* et de *B. melitensis* semblent capables de dégrader les AHL’s, (ii) la présence du codon stop au milieu de la séquence codante de l’AHL acylase de *B. melitensis* n’empêche ni la production, ni l’activité de dégradation de la protéine, (iii) cette AHL acylase à un large spectre de spécificité, elle n’est pas restreinte à un seul type d’AHL.

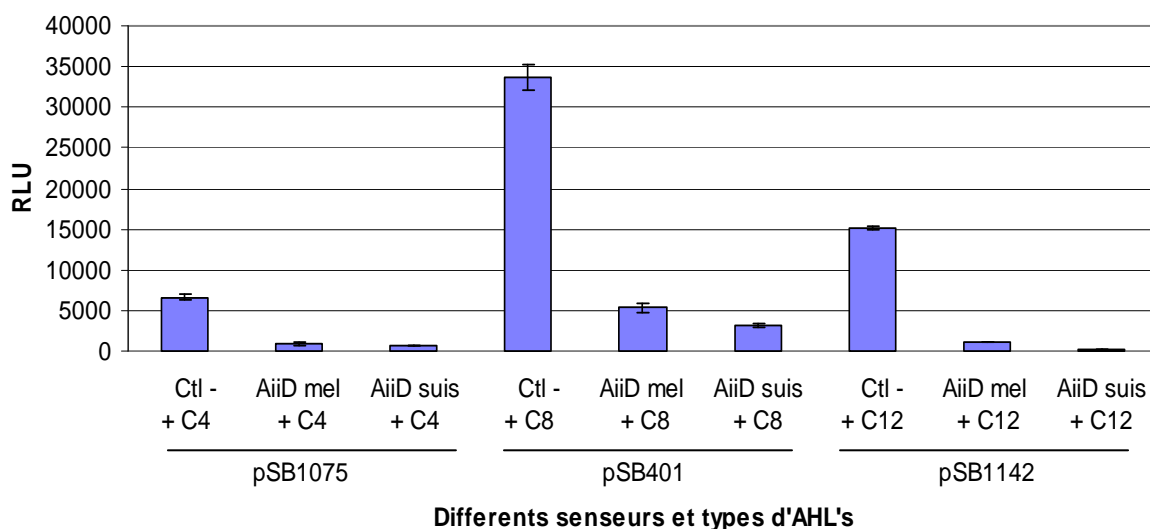


Figure 4: Test de dégradation des AHL’s par les AHL acylases putatives de *B. melitensis* et *B. suis*. Ce graphe rapporte la quantité de lumière produite par les biosenseurs *E. coli* JM109 pSB1075, pSB401 et pSB1142 suite à une coculture avec les souches de *E. coli* pBBR *mcs1-aiiD_{melitensis}*, pBBR *mcs1-aiiD_{suis}* ou pBBR *mcs1* vide (ctl-). 5 µM d’AHL’s synthétiques (C₄-HSL, C₈-HSL et C₁₂-HSL) ont été ajoutée aux cultures. Les mesures de luminescence sont exprimées en RLU (Relative Light Units). Les barres d’erreurs représentent des mesures prises en triplicats. Ces données sont représentatives de trois expérimentations.

1.1.2.2 La substitution de la chaîne acyle influence-t-elle l'éventuelle activité AHL acylase ?

Après avoir vérifié que l'AHL acylase putative de *Brucella melitensis* était capable de dégrader les AHL's et cela malgré le codon stop présent dans sa séquence codante, nous avons également voulu tester sa capacité à dégrader une AHL possédant une substitution sur le troisième atome de carbone de leur chaîne acyle. Nous avons pour ce faire utilisé la seule AHL synthétique commercialement disponible possédant une substitution: la 3-oxo-C₈-HSL.

En utilisant les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus, nous avons fait un test de dégradation en utilisant le biosenseur *E. coli* JM109 pSB401 et les souches de *E. coli* contenant les plasmides pBBR mcs1 vide (contrôle négatif) ou pBBR mcs1- *aiiD*_{melitensis}.

Les résultats obtenus sont représentés à la figure 5. Une diminution de luminescence est observée lors de la coculture du biosenseur avec la souche *E. coli* pBBR mcs1-*aiiD*_{melitensis} par rapport à la coculture avec *E. coli* pBBR mcs1 vide (contrôle négatif). *AiiD*_{melitensis} est capable de dégrader la 3-oxo-C₈-HSL, ce qui suggère que l'AHL acylase de *Brucella melitensis* est capable de dégrader les AHL's possédant une substitution sur le troisième atome de leur chaîne acyle.

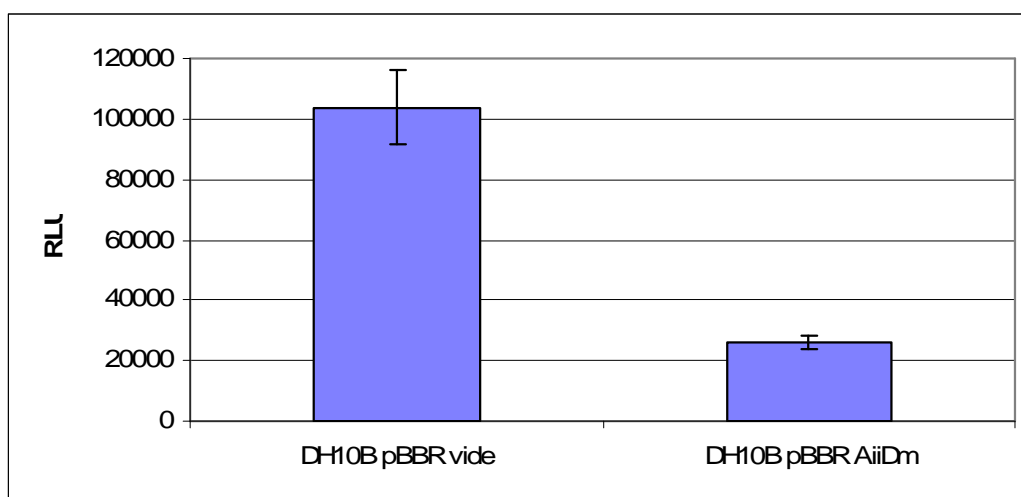


Figure 5 : Test de dégradation de la 3-oxo-C₈-HSL par l'AHL acylase de *B. melitensis*.

Ce graphe illustre la quantité de lumière produite par les biosenseurs *E. coli* JM109 pSB401 suite à une coculture avec les souches de *E. coli* pBBR mcs1-*aiiD*_{melitensis} et pBBR mcs1 vide. 5 μM de 3-oxo-C₈-HSL ont été ajoutée aux cultures. Les mesures de luminescence sont exprimées en RLU (Relative Light Units). Les barres d'erreurs représentent des mesures prises en triplicats. Ces données sont représentatives d'une expérimentation.

1.2 Analyse de la production de l'AHL acylase chez *Brucella melitensis* :

Après avoir démontré chez *E. coli* que *aiiD*_{melitensis} encodait une AHL acylase fonctionnelle, nous avons analysé la production de l'AHL acylase le long d'une courbe de croissance de *Brucella*. Ne possédant pas d'anticorps spécifiques dirigés contre l'AHL acylase putative de *Brucella melitensis*, il nous fallait pour détecter son éventuelle production

fusionner sa séquence codante à une protéine de fusion contre laquelle nous possédions des anticorps.

Nous avons pour cela choisit d'utiliser un gène rapporteur encodant la «green fluorescent protein» (eGFP) de 26 kDa que nous avons fusionnée à l'extrémité C-term du locus chromosomique. Un Western-blot pourra ensuite être réalisé sur des extraits totaux de cette souche de *Brucella melitensis*.

1.2.1 Construction et intégration du plasmide pSK-*aiiD*-eGFP dans le génome de *Brucella melitensis*:

La fusion de la séquence chromosomique *aiiD* à la eGFP a nécessité la construction d'un vecteur suicide (pSK-*aiiD*-eGFP). Le système de clonage Gateway™ a été utilisé afin de construire ce plasmide. Une réaction LR a été réalisée afin d'insérer le gène *aiiD* du pDONR201 dans le plasmide receveur pSK contenant la protéine de fusion eGFP (Figure 6). Le clonage par recombinaison de l'*aiiD* se fait au détriment de *ccdB*, gène toxique porté par le plasmide receveur. Si la recombinaison à lieu, *ccdB* est excisé et les *E. coli* DH10B transformées par ce plasmide survivent; contrairement aux *E. coli* transformées par le plasmide receveur n'ayant pas reçu l'insert. La construction a été validée par restriction diagnostique sur une minipréparation.

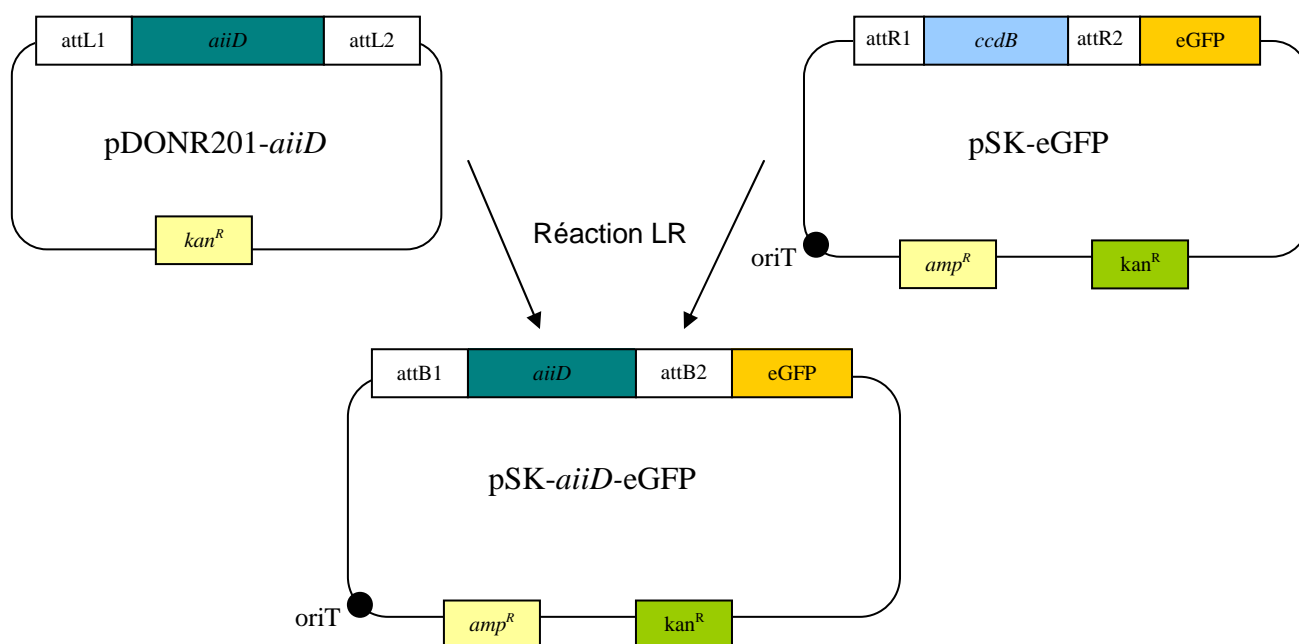


Figure 6 : Réaction LR entre le plasmide donneur contenant le gène *aiiD* et le plasmide receveur contenant le tag eGFP. Le plasmide pSK contenant l'*aiiD* taggée eGFP résulte de cette réaction. *kan^R* : gène de résistance à la kanamycine, *amp^R* : gène de résistance à l'ampicilline.

Des *E. coli* S17 (bactéries donneuses lors du transfert conjugatif) ont été transformées avec le plasmide pSK-*aiiD*-eGFP puis conjuguées avec des *Brucella melitensis* afin d'y introduire le plasmide. Après conjugaison, les *Brucella* qui ont reçu le plasmide pSK-*aiiD*-eGFP sont sélectionnées sur un milieu 2YT contenant de l'acide nalidixique et de la kanamycine afin d'éliminer les *E. coli* S17 et les *Brucella* non-conjugantes respectivement.

Le plasmide pSK-*aiiD*-eGFP est un plasmide suicide qui ne peut que s'intégrer par recombinaison homologue dans le génome de *Brucella melitensis*. Il en résulte ainsi la duplication du gène *aiiD* (*aiiD* taggé et *aiiD* natif).

1.2.2 Analyse de la production de l'acylase chez *Brucella melitensis* :

Des milieux 2YT a été inoculé à une DO_{600nm} initiale de 0,05 à partir de précultures de *Brucella melitensis* pSK-*aiiD*-eGFP. Des échantillons de cette culture bactérienne ont été prélevés à différentes phases de croissance à savoir 3h, 20h, 24h, 36h et 48h heures de culture puis inactivés 2 heures à 80°C. Après centrifugation, les culots bactériens ont été lavés dans un tampon PBS puis concentrés afin d'obtenir des extraits totaux dont la DO_{600nm} correspond à 6.

Chaque échantillon a été analysé par Western-blot à l'aide d'anticorps anti-eGFP (Figure 7). Nous observons une production de eGFP située à un P.M. de 26 kDa. Nous ne parvenons pas à observer une bande de P.M. d'environ 80 kDa, correspondant à l'AHL acylase taggée eGFP probablement du au bruit de fond important. Cependant, l'observation d'une production d'eGFP seule (26 kDa) nous indique que l'AHL acylase est exprimée chez *Brucella*. En effet, la fusion transcriptionnelle de la eGFP à *aiiD* nous permet néanmoins de l'utiliser comme gène rapporteur de l'activité du promoteur de l'AHL acylase. Nous observons une expression de la eGFP plus importante aux temps 20 et 24 heures.

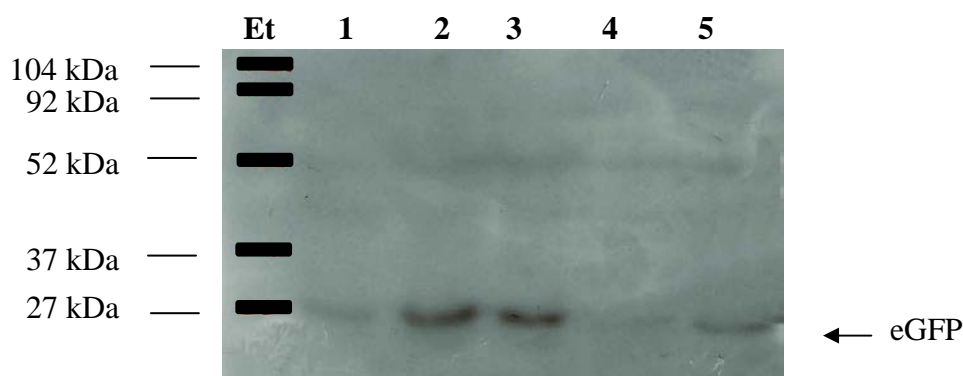


Figure 7 : Résultats du Western-blot réalisé sur des extraits protéiques d'une souche de *Brucella melitensis* pSK-*aiiD*-eGFP. La production de la protéine eGFP a été suivie à l'aide d'anticorps anti-GFP. Et, étalon de poids moléculaire.

Piste 1 : *B. melitensis* pSK-*aiiD*-eGFP, 3 heures
 Piste 2 : *B. melitensis* pSK-*aiiD*-eGFP, 20 heures
 Piste 3 : *B. melitensis* pSK-*aiiD*-eGFP, 24 heures
 Piste 4 : *B. melitensis* pSK-*aiiD*-eGFP, 36 heures
 Piste 5 : *B. melitensis* pSK-*aiiD*-eGFP, 48 heures

1.3 Test de sécrétion de l'acylase putative de *Brucella melitensis* :

Nous avons démontré que le gène *aiiD* exprimé chez *E. coli* entraînait la dégradation d'AHL's exogènes. A présent, nous allons déterminer si cette AHL acylase est fonctionnelle chez *Brucella melitensis*. Sachant que chez *Ralstonia* et *Pseudomonas* les AHL acylases sont sécrétées dans le milieu extracellulaire avant d'être fonctionnelles, nous allons vérifier si cette particularité est partagée par l'AHL acylase de *Brucella melitensis*.

Ne possédant pas d'anticorps spécifiques de l'AHL acylase de *Brucella melitensis*, il nous fallait pour détecter son éventuelle sécrétion dans le milieu fusionner sa séquence codante à un tag contre lequel nous possédions des anticorps. Ce tag devait également être de petite taille afin de ne pas gêner une éventuelle sécrétion. C'est pourquoi, la eGFP utilisée précédemment ne conviendrait pas (27 kDa). Nous avons pour cela construit un plasmide (pBBR mcs1-*aiiD*_{melitensis}-13myc) permettant de surexprimer le gène de l'AHL acylase fusionné en C-term avec le tag 13myc constitué du motif suivant : EQKLISEEDL répété 13 fois. De cette manière, il nous serait possible de détecter la présence de l'AHL acylase taggée dans le surnageant d'une culture de *Brucella melitensis* par Western-blot. Dans le cas où l'AHL acylase serait sécrétée, il est également intéressant d'identifier sa voie de sécrétion. Pour cela, nous avons également introduit le pBBR mcs1-*aiiD*-13myc dans une souche de *Brucella melitensis* délétée de son opéron *virB*, codant pour l'appareil de sécrétion de type IV (Caroline Nijskens, thèse en cours).

1.3.1 Construction du plasmide pBBR mcs1-*aiiD*_{melitensis}-13myc :

Une réaction LR a été réalisée afin d'insérer le gène *aiiD* du pDONR201 dans le plasmide receveur, pBBR mcs1-13myc (Figure 8). Le clonage par recombinaison de l'*aiiD* se fait au détriment de *ccdB*, gène toxique porté par le plasmide receveur. Si la recombinaison a lieu, *ccdB* est excisé et les *E. coli* DH10B transformées par ce plasmide sont les seules à survivre. La construction a été validée par restriction diagnostique sur minipréparation.

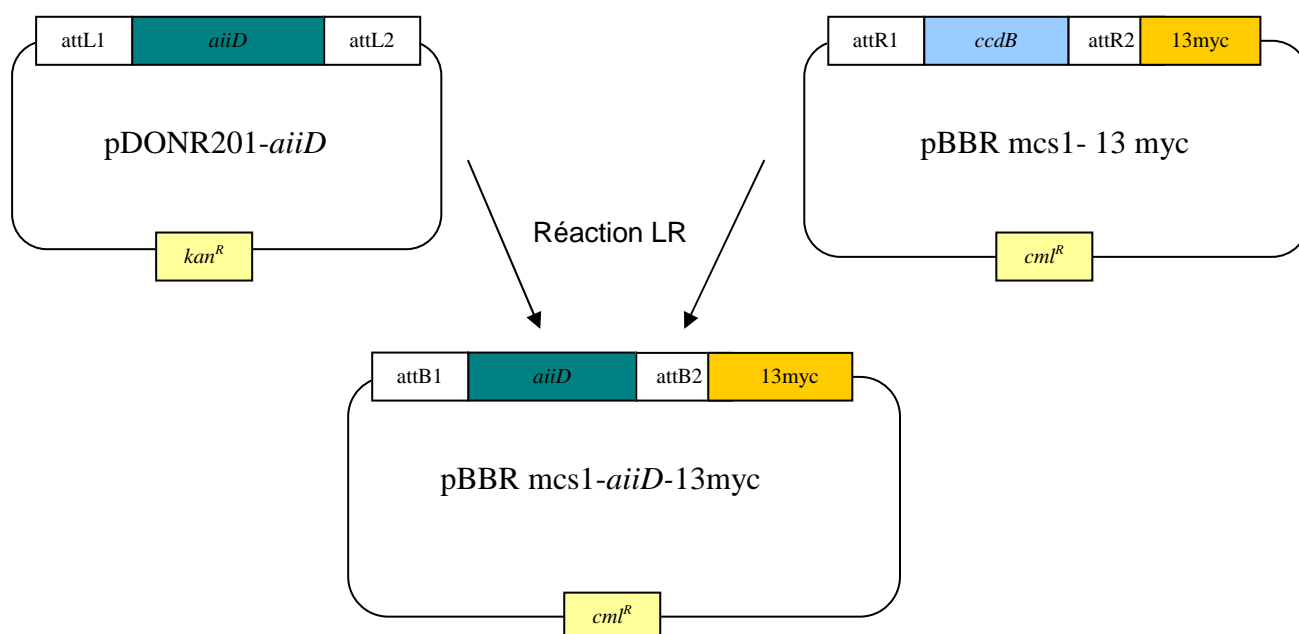


Figure 8 : Réaction LR entre le plasmide donneur contenant le gène *aiiD* et le plasmide receveur contenant le tag 13myc. Le plasmide pBBR mcs1 contenant l'*aiiD* taggée 13myc résulte de cette réaction. *kan^R* : gène de résistance à la kanamycine, *cm^R* : gène de résistance au chloramphénicol.

1.3.2 Construction de *B. melitensis* pBBR mcs1-*aiiD*-13myc :

Des *E. coli* S17 CaCl₂ compétentes sont transformées avec le plasmide pBBR mcs1 *aiiD*-13myc puis conjuguées avec les souches *B. melitensis* 16M et *B. melitensis* 16M Δ *virB* afin d'y introduire ce plasmide.

Après la conjugaison, les *Brucellae* qui ont reçu le plasmide pBBR mcs1-*aiiD*-13myc sont sélectionnées sur un milieu 2YT contenant de l'acide nalidixique et du chloramphénicol afin d'éliminer les *E. coli* S17 et les *Brucellae* non-conjugantes respectivement.

1.3.3 Analyse de la sécrétion de l'AHL acylase chez *Brucella melitensis* :

Afin de déterminer si l'AHL acylase est sécrétée, nous avons analysé la production d'*aiiD* par Western-blot dans le surnageant d'une culture de *B. melitensis* pBBR mcs1-*aiiD*-13myc et *B. melitensis* Δ *virB* pBBR mcs1-*aiiD*-13myc. Nous avons réalisé un Western-blot sur les culots des cultures comme contrôle positif afin de nous assurer que l'AHL acylase était bien produite dans les souches testées.

Des volumes de 50 ml de 2YT ont été inoculés à une DO_{600nm} initiale de 0,05 à partir des précultures lancées la veille des souches *B. melitensis* pBBR mcs1-*aiiD*-13myc et *B. melitensis* Δ *virB* pBBR mcs1-*aiiD*-13myc.

Après 24h et 48h de cultures à 37°C, le surnageant et le culot sont séparés par centrifugation. Les échantillons sont ensuite inactivés 2h à 80°C. Les protéines du surnageant sont précipitées à l'aide de TCA (10%) et les culots sont resuspendus dans un tampon PBS afin d'obtenir des extraits totaux dont la DO_{600nm} est égale à 6.

Les échantillons protéiques provenant des surnageants ou des culots des différentes cultures ont été analysés par Western-blot avec des anticorps monoclonaux anti-myc.

Aucune trace de l'AHL acylase taggée 13-myc n'a été détectée par Western-blot (Figure 8) que ce soit dans le surnageant d'une culture de *B. melitensis* pBBR mcs1-*aiiD*-13myc ou dans le surnageant d'une culture de *B. melitensis* Δ *virB* pBBR mcs1-*aiiD*-13myc. De plus, la présence de l'AHL acylase n'est pas détectée dans les culots des cultures considérées, ce qui laisse sous-entendre qu'elle n'aurait pas été produite.

1.4 Détermination de la taille de l'AHL acylase putative de *Brucella melitensis* :

Il a été montré chez d'autres espèces bactériennes produisant une AHL acylase que cette enzyme est constituée d'un seul peptide mûré en deux sous-unités de 60 et de 18 kDa. Afin de déterminer si l'AHL acylase de *Brucella melitensis* est composée elle aussi de deux sous-unités, nous avons réalisé un gel de polyacrylamide sur les extraits protéiques d'*E. coli* surexprimant l'AHL acylase taggée en N-term ou en C-term. En taggant de cette manière les deux extrémités de la séquence codante de l'acylase, nous pouvons avoir des indications sur le nombre de sous-unités qui la compose ainsi que sur leurs tailles.

1.4.1 Construction des plasmides pBBR mcs1-Lumio™-*aiiD* et pBBR mcs1-*aiiD*-Lumio™ :

Pour estimer la taille des deux sous-unités formant potentiellement l'AHL acylase, nous avons utilisé le tag Lumio™ inséré dans un plasmide de surexpression pBBR mcs1-Lumio™. Lumio™ est un tag commercial de petite taille (6 acides aminés : Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys) capable, suite à une interaction avec un réactif dénommé : «réactif Lumio™ » d'émettre de la fluorescence lorsqu'il est excité à 302-365 nm.

Deux pBBR mcs1 Gateway™-Lumio™ construits par Blandine David (mémoire 2006) nous permettent de construire des plasmides surexprimant l'AHL acylase de *Brucella* taggée à l'une ou l'autre de ses extrémités (Figure 9). Nous avons réalisé une réaction LR entre le plasmide pDONR-*aiiD*_{melitensis} et les plasmides receveurs pBBR mcs1 Gateway™-Lumio™ (tag C-term) et pBBR mcs1 Lumio™-Gateway™ (tag N-term). La construction a ainsi obtenue a été validée par restriction diagnostique sur minipréparation.

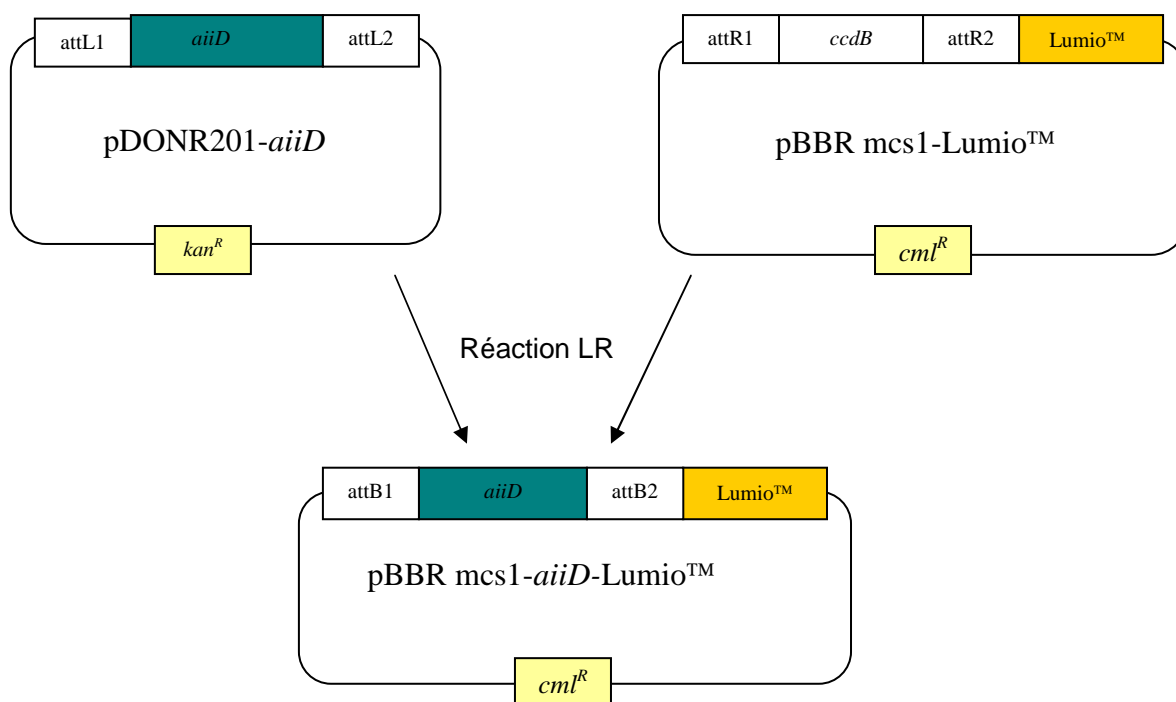


Figure 9 : Réaction LR entre le plasmide donneur contenant le gène *aiiD* et le plasmide receveur contenant le tag Lumio™. Résulte de la réaction un plasmide pBBR mcs1 contenant l'*aiiD* taggée en C-term par Lumio™. *kan^R* : gène de résistance à la kanamycine, *cml^R* : gène de résistance au chloramphénicol. La même stratégie est utilisée afin de tagger *aiiD* en N-term.

1.4.2 Analyse du nombre et de la taille des sous-unités composant l'AHL acylase :

Pour déterminer la taille ainsi que le nombre de sous-unités qui composent l'AHL acylase de *Brucella melitensis*, nous avons utilisé un gel de polyacrylamide (12%). Nous avons surexprimé dans des souches d'*E. coli* DH10B les plasmides pBBR mcs1-Lumio™-*aiiD* (tag en N-term) et pBBR mcs1-*aiiD*-Lumio™ (tag C-term).

Des cultures liquides de 10 ml de LB ont été incubées 16 heures à 37°C. Les cultures arrivées à une DO_{600nm} de 1 sont ensuite centrifugées. Le culot des cellules est resuspendu dans 1ml de tampon de lyse. Les bactéries sont ensuite traitées au sonicateur et les échantillons protéiques sont traités avec le réactif Lumio™ et déposés sur le gel de polyacrylamide. La révélation se fait sur banc U.V équipé d'une caméra standard.

Nous observons pour les *E. coli* DH10B surexprimant les plasmides pBBR mcs1-Lumio™-*aiiD* (N-term) et pBBR mcs1-*aiiD*-Lumio™ (C-term) des bandes fluorescentes à environ 27 et 60 kDa respectivement. Ces bandes fluorescentes correspondraient aux deux sous-unités de l'AHL acylase de *Brucella melitensis* (Figure 10).

Dès lors, de par cette caractéristique, l'AHL acylase de *Brucella melitensis* se rapproche des AHL acylases décrites dans la littérature.

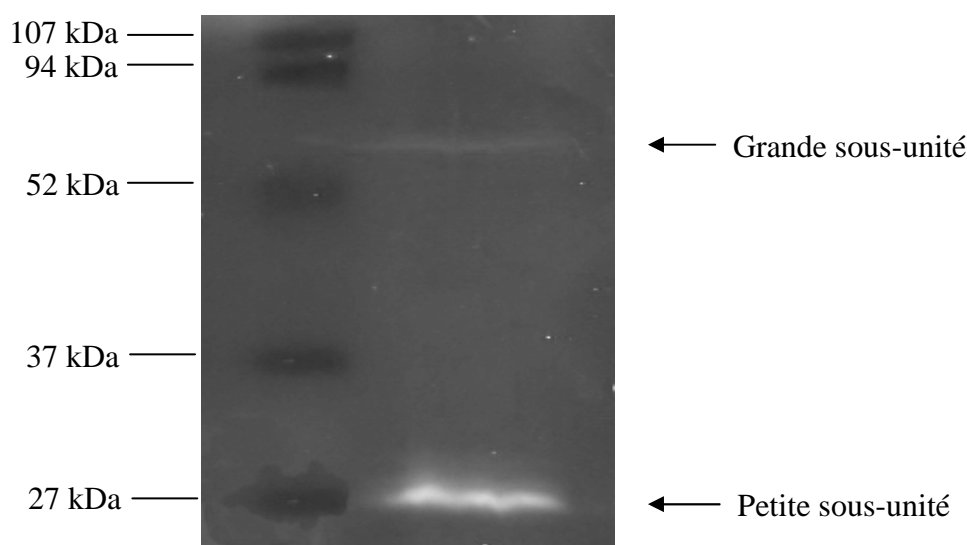


Figure 10 : Gel de polyacrylamide réalisé sur des extraits protéiques d'une souche de *E. coli* pBBR mcs1-*aiiD*-Lumio™ et pBBR mcs1-Lumio™-*aiiD*. Les deux extraits protéiques ont été chargés sur la même piste.

1.5 *aiiD* de *Brucella melitensis* : AHL acylase ou pénicilline acylase ?

Les deux ORF's correspondant à l'AHL acylase de *Brucella melitensis* sont annotées dans l'ORFéome comme étant des pénicillines acylases. Afin de vérifier la nature exacte de l'AHL acylase de *Brucella melitensis*, nous avons testé la résistance de diverses souches de *Brucellae* à la pénicilline.

1.5.1 Différentes souches utilisées :

B. melitensis wt : naturellement résistante à la pénicilline (contrôle positif).

B. abortus : naturellement sensible à la pénicilline (contrôle négatif).

B. melitensis Δ *aiiD* : souche délétante pour l'AHL acylase (construite par Julien Lemaire, thèse en cours) avec laquelle il est possible de voir si l'AHL acylase de *Brucella melitensis* est

également une pénicilline acylase. Une telle souche devrait perdre sa résistance à la pénicilline.

B. melitensis pBBR1 *aiiD-13myc* : souche surexprimant l'AHL acylase. Dans le cas où l'AHL acylase de *Brucella melitensis* est une pénicilline acylase, un mutant de surexpression doit être plus résistant à la pénicilline que la souche *B. melitensis* wt.

1.5.2 Analyse de la nature de l'AHL acylase de *Brucella melitensis* :

Des cultures liquides de 5ml sont lancées pour chacune des souches décrites ci-dessus. Ces cultures sont diluées à une DO_{600nm} de 0,4 puis étalées sur milieu 2YT.

Des pastilles imbibées de pénicilline à différentes concentrations sont déposées sur les boîtes, seule la pastille imbibée de pénicillineG 100mM/ml est présentée (Figure 11). Suivant la résistance ou la sensibilité à la pénicilline des souches testées, nous observons des zones d'inhibition plus ou moins étendues.

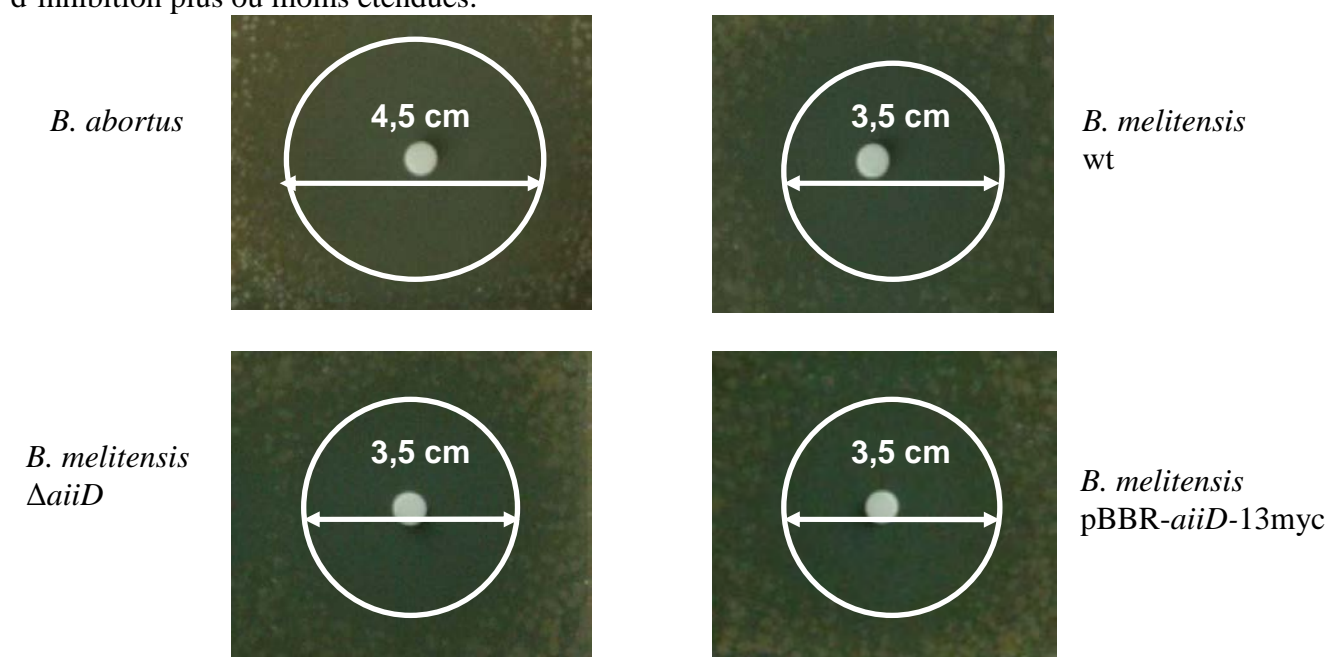


Figure 11 : Photographies des zones d'inhibition observées autour des pastilles imbibées de 2 μ l de pénicillineG 100mM/ml pour les souches : *B. abortus*, *B. melitensis* Δ *aiiD*, *B. melitensis* pBBR mcs1-*aiiD* et *B. melitensis* wt.

La souche *B. abortus* (MIC=0,002 μ g/ml) étant naturellement sensible à la pénicilline, elle se caractérise par une zone d'inhibition de diamètre supérieur (4,5 cm) à celle observée dans le cas de *Brucella* 16M wt (MIC>32 μ g/ml), naturellement plus résistante à l'antibiotique (3,5 cm). Le diamètre des zones d'inhibition observées pour les souches *B. melitensis* Δ *aiiD* et *B. melitensis* pBBR-*aiiD*-13myc est identique à celui observé pour la souche *B. melitensis* sauvage. L'AHL acylase de *Brucella melitensis* ne semble donc pas être une pénicilline acylase comme annoté dans le génome.

1.6 Analyse de l'activité du promoteur de l'AHL acylase de *Brucella melitensis* :

Nous savons maintenant que le gène *aiiD* encode une protéine capable de dégrader des molécules signal de type AHL. Par ailleurs, le fait que *Brucella* produise des AHL's malgré la présence d'AHL acylase implique qu'il y ait une régulation du phénomène de dégradation. Afin d'étudier cette régulation, nous allons analyser l'activité du promoteur de l'AHL acylase (*PaiiD*) le long de la courbe de croissance de *Brucella*.

La région promotrice de l'AHL acylase sera ainsi placée en amont des deux gènes rapporteurs *luxAB* portés par le plasmide pJD27. Ces gènes codent les protéines capables de produire de la lumière en présence d'un substrat, le N-décyl aldéhyde. Le plasmide pJD27 *PaiiD* contient le gène de résistance à l'ampicilline et est répliquatif chez *Brucella* (Figure 12).

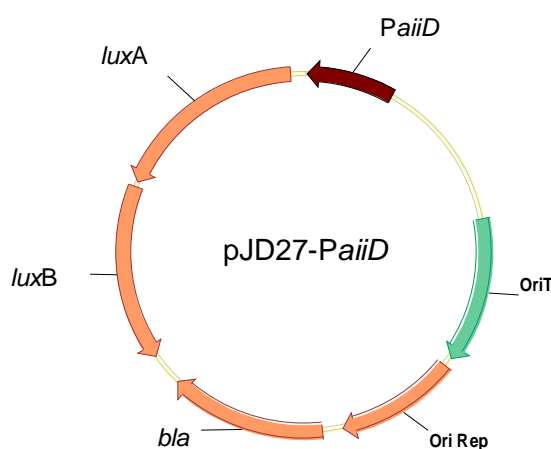


Figure 12 : Représentation du plasmide pJD27 *PaiiD*. La région promotrice de *aiiD* est placée en amont des gènes rapporteurs *luxAB*. *bla* (bêta-lactamase) : gène de résistance à l'ampicilline ; *oriT* : origine de transfert du plasmide ; *Rep* : origine de répllication du plasmide.

1.6.1 Construction du plasmide pJD27 *PaiiD* :

Une PCR sur l'ADN génomique de *Brucella melitensis* est réalisée afin d'amplifier les 500 paires de base situées en amont de l'ATG du gène *aiiD* (promoteur acylase amont 1 et promoteur acylase aval 1). L'amplification par PCR se fait à l'aide d'amorces complémentaires qui vont permettre d'ajouter de part et d'autre de *PaiiD* des sites de restriction pour les enzymes *XbaI* et *XhoI* (Figure 13). La taille du produit PCR est ensuite vérifiée sur gel d'agarose.

La région promotrice est ensuite clonée grâce à une réaction de ligation entre le plasmide pGEM-T-EASY, vecteur linéaire dont les extrémités 5' sont constituées d'une tyrosine (T) et le fragment PCR qui s'est vu rajouter à ses extrémités 3' une adénines (A) par la *Taq* polymérase lors de son amplification (Figure 14). C'est la complémentarité entre les bouts protrudants du plasmide et ceux du produit PCR qui permet à la réaction de ligation d'avoir lieu.

Le plasmide pGEM-T-EASY résultant est alors utilisé pour transformer des *E. coli* DH10B CaCl_2 compétentes. Les clones recombinants, sont sélectionnés grâce au test blanc-bleu. Des cultures liquides ont ensuite été lancées afin de récupérer le pGEM-T-EASY-*PaiiD*

en effectuant une mini-préparation. Le *PaiiD* a été séquencé à l'aide d'amorces commerciales complémentaires du pGEM-T-EASY ce qui nous a permis de vérifier qu'aucune mutation n'est apparue lors de la PCR. Les candidats ont ensuite été restreints par les enzymes *Xba*I et *Xho*I afin de récupérer *PaiiD* (Figure 15) et ainsi réaliser un clonage directionnel dans le pJD27 restreint par les mêmes enzymes de restriction. Une minipréparation est effectuée sur des *E. coli* DH10B CaCl₂ compétentes transformées par le produit de la ligation. Les plasmides ainsi obtenus sont vérifiés par une restriction diagnostique.

1.6.2 Construction de *B. melitensis* pJD27-*PaiiD*:

Le plasmide pJD27-*PaiiD* a été introduit par conjugaison dans la souche *B. melitensis* 16M. Pour cela, des *E. coli* S17 CaCl₂ compétentes sont transformées avec le plasmide pJD27-*PaiiD*. Après la conjugaison, les *Brucella* qui ont reçu le plasmide pJD27-*PaiiD* sont sélectionnées sur milieu 2YT contenant de l'acide nalidixique et ampicilline afin d'éliminer les *E. coli* S17 et les *Brucella* non-conjugantes respectivement.

Cependant, après avoir repiqué les clones transconjugants, il s'est avéré qu'aucun d'entre eux n'étaient capable de pousser sur boîtes. Après plusieurs tentatives, nous avons tenté de transformer des *Brucella* électrocompétentes, par électroporation. Là encore, aucun clone transformant n'a été obtenu après repiquage.

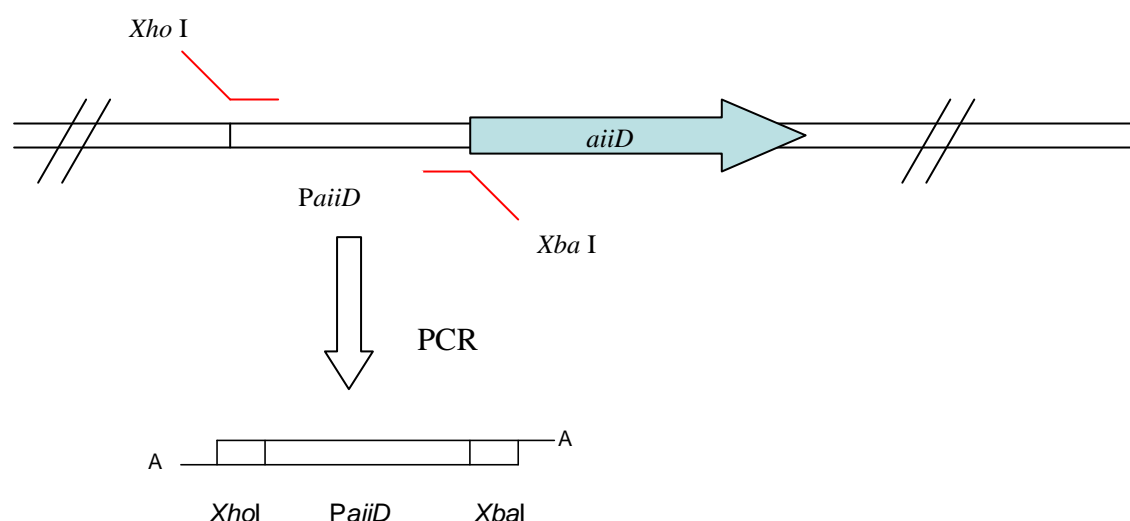


Figure 13 : Amplification par PCR de la région promotrice de l'AHL acylase (*PaiiD*) à l'aide d'amorces à bouts flottants (en rouge sur le schéma) permettant l'insertion de sites de restriction pour les enzymes : *Xho* I et *Xba* I.

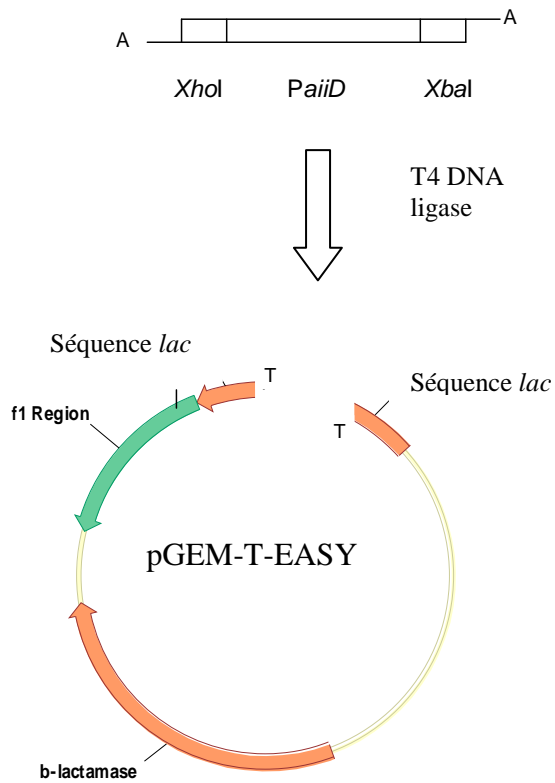


Figure 14 : Ligation de *PaiiD* dans le pGEM-T-EASY. *bla* (béta lactamase) est le gène de résistance à l'ampicilline. La séquence *lac* est la séquence codant pour le peptide α , sous-unité de la β -galactosidase (test blanc-bleu). La région *f1* correspond à l'origine de réplication du phage *f1*.

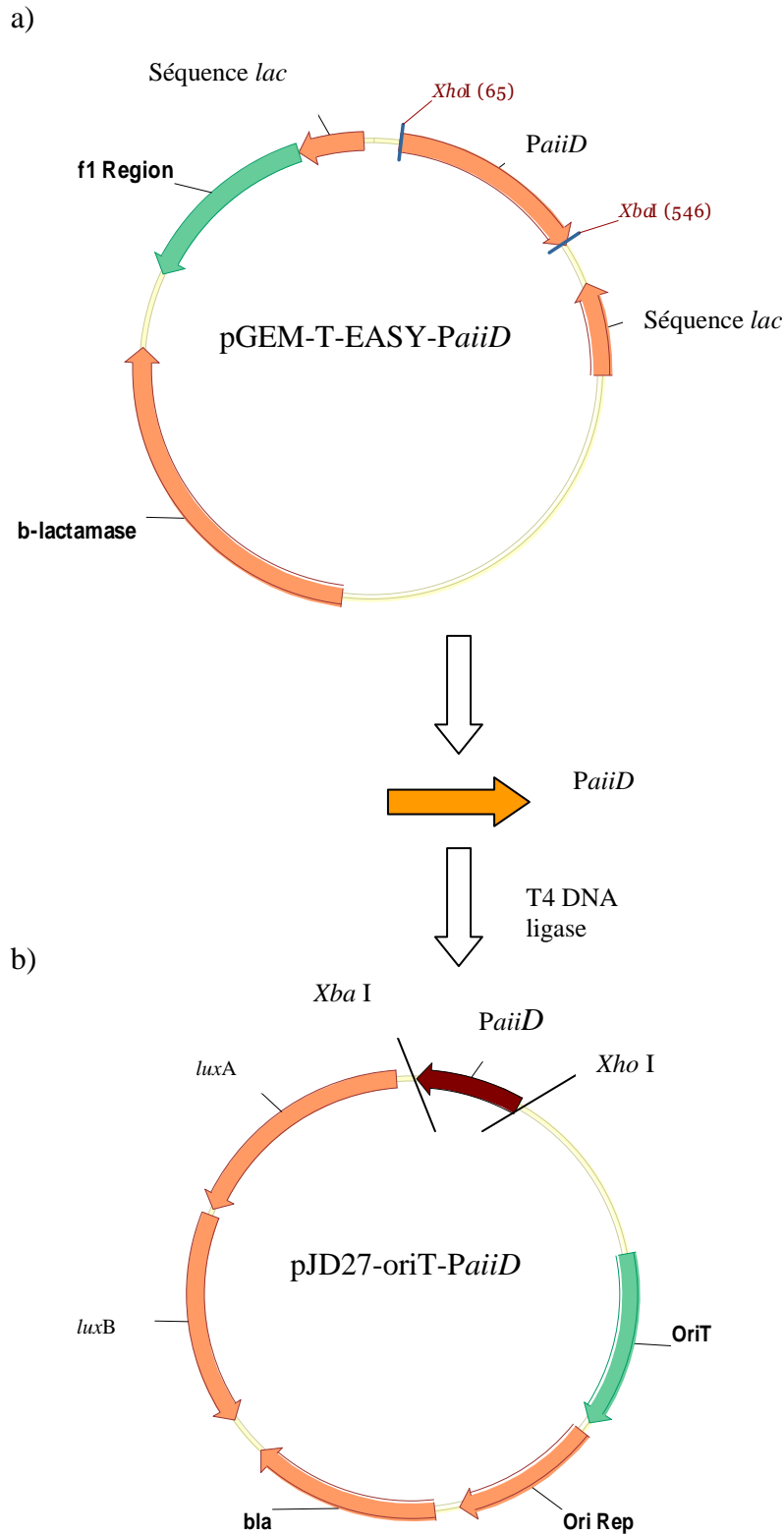


Figure 15 : (a) Restriction du pGEM-T-EASY par les enzymes *Xba*I et *Xho*I pour récupérer le fragment *PaiiD*. La séquence *lac* est la séquence codant pour le peptide α , sous-unité de la β -galactosidase. Cette séquence est située dans un *mcr* (multiple cloning region) dans lequel vient s'insérer le *PaiiD*. *bla* (bêta lactamase) est le gène de résistance à l'ampicilline. (b) Ligation de *PaiiD* dans le pJD27 ; *oriT* : origine de transfert du plasmide ; Rep : origine de réplcation du plasmide.

2) Recherche de la synthétase d'AHL de *Brucella melitensis* :

Bien qu'il ait été démontré que *Brucella melitensis* produise des AHL's (Taminiau *et al.*, 2002), à ce jour, aucun gène codant pour une synthétase classique n'a été mise en évidence. Les diverses stratégies mises en place ainsi que les comparaisons de séquences protéiques effectuées pour retrouver des homologues à LuxI ou LuxM et AinS se sont en effet révélées infructueuses.

Afin de retrouver l'ORF du génome de *Brucella* responsable de la synthèse d'AHL's, nous avons décidé de mettre en place un test double hybride chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ce genre de test permet de mettre en évidence les interactions physiques entre deux protéines. Dès lors, sachant que l'AHL synthétase interagit avec une ACP lors du processus de formation des AHL's, il serait possible de retrouver l'AHL synthétase de *Brucella* par l'intermédiaire des interactions qu'elle ferait avec l'ACP.

2.1 Principe du Double-Hybride et ORFéome de *Brucella melitensis*:

2.1.1 Principe du Double Hybride :

La technique du double-hybride utilise l'expression de gènes rapporteurs pour s'assurer d'une interaction entre deux protéines. Cette méthode fait intervenir des facteurs de transcription, tels que Gal4. Un facteur de transcription est une protéine capable de se fixer sur une région d'ADN appelée UAS (upstream activator sequence), située en amont du promoteur du gène régulé par le facteur de transcription. Il est constitué de deux domaines séparables, un domaine de liaison à l'ADN (DB, DNA Binding) et un domaine de transactivation (AD, Activation Domain). La séparation de ces deux domaines provoque la perte de fonctionnalité du facteur de transcription. En effet, aucun de ces deux domaines n'est capable, à lui seul, d'activer la transcription.

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 DB-X et AD-Y permet de reconstituer un facteur de transcription susceptible d'activer un gène rapporteur (Figure 16). Nous utilisons les domaines DB et AD du facteur de transcription Gal4 de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

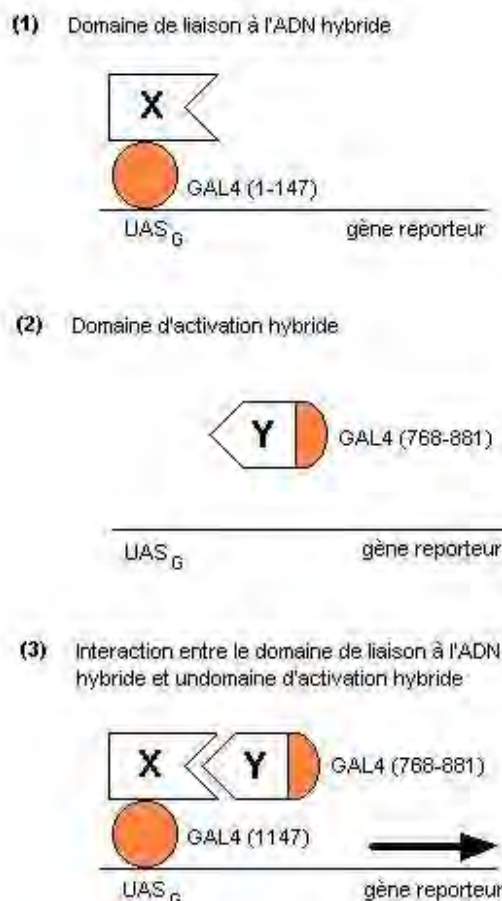


Figure 16 : *Stratégie de détection des interactions entre protéines par le système Double Hybride :*
 Les plasmides portant les gènes codant pour deux protéines hybrides, une représentant le domaine de GAL4 liant l'ADN fusionné à la protéine X (1), et l'autre représentant le domaine de GAL4 activateur de la transcription, fusionné à la protéine Y (2), sont construits et introduits à l'intérieur de la levure. L'interaction entre les deux protéines X et Y conduit à la reconstitution d'une protéine GAL4 fonctionnelle (3) et donc à l'activation de la transcription du gène reporteur contenant un site de liaison à GAL4. La protéine associée au domaine de liaison à l'ADN est appelée "appât". L'appât est généralement une protéine dont on recherche les partenaires cellulaires. La protéine associée au domaine activateur de la transcription est appelée "proie". La proie est souvent inconnue et les éléments d'une banque (ORféome par exemple) issus d'un type cellulaire donné, sont couplés au gène du domaine C-terminal de GAL4 (AD ou activating domain) pour identification des proies. Reproduit de http://www.biochimie.univ-montp2.fr/licence/interact_adn/facteur_trscript/gal4/introgal4.htm

2.1.2 ORFéome de *Brucella melitensis* et pool d'ORF's :

L'ORFéome utilisé au laboratoire est une banque d'ORF's (Open Reading Frame), constituée de 35 plaques 96 puits. Chaque puits contenant une des 3200 séquences codantes prédites du génome de *Brucella melitensis* clonées dans le plasmide donneur pDONR201. Des pools d'ORF's ont été réalisés à partir de l'ORFéome par Johann Mignolet (thèse en cours) et Alexandre Jamet (postdoctorat en cours). Toutes les ORF's appartenant à une même demi plaque ont été regroupées en un seul puits, 70 pools (puits) contenant chacun 48 ORF's ont ainsi été obtenus.

2.2 Double-Hybride appliqué à la recherche de l'AHL synthétase de *Brucella melitensis* :

2.2.1 AHL synthétase et acyle carrier protéine chez *Brucella melitensis* :

Le système double-hybride permet de détecter des interactions entre protéines. Il serait donc possible de détecter l'AHL synthétase par l'intermédiaire les interactions qu'elle fait avec ses partenaires protéiques supposés.

Comme expliqué dans l'introduction (chapitre 3.2.2), les molécules signal de type AHL's sont produites par une AHL synthétase à partir de S-adénosyl-L-méthionine (SAM) et d'une acyle carrier protéine (ACP) qui apporte le groupement acyle nécessaire à la formation des AHL's (Figure 17). Il y a donc lors de ce processus de synthèse une interaction entre l'AHL synthétase et l'ACP qui apporte la chaîne acyle.

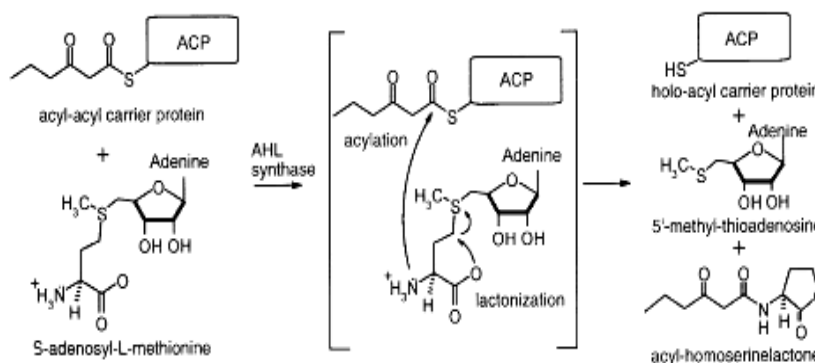


Figure 17 : Illustration du mécanisme général de la synthèse d'AHLs. Reproduit de (Watson et al., 2002).

L'ORFéome de *B. melitensis* contenant deux ORF's annotées comme étant des ACP, nous avons mis en place un crible double hybride utilisant celles-ci comme «appâts» afin de tenter d'identifier l'AHL synthétase de *Brucella melitensis* parmi l'ensemble des ORF's constituant l'ORFéome.

Les deux ORF's annotées comme étant des ACP's sont : BMEI1111 et BMEI1745. D'après les annotations de la banque, l'ORF BMEI1111 serait une ACP spécifique des longues chaînes acyles tandis que l'ORF BMEI1745 serait une ACP spécifique des courtes chaînes acyles. Ces deux ACP sont représentées à la figure 18 et partagent entre elles 29% d'identité.

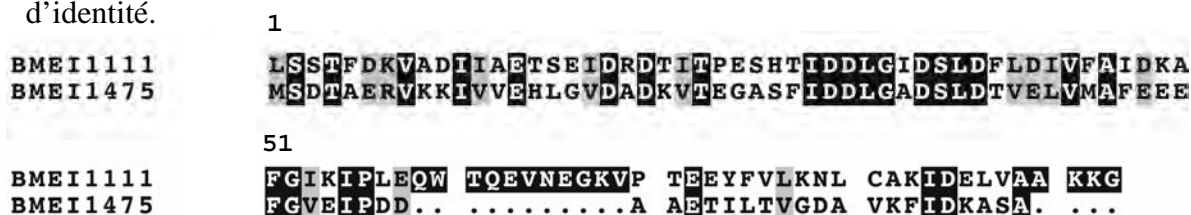


Figure 18 : Alignement des séquences des BMEI1111 et BMEI1475. Noir : acides aminés identiques ; gris : acides aminés similaires.

Bien que les seules AHL's détectées jusqu'à présent dans le milieu de culture de *B. melitensis* soient des AHL's pourvues de longues chaînes acyles, par mesure de prudence, nous avons utilisé les deux ACP's comme «appâts».

2.2.2 Obtention des vecteurs «appâts» pVV212-BMEI1111 et pVV212-BMEI1475 ainsi que les vecteurs «proies» pVV213-ORFéome :

Afin de réaliser ce test double hybride, nous avons utilisé des vecteurs «appâts», c'est-à-dire les vecteurs pVV212 dans lesquels ont été clonées les ACP's de *Brucella melitensis*. Le plasmide pVV212 permet la fusion des ACP's au domaine BD de Gal4 et porte le gène codant une enzyme intervenant dans la voie métabolique responsable de la synthèse de tryptophane. Dans ce but, une LR a été réalisée entre les plasmides pDONR201-BMEI1111 et BMEI1475 provenant du l'ORFéome non-poolé et les plasmides pVV212-vides (Figure 19).

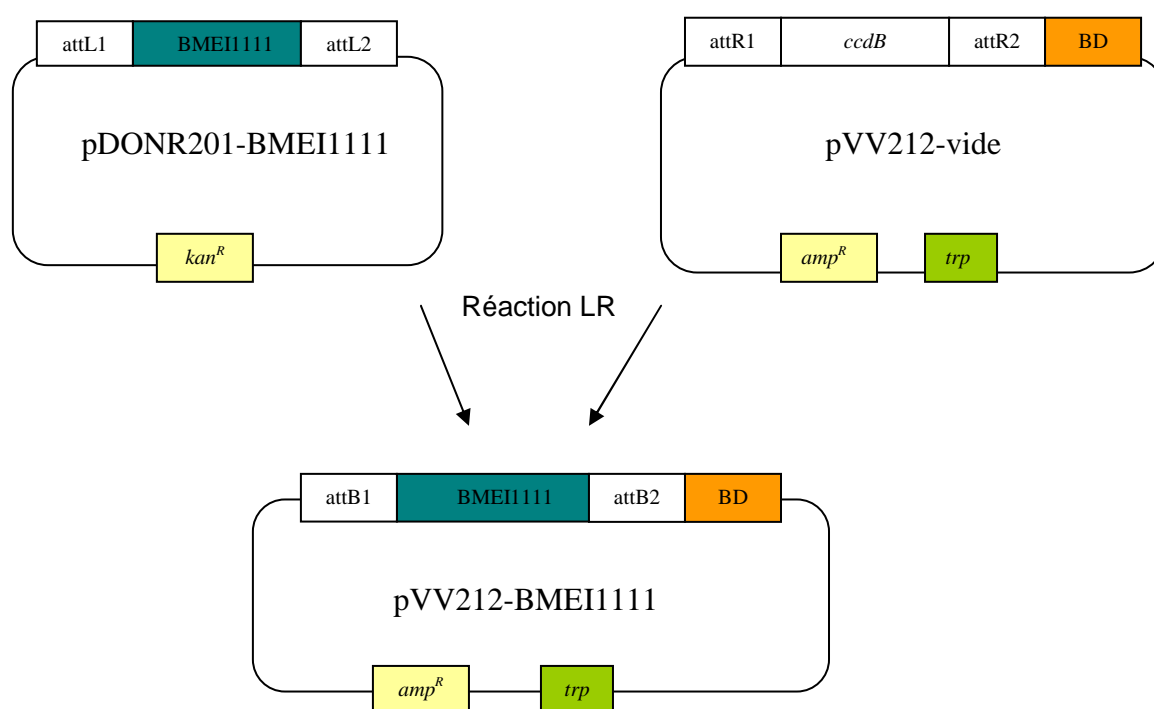


Figure 19 : Réactions LR entre le pDONR201-BMEI1111 et le pVV212 portant le BD de Gal4. *kan^R* : gène de résistance à la kanamycine, *amp^R* : gène de résistance à l'ampicilline, *trp* : gène responsable de la synthèse de tryptophane. La même réaction est réalisée entre le pDONR201-BMEI1475 et le pVV212 portant le BD de Gal4.

Des bactéries *E. coli* DH10B ont été transformées indépendamment avec le produit de ces deux réactions LR. Les transformants ont été sélectionnés sur LB ampicilline. Une mini-préparation a ensuite été effectuée afin de récupérer le matériel plasmidique. Chacune des mini-préparations a été soumise à une restriction diagnostique afin de vérifier la présence de l'insert dans le plasmide.

La construction des vecteurs «proies» ou pVV213 contenant chacun une ORF de l'ORFéome a été réalisée par Johann Mignolet (thèse en cours, voir matériel et méthode). Pour cela, des réactions LR ont été réalisées entre les 70 pools de pDONR201 et le plasmide pVV213. Le plasmide pVV213 permet la fusion des ORF's à l'AD de Gal4 et porte le gène codant une enzyme impliquée dans la voie métabolique responsable de la synthèse de leucine.

2.2.3 Transformation des levures MAV103 par les plasmides pVV212-BMEI1111 et pVV212-BMEI1475 ainsi que les levures MAV203 par pVV213-ORFéome :

Nous avons transformé la souche de levure haploïde MAV103 (Mat a) avec les plasmides pVV212-BMEI1111 et pVV212-BMEI1475 (BD-X). Les transformants ont été sélectionnés sur SD -TRP (marqueur d'auxotrophie TRP porté par le pVV212).

La souche de levure haploïde MAV203 (Mat α) a quant à elle été transformée avec les plasmides pVV213 issus des réactions LR avec les 70 pools de pDONR201-ORF's (AD-Y). Les transformants ont été sélectionnés sur SD -LEU (marqueur d'auxotrophie LEU2 porté par le pVV213) (Johann Mignolet, thèse en cours).

2.2.4 Crible Double-Hybride :

Afin de tester les interactions protéiques possibles entre les deux ACP's de *B. melitensis* et le reste de l'ORFéome, il a fallu réunir les plasmides dérivés du pVV212 et du pVV213 dans une seule et même souche de levure. Pour cela, un croisement entre les deux souches de levures haploïdes a été réalisé par la technique de mating (voir matériel et méthode). Ainsi, les souches haploïdes MAV103-pVV212-BMEI1111 et MAV103-pVV212-BMEI1475 (Mat a) ont été croisées avec les souches haploïdes MAV203-pVV213-ORF (Mat α). Les diploïdes obtenus ont été sélectionnés sur un milieu sans leucine ni tryptophane.

Chacun des clones ainsi obtenu a été repiqué dans une plaque 96 puits contenant du milieu SD-Leu-Trp liquide pour être ensuite déposé sur trois types de milieux qui sont en fait les trois tests qui vont nous permettre de déterminer si des interactions ont lieu entre les ACP's de *Brucella* et le reste de l'ORFéome.

➤ Test de croissance sur milieu SD -Leu -Trp -His +3AT

Ce test a été réalisé sur un milieu sans leucine ni tryptophane ni histidine, contenant du 3AT (1, 2, 4-triaminotriazole 20mM). Ce test fait intervenir le gène rapporteur *his3*. Ce gène code une imidazole glycérol phosphate déshydrogénase impliquée dans la biosynthèse de l'histidine. Son expression suite à la reconstitution du facteur de transcription Gal4 permet la croissance de la levure en absence d'histidine.

Cependant, le promoteur du gène *his3* présentant un niveau de transcription basal, il est courant d'utiliser du 3AT en faible concentration afin de supprimer ce bruit de fond, problématique pour l'interprétation des résultats. En effet, le 3AT est un inhibiteur de l'enzyme encodée par *his3*, enzyme qui restaure l'auxotrophie pour l'histidine (Durfée *et al.*, 1993).

➤ Test β -Galactosidase

Ce test a été réalisé avec un milieu YEPD sur lequel un test de coloration β -Galactosidase a été effectué. Ce test fait intervenir le gène rapporteur *lacZ* qui encode l'enzyme β -Galactosidase, dont l'activité est mise en évidence par un test de coloration (Walhout and Vidal, 2001). L'expression de *lacZ* suite à la reconstitution du facteur de transcription Gal4 permet la production de β -Galactosidase dont l'activité sera visualisée lors du test.

➤ Test de croissance sur milieu SD –Leu –Trp –Ura

Ce test a été réalisé sur un milieu sans leucine ni tryptophane ni uracile. Il fait intervenir le gène rapporteur *ura3*. Ce gène est un marqueur d'auxotrophie, indispensable à la survie des levures ne disposant pas d'un apport exogène d'uracile. L'expression d'*ura3* suite à la reconstitution du facteur de transcription Gal4 permet donc la croissance de la levure en absence d'uracile dans le milieu.

2.3 Analyse des résultats :

Les répliques velours ayant été réalisées sur milieux décrit ci-dessus, il a fallu attendre 4-5 jours pour que des clones apparaissent. Il a alors été possible de dénombrer pour chacune des ACP de *Brucella* le nombre de candidats interagissants capables de pousser sur les milieux sélectifs. Une levure capable de pousser sur milieux sélectifs est une levure dont l'activateur transcriptionnel Gal4 est fonctionnel et dans laquelle il y a interaction entre l'ACP de *Brucella* considérée et une ORF précise de l'ORFéome. Cependant, il existe des faux positifs et certains de ces tests sont plus sélectifs que d'autres. C'est pourquoi, un candidat d'interaction n'est considéré comme valable que lorsqu'il est positif pour au moins deux des trois tests effectués. Toutefois, n'ayant eu que peu de candidats pour l'ORF BMEI1111, ACP annotée comme étant spécifique des longues chaînes acyles (telle que celles produites par *Brucella*), nous avons également considéré dans ce cas les candidats positifs pour un seul test.

Ces critères de sélection nous ont permis de ressortir 40 candidats d'interaction dans le cas de la BMEI1475 (ACP aux courtes chaînes acyles) et 11 candidats d'interaction dans le cas de la BMEI1111 (ACP aux longues chaînes acyles) (Figure 20 : photographies du test β -galactosidase dans le cas de la BMEI1475).

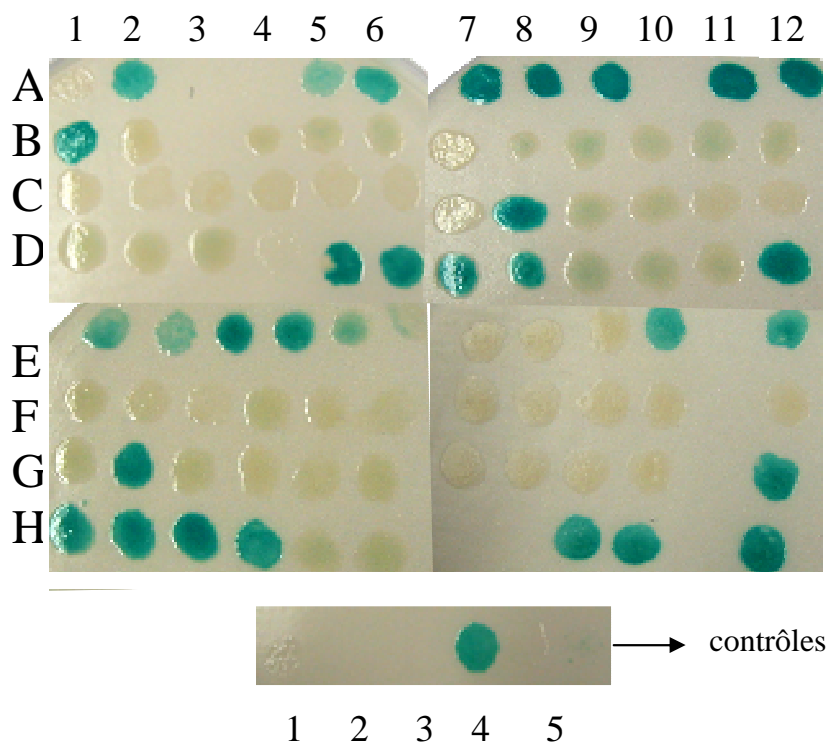


Figure 20 : Photographies du test β -galactosidase dans le cas de la BMEI1475. Les coordonnées correspondent à la position du candidat testé dans la plaque 96 puits. Les 5 contrôles utilisés sont :

- 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 full length + vecteur AD sans insert (contrôle positif)
- 5 : exprime une interaction relativement forte (entre DB-DP et AD-E2F)

Afin d'identifier chaque candidat, une PCR sur colonie a été pratiquée pour permettre d'amplifier la séquence nucléotidique de l'ORF codant la protéine interagissant avec les ACP's de *Brucella*. Les produits d'amplification PCR ont ensuite été purifiés sur colonne avant d'être séquencés. Les séquences nucléotidiques ont été utilisées pour effectuer un BLAST contre le génome de *Brucella melitensis*. On observe des séquences redondantes (candidats provenant d'un même pool). Au final, 25 ORF's ont été retenues (15 pour la BMEI1475 et 10 pour la BMEI111). Les BMEII0158, BMEII0149 et sont communes aux deux appâts utilisés. Les ORF's candidates ainsi que leurs fonctions prédites sont présentées à la figure 21.

Type d'ACP	ORF's candidates	Fonctions prédites	Répétitions
BMEI1475	BMEI1169	SSU ribosomal protein S9	11
	BMEI1547	ATP synthase	1
	BMEII0771	hydroxy-acyl glutathione hydrolase	7
	BMEI0147	intégrase/recombinase	2
	BMEI1379	régulatory protein Bet I	3
	BMEII0443	hypothetical protein	4
	BMEII0091	replication protein C	1
	BMEI0100	hypothetical protein	1
	BMEI0946	NAD (FAD) utilizing dehydrogenase	2
	BMEII0158	two composants response regulator	1
	BMEI1900	cytochrome o ubiquinol oxydase subunit I	1
	BMEI1787	probable sigma 54 modulation protein	2
	BMEI1408	transposase	1
	BMEII0149	sérine protéase	1
	BMEI1357	DivJ	1
BMEI1111	BMEII0284	periplasmic dipeptide transport protein precursor	1
	BMEII0158	two composants response regulator	2
	BMEII0149	sérine protéase	1
	BMEI1173	hypothetical membrane spanning protein	1
	BMEII0917	hypoythetical protein	1
	BMEII0091	replication protein C	1
	BMEI0764	LSU ribosomal proteine L16B	1
	BMEII0338	ABC transporter substrate binding protein	1
	BMEII0914	acriflavin resistance protein A précurseur	1
	BMEI0587	COML : competence lipoprotein	1

Figure 21 : Tableau reprenant la liste des ORF's codant des protéines capables d'interagir avec les ACP's BMEI1111 et BMEI1475 de *B. melitensis* ainsi que leurs fonctions prédites respectives. La dernière colonne représente le nombre de fois que les candidats ont été repêchés au cours du test double hybride.

Conclusions et perspectives

D) Conclusions et perspectives:

Lors de ce mémoire sur la bactérie pathogène Gram négative *Brucella melitensis*, deux orientations de recherches ont été suivies. La première consistait à caractériser l'AHL acylase putative de *B. melitensis* découverte suite à la présence d'homologies de séquences protéiques avec l'AHL acylase de la bactérie Gram négative *Ralstonia*. La seconde, consistait quant à elle à rechercher l'AHL synthétase nécessaire à *Brucella* pour produire ses AHL's.

1) Caractérisation de l'AHL acylase putative de *B. melitensis* :

1.1 Analyse de l'activité de dégradation de l'AHL acylase putative de *Brucella melitensis* :

Dans l'éventualité où le gène *aiiD* de *B. melitensis* a une fonction AHL acylase, nous devrions observer une diminution de la présence d'AHL's synthétiques dans le surnageant d'une culture de *E. coli* surexprimant l'AHL acylase putative. De plus, du fait que l'AHL acylase putative de *B. melitensis* contient un codon stop dans sa séquence codante, nous nous sommes demandé quel pouvait être son rôle et si il avait un effet sur la production de la protéine et donc sur le taux de dégradation des AHL's.

Les résultats obtenus lors des tests de dégradation (voir figures 4 et 5 des résultats) nous indiquent une diminution significative du taux d'AHL's synthétiques dans le surnageant de culture de *E. coli* surexprimant *aiiD*_{melitensis} de *Brucella melitensis*. Cette diminution est observée dans le cas d'AHL's synthétiques à courtes, moyennes ou longues chaînes acyles et possédant une substitution oxo sur le troisième carbone de la chaîne acyle. Il semble donc que l'AHL acylase putative de *Brucella* soit capable de dégrader une large gamme d'AHL's, même si la dégradation des AHL's à longues chaînes acyles est 10% supérieure à celles des AHL's à courtes ou moyennes chaînes acyles (Tableau 1). Cette observation pourrait être mise en relation avec le fait que *Brucella melitensis* produit des AHL's à douze atomes de carbone.

Par ailleurs, le codon stop ne semble pas affecter outre mesure la capacité de *AiiD*_{melitensis} à dégrader les molécules signal même si une différence est observable lorsque l'on compare son activité de dégradation avec celle de l'AHL acylase de *B. suis*, laquelle ne possède pas de codon stop dans sa séquence codante.

AHL acylases et AHL's considérées	% de dégradation
<i>AiiD</i> _{melitensis} + C ₄ -HSL	85,9
<i>AiiD</i> _{suis} + C ₄ -HSL	89,9
<i>AiiD</i> _{melitensis} + C ₈ -HSL	84,2
<i>AiiD</i> _{suis} + C ₈ -HSL	90,5
<i>AiiD</i> _{melitensis} + C ₁₂ -HSL	93,1
<i>AiiD</i> _{suis} + C ₁₂ -HSL	97,8

Tableau 1 : Tableau reprenant les pourcentages de dégradation des AHL's suivant leurs types (C₄-HSL, C₈-HSL et C₁₂-HSL et l'AHL acylase considérée (*AiiD*_{melitensis} ou *AiiD*_{suis}).

Dès lors, nous pouvons en conclure que *AiiD*_{melitensis} a bien une activité de dégradation envers les AHL's et qu'elle est active malgré la présence du codon stop dans sa séquence codante.

1.2 Analyse de la production de l'AHL acylase de *Brucella melitensis* :

Une fois l'AHL acylase de *B. melitensis* définie comme étant fonctionnelle chez *E. coli*, nous avons suivi son expression chez *B. melitensis* le long d'une courbe de croissance.

Aucune donnée n'étant disponible dans la littérature quant à la régulation de l'AHL acylase le long d'une courbe de croissance. Nous nous sommes demandé ce qu'il en était chez *Brucella*, organisme capable de produire des AHL's et potentiellement de les dégrader. Il apparaît d'après les résultats obtenus (voir figure 7, résultats) que l'AHL acylase est exprimée chez *B. melitensis* aux temps 20 et 24 heures. Ces résultats sont cohérents avec ce que nous connaissons actuellement sur le Quorum Sensing de *Brucella*. En effet, nous savons que le pic d'expression de l'opéron *virB* (indispensable à la virulence) se situe aux temps énoncés ci-dessus (Delrue *et al.*, 2005). Or, nous savons que les AHL's répriment l'expression de cet opéron. Dès lors, l'expression de l'AHL acylase dans cet intervalle de temps permettrait la dégradation des AHL's, levant ainsi la répression qu'elles exercent sur l'opéron *virB*.

Cette hypothèse doit encore être vérifiée en suivant la production de l'AHL acylase en utilisant une autre méthode.

1.3 Analyse de la sécrétion de l'AHL acylase de *Brucella melitensis* :

L'AHL acylase étant fonctionnelle chez *E. coli* et exprimée chez *B. melitensis*, nous avons voulu voir si elle était sécrétée dans le milieu et si le cas échéant, cette sécrétion était dépendante de l'appareil de sécrétion de type IV. En effet, d'après la littérature, les AHL acylases sont sécrétées dans le milieu et pourraient ainsi dégrader les AHL's ou celles d'espèces concurrentes perturbant ainsi leur système de régulation.

Suite au Western-blot effectué, aucune trace d'AHL acylase taggée 13myc n'a été détectée, et cela que ce soit dans le surnageant ou dans le culot de toutes les souches de *Brucella* considérées. Suite à ce résultat, nous ne pouvons pas tirer de conclusions quant à la régulation de l'AHL acylase le long d'une courbe de croissance. En effet, l'AHL acylase n'étant pas détectée dans les culots bactériens, il nous est impossible de déterminer si sa production a bien eu lieu et si elle est sécrétée par *virB*. Une hypothèse permettant d'expliquer ces résultats serait que la fusion du tag 13myc à l'AHL acylase entraînerait sa déstabilisation et donc sa protéolyse. Pourtant, il a été montré au laboratoire que ce tag est fonctionnel chez *Brucella*. Il a notamment servi à valider la sécrétion de la protéine Tir (Matthieu Terwagne, mémoire 2006).

1.4 Caractérisation de la taille de l'acylase :

L'AHL acylase étant produite chez *Brucella*, nous avons essayé de la caractériser plus amplement. La littérature faisant référence au fait que l'AHL acylase de *Pseudomonas aeruginosa* est composée de deux sous-unités, nous nous sommes demandé si il en était de même pour l'AHL acylase de *Brucella*. *AiiD_{melitensis}* étant annotée dans le génome sous la forme de deux ORF's, nous avons calculé pour chacune d'elles leurs tailles protéiques prédites.

D'après les résultats, l'AHL acylase de *Brucella melitensis* semble être composée de deux sous-unités dont les poids moléculaires avoisinent 60 et 28 kDa (Tableau 2).

ORF considérée	Taille prédite en kDa	Taille obtenue en kDa
BMEII0211	34,9	28
BMEII0212	51,2	60

Tableau 2 : Tableau reprenant les tailles prédites et obtenues suite à un gel de polyacrylamide des deux ORF's recouvrant la séquence de *aiiD*.

Ces résultats pourraient s'expliquer de deux façons : (i) le codon stop n'empêche pas le passage du ribosome lors de la traduction, il en résulte une seule grande protéine qui serait clivée post-traductionnellement. (ii) chacune des deux ORF's constituant l'AHL acylase encode une des deux sous-unités. Au vu des résultats obtenus, il n'est pas possible de privilégier l'une de ces deux hypothèses. Afin de pouvoir argumenter en faveur d'une des deux hypothèses citées ci-dessus, il faudrait tagger en N-term et C-term *AiiD_{suis}* laquelle ne possède pas de codons stop dans sa séquence codante. L'observation éventuelle d'une similarité de taille entre les sous-unités d'*AiiD_{suis}* et *AiiD_{melitensis}* favoriserait l'hypothèse selon laquelle il existe chez *Brucella* des phénomènes de passage de codon stop. Ce mécanisme semble par ailleurs assez répandu chez *Brucella*, de nombreuses séquences codantes contenant un codon stop.

1.5 *aiiD* de *B. melitensis* : AHL acylase ou pénicilline acylase :

Suite au test de dégradation d'AHL's effectué, il apparaît clairement que le gène *aiiD_{melitensis}* encode une AHL acylase fonctionnelle. Cependant, les annotations du génome définissent l'acylase de *Brucella* comme étant une pénicilline acylase. L'AHL acylase de *Brucella* pourrait alors être responsable de la résistance naturelle à la pénicilline de *B. melitensis*.

Toutefois, les résultats obtenus nous indiquent que les souches de *Brucella* délétantes pour *aiiD* résistent toujours à la pénicillineG, ce qui suggère que l'acylase de *Brucella* n'est pas responsable de la résistance à la pénicilline comme annotée dans le génome. Nous pouvons donc conclure à ce stade que le gène *aiiD* de *Brucella melitensis* encode une AHL acylase.

Ces constatations ne sont pas surprenantes dans la mesure où l'on sait que certaines des souches de *Brucella* possédant le gène *aiiD* annoté comme étant des pénicilline acylases et sont naturellement sensibles à la pénicilline (*B. abortus* et *B. suis*).

1.6 Analyse de l'activité du promoteur de l'AHL acylase de *B. melitensis* :

Afin d'analyser l'activité du promoteur de l'acylase (*PaiiD*) le long d'une courbe de croissance, nous avons cloné la région promotrice d'*aiiD_{melitensis}* dans le plasmide dénommé pJD27 que nous avons introduit chez *B. melitensis*. Cependant, malgré tous nos efforts, il s'est avéré impossible d'obtenir des clones recombinants et cela, quelque soit la technique mise en œuvre pour introduire le plasmide dans *Brucella*.

1.7 Conclusions générales :

Les résultats obtenus nous permettent d'affirmer que le gène *aiiD* de *B. melitensis* encode une AHL acylase fonctionnelle. Nous avons en effet prouvé qu'elle était capable de dégrader divers types d'AHL's se distinguant de par la longueur de leurs chaînes acyles ou de par la présence d'une substitution oxo sur le troisième atome de carbone. Cette enzyme s'avère être composée de deux sous-unités d'environ 28 et 52 kDa. L'AHL acylase semble être produite tout le long de la courbe de croissance de *B. melitensis*, même si il ne nous est pas possible de caractériser avec précision son taux de production. Jusqu'à présent, nous n'avons pas été capables de démontrer que l'AHL acylase de *B. melitensis* était sécrétée dans le milieu même si il semble que ce soit le cas chez d'autres espèces bactériennes comme *Ralstonia* ou *Pseudomonas aeruginosa*.

L'annotation du génome selon laquelle le gène *aiiD* encoderait une pénicilline acylase ne semble pas exacte. Le fait que l'annotation soit erronée n'est pas surprenant dans la mesure où les annotations ont été réalisées sur base des homologies de séquences protéiques que partageait *Brucella* avec d'autres organismes (Lin *et al.*, 2003). Ces annotations ayant été réalisées avant la découverte de la première AHL acylase, il est normal qu'elles ne définissent pas *aiiD*_{melitensis} comme étant une AHL acylase.

1.8 Perspectives :

Ayant vérifié l'activité de dégradation de l'AHL acylase de *B. melitensis* en la surexprimant chez *E. coli*, une perspective intéressante serait de faire de même chez *B. melitensis*. Cette étape est en effet indispensable pour valider la fonction d'AHL acylase de AiiD chez *Brucella*. Déterminer le rôle éventuel du codon stop situé au milieu de la séquence codante d'*aiiD* chez *B. melitensis* s'avère être également une perspective attrayante surtout lorsque l'on sait qu'il n'est pas présent chez d'autres espèces de *Brucella*. Nous pourrions par exemple étudier les mécanismes qui permettraient le passage du ribosome par-dessus ce stop lors de la traduction. Il serait notamment intéressant d'effectuer des mutagenèses dirigées afin de changer la nature du stop présent dans *aiiD*_{melitensis} et de vérifier si cette modification influence l'activité de dégradation de l'AHL acylase. Un test de dégradation d'AHL effectué avec une souche de *Brucella* surexprimant l'une ou l'autre des deux ORF's constituant la séquence codante de *aiiD*_{melitensis} permettrait de définir si l'une de ces sous-unités est responsable de l'activité AHL acylase ou si cette fonction dépend de l'ensemble des sous-unités.

Au vu de l'échec rencontré dans le cas de la sécrétion de l'AHL acylase, nous pourrions refaire le test de sécrétion avec un plus petit tag dont la taille permettrait une éventuelle sécrétion (tag 3HA ou tag FLAG). Il serait également souhaitable d'étudier de manière plus approfondie la régulation de l'expression de l'AHL acylase à travers l'activité de son promoteur. En effet, le clonage du promoteur de l'AHL acylase dans le pJD27 s'étant révélée infructueuse, il serait bon de la réitérer en clonant cette fois-ci *PaiiD* dans un autre type de plasmide équipé d'un système rapporteur.

2) Recherche de la synthétase d' AHL's de *B. melitensis* :

2.1 Avantages et inconvénients d'une approche double hybride :

La technique double hybride est une technique qui permet de déceler des interactions entre protéines. Cette technique possède comme tout autre technique de génie génétique des avantages et des inconvénients qu'il convient de connaître afin de pouvoir analyser les résultats en toute objectivité. L'approche double hybride est une approche dite de «haut débit» car elle permet de tester un très grand nombre d'interactions en peu de temps. Cette stratégie, bien qu'étant difficilement réalisable dans le cas des protéines membranaires, permet cependant de détecter des interactions de faibles affinités. Toutefois, cette capacité à détecter des interactions de faibles affinités engendre également l'obtention de nombreux faux positifs parmi les candidats obtenus, ce qui peut par conséquent fausser complètement les résultats.

Typiquement, on distingue trois cas de faux positifs : (i) les candidats positifs dit «auto-activateurs», capables d'activer la transcription des gènes rapporteurs indépendamment de toute interaction avec la seconde protéine de fusion (ii) les candidats positifs capables d'activer la transcription des gènes rapporteurs suite à l'interaction qu'établit une protéine intermédiaire et propre au système de la levure avec les deux protéines de fusion (triple hybride). (iii) les candidats positifs capables d'activer la transcription des gènes rapporteurs suite à une interaction qui s'avèrerait impossible dans l'organisme d'intérêt (temporellement ou spatialement).

Des cas de faux négatifs, c'est-à-dire les candidats capables d'interagir dans l'organisme d'intérêt mais qui ne sont pas mis en évidence par double hybride peuvent également être rencontrés. Ils peuvent être dû à différentes situations rencontrées chez la levure. Citons par exemple, le cas où, il manquerait chez la levure un élément particulier, spécifique de l'organisme étudié et pourtant nécessaire à l'activation de la protéine de fusion et/ou à ses éventuelles interactions. Nous pourrions également imaginer un candidat dont l'AD ou le BD masquerait son domaine d'interaction, l'empêchant ainsi de lier son partenaire protéique. Des modifications post-traductionnelles pourraient avoir lieu et engendrer un changement de conformation qui ne pourrait dès lors plus interagir avec un éventuel partenaire. Les possibilités d'événements conduisant à l'obtention d'un faux négatif sont loin d'être exhaustives et leur nombre est inconnu.

Cependant, il est bon de rappeler que le double hybride ne constitue qu'une première étape dans la recherche de couples d'interactants et qu'il est nécessaire de confirmer les interactions ainsi découvertes par d'autres techniques telle que la co-immunoprécipitation.

2.2 Analyse des résultats obtenus par double hybride :

Suite à notre analyse double hybride utilisant les ACP's comme «appâts» afin de mettre en évidence l'ORF codant pour l'AHL synthétase de *Brucella*, 25 candidats furent obtenus dont trois étaient communs aux deux ACP considérées (BMEII0091, BMEII0149 et BMEII0158, voir résultats figure 21). Dans le cas de la recherche de l'AHL synthétase de *Brucella*, un bon candidat serait une ORF pour laquelle aucun homologue ne serait présent chez des organismes pour lesquels l'AHL synthétase est décrite (*Pseudomonas aeruginosa*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Vibrio fisheri*, etc.). En effet, n'ayant pas découvert par

alignements de séquences protéiques d'homologues aux familles d'AHL synthétase habituelles chez *Brucella*, nous nous attendons à mettre en évidence un autre type d'AHL synthétase. Néanmoins, la prudence est de mise à ce stade et nous ne pouvons pas encore privilégier un candidat par rapport à un autre. En effet, les annotations du génome étant faites sur base d'homologies de séquences protéiques, elles ne représentent pas forcément la fonction réelle de la protéine encodée par l'ORF.

Les ACP's utilisées comme «appât» dans notre système double hybride sont des protéines très conservées. Elles sont bien étudiées et connues pour interagir avec bon nombre de protéines car intervenant notamment dans des voies métaboliques telles que : la synthèse des acides gras et la synthèse des lipides. Des techniques de tap-tagging et de double hybride chez *E. coli* ont permis de déterminer avec précision plusieurs interactants des ACP's.

Dès lors, une manière de valider les résultats obtenus suite au double hybride réalisé consiste à rechercher les homologies de séquences protéiques qu'ils partagent avec les protéines connues pour interagir avec l'ACP de *E. coli*. La présence d'homologies de séquences protéiques entre eux nous aurait fourni un critère supplémentaire pour valider notre test double hybride, nous assurant que les candidats obtenus n'étaient pas des faux positifs.

Il s'avère qu'aucun de nos candidats ne possède d'homologies de séquences protéiques avec les protéines interagissant avec l'ACP chez *E. coli*. Ce constat nous amène à penser que nous n'avons probablement pas détecté tous les interactants des ACP's.

Un moyen de dépister les faux positifs consiste à vérifier que certains des candidats obtenus lors de notre test double hybride ne se retrouvent pas dans les résultats d'autres tests doubles hybrides effectués pour l'instant au laboratoire avec le même pool et ayant trait à une tout autre projet d'étude. Un tel cas a notamment été rencontré pour la BMEI0587 (COML : compétence lipoprotéine) et la BMEI0338 (ABC transporter substrate binding protein) également identifiés lors d'un test double hybride utilisant comme appâts les protéines DivK et PdhS (Yohann Mignolet, thèse en cours). Il y a donc de fortes probabilités pour que ces deux candidats soient des faux positifs.

Cependant, les résultats d'interactions obtenus doivent avant tout être confirmés au cas par cas et non plus à partir de pools. Cette étape de confirmation consiste à recommencer le test double hybride pour chacun des 25 candidats issus du premier test afin de vérifier les interactions (manipulation en cours). Une confirmation par co-immunoprécipitation devra également être réalisée.

2.3 Perspectives :

Les ORF's candidates s'avérant encoder suite aux tests de confirmation des interactants fiables des ACP's devront être surexprimées chez *Brucella* afin de réaliser des cocultures avec un biosenseur à AHL's. Un tel test nous permettrait éventuellement de mettre en évidence une augmentation significative d'AHL's dans le milieu, trahissant ainsi la fonction AHL synthétase de l'ORF candidate considérée. Une autre stratégie consisterait à tester la production d'AHL dans les mutants des gènes candidats à l'aide de biosenseurs. Une fois l'ORF encodant l'AHL synthétase mise en évidence, il serait intéressant d'étudier l'impact sur la virulence d'un mutant de délétion lors d'une infection cellulaire ou murine. Nous pourrions également déterminer quand l'AHL synthétase est produite lors d'une infection et comparer cette production en cellule et *in vitro* avec celle de l'AHL acylase. Dans l'éventualité où l'AHL synthétase ne figurerait pas parmi les candidats obtenus par double hybride, nous pourrions mettre au point une technique de tap-tagging utilisant les ACP's

comme appâts. Il va sans dire que la découverte de l'AHL synthétase de *Brucella* permettrait très certainement une avancée importante dans la compréhension du mécanisme infectieux de cette bactérie pathogène sur laquelle il reste tant à découvrir.

Matériel et méthodes

E) Matériel et méthodes

1). Matériel

1.1 Solutions et milieux

1.1.1 Solutions d'antibiotiques et autres

Noms et abréviations	Solution de dissolution	Concentration stock	Concentration finale
Acide nalidixique (Nal)	NaOH 0,2N	25 mg/ml	25 µg/ml
Ampiciline (Amp)	H ₂ O	100 mg/ml	100 µg/ml
Carbéniciline	H ₂ O	50 mg/ml	50 µg/ml
Chloremphénicol (Cm)	EtOH 100%	20 mg/ml	20 µg/ml
Isopropyl-β-D- thiogalactopyranoside (IPTG)	H ₂ O	1 M	1 mM
Kanamycine (Kan)	H ₂ O	50 mg/ml	50 µg/ml
Streptomycine (Sm)	H ₂ O	10 mg/ml	10 µg/ml
5-bromo-4-chloro-3-indoyl-βD- galactopyranoside (X-gal)	diméthylformamide	20 mg/ml	20 µg/ml

Tableau 1 : Solutions d'antibiotiques et autres utilisées dans ce mémoire

1.1.2 Milieux de culture

Tous les milieux décrits ci-dessous sont autoclavés 20 minutes à 120°C. Ils sont ensuite refroidis à 55°C puis additionnés d'antibiotiques ou d'autres additifs avant d'être coulés dans des boîtes de Petri.

➤ Milieu riche pour E. coli : milieu LB (Luria Bertani)

Hydrolysate de caséine (peptone Gibco BRL)	10g/l
NaCl	5g/l
Yeast extract	5g/l
Agar	1,5% (pour du LB solide)

➤ Milieu riche pour Brucella : milieu 2YT

Ce milieu a une concentration en Yeast extract 2 fois plus élevée que le milieu LB.

➤ Milieu pour levures : milieu non-sélectif (YEPD : yeast extract bacto- peptone D-glucose)

Glucose	20 g/l
Bactopeptone	20 g/l
Yeast extract	10 g/l
Agar	20 g/l (pour du YEPD solide)

➤ Milieu pour levures : milieu sélectif

Composition du milieu SD auquel on ajoute ensuite certains acides aminés :

Yeast nitrogen base w/o a.a	6,75g/l
Glucose	20g/l
Agar	20g/l (pour du SD solide)

1.1.3 Solutions d'acides aminés

Uracile	2g/l
Histidine	3g/l
Adénine	2g/l
Lysine	2g/l
Méthionine	10g/l
Leucine	3g/l
Tryptophane	2g/l

(le tryptophane est à conserver à l'abri de la lumière à 4 C°)

Ces solutions stocks d'acides aminés sont diluées 100X dans le milieu après autoclavage

1.2) Souches et plasmides

Les souches et les plasmides utilisés dans le cadre de ce mémoire sont référencés dans le tableau 2.

2). Méthodes

2.1) Techniques relatives à l'ADN

2.1.2 Extraction d'ADN plasmidique

Ces techniques permettent d'isoler et de purifier les plasmides produits par des 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. Le protocole pour la minipréparation ainsi que pour la maxipréparation d'ADN génomique est disponible dans le manuel "Plasmid DNA Purification" de Macherey-Nagel ainsi qu'en annexe.

2.1.3 Restriction d'ADN plasmidique purifié

Les enzymes de restriction sont des endonucléases qui permettent de cliver l'ADN double-brin de manière spécifique: elles reconnaissent des sites constitués par une séquence souvent palindromique. La coupure peut être décalée d'un brin par rapport à l'autre, formant ainsi des "bouts protrudants", ou bien des bouts francs. Les enzymes de restriction et leurs tampons sont fournis par Roche Molecular Biochemical et Biolabs.

2.1.3.1 Restriction diagnostique

La restriction diagnostique permet d'identifier des plasmides selon les sites de restrictions qu'ils possèdent et de quantifier l'ADN. L'ADN restreint est séparé selon la taille des fragments par une électrophorèse en gel d'agarose.

- Mélanger dans un Eppendorf :

- 1 à 2 µl d'ADN plasmidique purifié.
- Entre 2 et 10 unités d'enzyme par µg d'ADN
- 2 µl de tampon de restriction 10X
- Porter le volume à 20 µl avec de l'H₂O distillée stérile.

- Incubation d'une heure et trente minutes à 37°C. La température peut cependant varier en fonction de l'enzyme utilisée.

- Ajouter 1/10ième de tampon de dépôt d'électrophorèse et déposer sur gel d'agarose.

2.1.3.2 Restriction préparative

La restriction préparative permet de restreindre des plasmides ou fragments d'ADN en vue de constructions futures. Préalablement à la restriction, il faut calculer:

- La quantité nécessaire d'ADN à restreindre pour la ligation. La ligation nécessite un minimum de 200 ng du plus gros fragment.
- La quantité d'enzyme nécessaire pour une restriction optimale.
- Le temps d'incubation à la température *ad hoc* est de deux heures.

2.1.6 Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser sera donc inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer. Un marqueur de taille (Figure 1) est co-migré à côté des échantillons afin d'estimer la taille et la concentration des fragments d'ADN. Le bromure d'éthidium ajouter dans le gel s'intercale entre les bases de la double hélice d'ADN qui est alors visible sous les UV. La fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille mais également à la quantité d'ADN présente. Ainsi en connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de taille, nous pouvons estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison à l'intensité de la fluorescence.

Méthode : -Préparer le volume de gel souhaité : dissoudre 0,8 à 2% d'agarose dans du tampon TAE 1X.
 -Porter à ébullition. Quand la solution est tiède, couler le gel sur le support *ad hoc* muni d'un peigne permettant de faire les puits de chargement et ajouter 7 µl de bromure d'éthidium (2mg/ml) avant la polymérisation du gel.
 -Après solidification de l'agarose, immerger le gel dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon TAE1 X.
 -Déposer les échantillons dans les puits. Le volume à déposer dépend de la concentration en protéines de l'échantillon.
 -Migration : l'ADN chargé négativement migre de la borne négative vers la borne positive. La différence de potentiel appliquée est de 100V. L'ADN est visualisé sous UV.

Les solutions sont reprises en annexe.

2.1.7 Extraction d'ADN d'un gel d'agarose

Cette technique permet de récupérer un fragment d'ADN d'intérêt d'un gel d'agarose isolé au cours de l'électrophorèse, principalement afin d'utiliser ce fragment dans des constructions futures. Le Kit MBI Fermentas est utilisé. Cette méthode repose sur l'utilisation de billes de silices auxquelles l'ADN adhère spécifiquement, les sels et les impuretés peuvent ainsi être éliminés. Le protocole est disponible dans le "DNA Extraction Kit" de MBI Fermentas et en annexe.

2.1.8 Réaction de ligation

Pour lier de manière covalente des fragments d'ADN, l'enzyme ADN ligase du phage T4 est utilisée. Elle catalyse la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyle 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' d'une extrémité proche. Pour être active l'enzyme nécessite la présence d'ATP et d'ions Mg⁺⁺. Le protocole est disponible dans le guide technique de la "T4 DNA Ligase" d'Invitrogen et en annexe.

2.1.9 Test blanc-bleu ou α -complémentation

La β -galactosidase est une enzyme responsable de la dégradation du galactose en lactose+glucose. Des souches bactérienne, mutantes dans le gène *lacZ* (*lacZ'*), synthétisent une β galactosidase incomplète (dépourvue d'une séquence appelée peptide α) et inactive. La séquence codant le peptide α peu être apportée en trans par un plasmide; seul, le peptide α n'a aucune activité enzymatique, mais conjugué avec la protéine codée par *lacZ'* il restaure l'activité β galactosidase de la protéine mutante.

L'activité de la β galactosidase peut être facilement visualisée in vivo grâce à un test coloré, en remplaçant le substrat naturel de l'enzyme(galactose) par du X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside). Incolore, le X-gal donne un produit bleu lorsqu'il est clivé par l'enzyme. Il suffit donc d'ajouter du X-gal au milieu de culture des bactéries pour visualiser la présence d'une enzyme β -galactosidase active: c'est l' α complémentation (Ullman, Jacob et Monod).

Cette propriété a été utilisée dans de nombreux vecteurs de clonage pour distinguer les bactéries véhiculant un vecteur recombinant de celles qui véhiculent un vecteur non recombinant. Pour cela, le segment du gène *lacZ* codant le peptide α est placé à cheval sur les sites de clonage. Lorsque l'ADN est inséré à ce niveau, il interrompt le peptide α et les colonies bactériennes apparaissent blanches sur les boîtes de Pétri. Par contre, si aucun ADN n'est inséré, l' α complémentation peut avoir lieu et les bactéries apparaissent bleues.

2.1.10 Clonage Gateway™

Ce système se base sur le processus de recombinaison du phage *Lambda* dans le génome d'*E. coli* La réaction d'intégration (appelée réaction BP) se déroule entre deux séquences d'ADN spécifiques : le site attP situé dans l'ADN du phage et le site attB situé dans le génome bactérien. Cette réaction d'intégration fait appel à deux enzymes : l'intégrase du phage (produit du gène Int) et une protéine bactérienne IHF (integration host factor) et est réversible. Le phage peut exciser son ADN de celui de *E. coli* (réaction LR) par recombinaison entre les sites attL et attR. Cette réaction nécessite l'intégrase et la IHF, mais aussi l'excisionase (produit du gène Xis du phage). Ce système a été adapté au clonage en laboratoire. La sélection des clones recombinants se fait généralement par l'excision d'une cassette contenant le gène suicide *ccdB*, toxique pour certaines souches d'*E. coli*.

Réaction LR

Cette réaction permet de cloner un gène d'intérêt issu de l'ORFéome de *B. melitensis* dans un vecteur d'intérêt.

- On place dans un tube PCR :
- 150 ng de vecteur de destination.
- 3 μ l de clone d'entrée (150ng par réaction).
- 2 μ l de tampon de réaction : 5x LR Clonase™ reaction buffer, dans le Gateway® LR Clonase™ enzyme mix, Invitrogen Cat.No.11791043
- 2 μ l de mix LR Clonase (Int, Xis, IHF) : Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix, Invitrogen Cat.No.11791043
- ajout d'H₂O pour arriver à 10 μ l de volume final et incubé sur la nuit à 25C°
- Transformer 80 μ l de bactéries CaCl₂ compétentes avec 5 μ l de produit de la réaction.

2.1.11 Polymerase Chain Reaction (PCR)

La PCR (Polymerase Chain Reaction) permet l'amplification de fragments d'ADN. Des amorces nucléotidiques d'environ 20 bases, complémentaires de la séquence se trouvant de chaque côté de la région-cible, s'hybrident chacune à un des deux brins. Une ADN polymérase thermostable est utilisée pour synthétiser à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque amorce un brin d'ADN.

Un cycle PCR comprend 3 étapes:

- La dénaturation, à 95°C, permet de séparer les deux brins.
- L'hybridation des amorces s'effectue à une température dépendante de la température de melting des amorces utilisées, c'est-à-dire entre 50 et 72°C.
- L'élongation, à 72 °C, permet la polymérisation des brins.

En répétant ce cycle une trentaine de fois, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies de la région cible. La température d'hybridation utilisée est inférieure à la température de melting (T_m) des amorces. Celui-ci se calcule de la façon suivante: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$. Les amorces devront contenir environ le même pourcentage de bases G-C que l'ADN cible.

Méthode :

Le mélange de réaction est réalisé dans un Eppendorf pour PCR:

- 2 µl de primer 1 (10 µM).
- 2 µl de primer 2 (10 µM).
- 4 µl de dNTPs 20 mM chacun.
- 10 µl de tampon d'ADN polymérase (Taq ou Pfx) concentrée 5X.
- environ 250 ng d'ADN portant la région à amplifier appelée (matrice).
- 0,3 µl de Taq polymérase (Biotools) ou Pfx (Invitrogen)
- de l'eau distillée et stérile pour porter le volume final à 50 µl.

Pour vérifier l'amplification du fragment cible, déposer 1/10 de la réaction PCR sur gel d'agarose.

Les amorces utilisées durant ce mémoire sont reprises au tableau 3.

Témoin négatif :

La PCR est réalisée sans matrice, cela permet de vérifier que les composés nécessaires à la réaction ne sont pas contaminés par de l'ADN étranger.

2.2) La conjugaison bactérienne

La conjugaison entre bactéries Gram négatives est un transfert latéral de matériel génétique. La bactérie donneuse transfère un plasmide conjugatif vers une bactérie receveuse. La conjugaison se fait grâce à un contact entre bactéries, via un pili sexuel. La souche donneuse possède le plasmide RP4 intégré dans son chromosome. Ce plasmide code les protéines nécessaires au transfert conjugatif. Le plasmide d'intérêt doit quant à lui contenir une origine de transfert ($oriT$).

Méthode :

- Ensemencer, d'une part, 10 ml de LB liquide avec des *E. coli* S17 (RP4+) donneuses contenant le plasmide d'intérêt avec l'antibiotique approprié. D'autre part, ensemencer 10 ml de 2YT liquide avec une colonie de *Brucella* receveuse (Nal^R).

- Incuber les deux précultures durant une nuit à 37°C sous agitation.
- Le jour de la conjugaison, prélever 1 ml de la culture de *Brucella* spp. et placer dans un tube eppendorf. Y ajouter 100 µl de la culture d'*E.coli* S17 contenant le plasmide d'intérêt.
- Centrifuger le mélange de *E. coli* S17 et de *Brucella* pendant 5 minutes à 7000 rpm afin de culotter les cellules. Eliminer le surnageant afin d'éliminer toute trace d'antibiotique et resuspendre le culot bactérien dans 1ml de 2YT. Répéter trois fois l'opération
- Centrifuger 5 minutes à 7000 rpm et resuspendre le culot dans un volume final de 100 µl de 2YT et déposer la goutte sur une petite boîte de 2YT.
- Incuber la boîte pendant 4 heures à 37°C dans le cas d'un plasmide répliatif ou toute la nuit à température ambiante pour un plasmide intégratif.
- Après l'incubation, utiliser une anse stérile pour strier la conjugaison sur une boîte de 2YT + acide nalidixique + antibiotique du plasmide d'intérêt. Dans le cas d'un vecteur suicide, resuspendre la conjugaison dans 300 µl de 2YT et étaler sur trois boîtes de 2YT + acide nalidixique + antibiotique du plasmide d'intérêt.
- Incuber 3-4 jours à 37°C.

Contrôles :

Une goutte (3 à 5µl) d' *E. coli* S17 et de *Brucella* receveuse est déposée sur deux milieux sélectifs. Le premier contenant de l'acide nalidixique et le second contenant l'antibiotique auquel résistent les *E. coli* S17 donneuses (résistance portée par le plasmide d'intérêt).

2.3) Transformation

Transformation de bactéries CaCl₂ compétentes

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

Le protocole concernant ce type de transformation, que soit via un choc électrique ou thermique, est disponible dans le "Molecular Cloning", A Laboratory Manual, Sambrook and Russel ainsi qu'en annexe.

Transformation de levures

- Inoculer 15 ml de YEPD avec la souche d'intérêt et faire croître la nuit à 30°C, sous agitation.
- Mesurer la DO_{600nm} le lendemain matin.
- Diluer une partie de la culture pour obtenir une DO de 0.1 dans 50 ml de YEPD.
- Récupérer les 50 ml de cellules quand la DO_{600nm} se situe entre 0,4 et 0,6.
- Centrifuger à 5000 rpm pendant 5 minutes.
- Resuspendre le culot dans 25 ml d'eau stérile et centrifuger 5 minutes à 5000 rpm.
- Resuspendre le culot dans 1 ml de LiAc 100 mM stérile
- Centrifuger à vitesse maximale pendant une minute et retirer le LiAc.
- Resuspendre les cellules dans 400 µl de LiAc 100mM.
- Faire bouillir du ssDNA (ADN de sperme de saumon, Sigma Cat.No.D-9156, 11.0 mg/ml) pendant 10 minutes, ensuite le placer directement sur glace
- Vortexer les cellules et prélever 50 µl/transformation.
- Centrifuger et retirer le surnageant.
- Ajouter dans l'ordre : - 240 µl de PEG 50%

- 36 μ l de LiAc 1M
- 25 μ l de ssDNA de saumon
- 50 μ l d'eau ainsi que le plasmide (0,1-10 μ g)
- Vortexer chaque tube 1 minute.
- Incuber à 30 C° pendant 30 minutes puis 20-25 minutes à 42 C°.
- Centrifuger à 7000 rpm pendant 1 minute et enlever le surnageant.
- Resuspendre dans 1 ml d'eau stérile et étaler 100 μ l sur une du milieu sélectif approprié.

2.4) Techniques relatives aux protéines : analyse de l'expression d'une protéine par Western Blot

Préparation d'extraits protéiques totaux

- La veille, ensemercer une culture 10 ml de 2YT à une DO_{600nm} de 0,05 avec une préculture.
- Incuber une nuit à 37°C sous agitation.
- Inactiver les *Brucella* 2 heures à 80°C.
- centrifuger les cultures 15 minutes à 3000 rpm afin de culotter les cellules.
- Resuspendre dans 2,5 ml de PBS et mesurer la DO_{600nm}.

Afin de charger la même quantité de protéines pour chaque extrait, nous diluons un peu de l'extrait afin de mesurer la DO_{600nm}. Nous effectuons ensuite les concentrations nécessaires afin que chaque extrait soit à une DO_{600nm} de 6.

La composition du tampon PBS est décrite en annexe.

La technique du Western blot

Le western blot permet de détecter spécifiquement une protéine d'intérêt. 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 condition dénaturantes.
- L'électrotransfert des protéines du gel sur une membrane de nitrocellulose.
- La détection immunologique de la protéine d'intérêt.

Electrophorèse en gel polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)

Le principe de 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 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). On peut faire varier la taille des pores du gel car la concentration totale en acrylamide est inversement proportionnelle à la quantité d'agent réticulant.

Le β -mercaptoéthanol présent dans le mélange protéique à fractionner permet la rupture des ponts disulfures. 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 2).

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. La technique de préparation du gel est reprise en annexe.

Préparation et chargement des échantillons

Le volume correspondant à la quantité de protéines à charger est fonction de la concentration en protéines de chacun des extraits. Il faut ajouter à ce volume un tampon de chargement protéique à base de bleu de bromophénol dont la concentration stock est 5x. 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.

Faire bouillir les échantillons 10 minutes avant de les charger dans les puits du gel afin de dénaturer les protéines. Nous avons utilisé le marqueur de poids moléculaire Bio Rad Low Range.

Migration :

L'appareil est fixé sur 30 mA et le voltage peut varier jusqu'à un maximum de 600 Volts.

La durée de migration est fonction du pourcentage du gel et de la distance de séparation entre les différentes protéines du marqueur protéique.

Transfert sur membrane de nitrocellulose

Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est un transfert de type semi-dry. 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 3).

Transfert :

- Découper une membrane de nitrocellulose ainsi que 6 papiers Whatman (1 mm d'épaisseur) aux dimensions du gel.
- Les papiers Whatman sont humidifiés dans le tampon de transfert.
- L'ensemble du montage est placé dans l'appareil de transfert (semi dry).
- Afin que le transfert des protéines soit optimal, l'ampérage doit être environ égal à 3 mA par cm² de membrane de nitrocellulose. Le voltage doit varier entre 10 et maximum 14 V.
- 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).

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 PBS-Tween 0,05% lait 5%. Cette étape peut aussi se faire à 4°C pendant une nuit. 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.

Mise en présence de l'anticorps primaire

- La membrane de nitrocellulose est déposée dans une solution de PBS-Tween lait 1% contenant un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt, pendant une heure sous agitation. La concentration de l'anticorps primaire varie de 1 à 50 mg/ml, en fonction de l'affinité des immunoglobulines pour leur épitope.
- Récupérer la solution contenant les anticorps et conserver à -20°C.

- Faire cinq rinçages avec du PBS-Tween 0,05% pendant 3 minutes.

Mise en présence de 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 (Figure 4).

- Mettre la membrane en présence de l'anticorps secondaire à la dilution recommandée par la firme le commercialisant, sous agitation pendant une heure.
- Faire 5 rinçages de 3 minutes avec la solution PBS-Tween 0,05% sous agitation.

Révélation

La technique de détection utilise un réactif ECL et se déroule en chambre noire.

- La membrane est mise en présence d'un mélange d'ECL buffer, d'H₂O₂, d'acide coumarique et de luminol. Ce volume est fonction de la surface à couvrir: surface en cm² x 0.125 ml. Recouvrir la membrane avec la solution sur la face où les protéines ont été transférées.

- Incuber durant une minute.
- Eliminer la solution de détection et placer la membrane recouverte d'un film plastique (type SaranWrap) dans une cassette de révélation, et exposer à un film autoradiographique pendant différentes temps en fonction de l'intensité du signal: 10 secondes, 30 secondes, 60 secondes, 5 minutes et 10 minutes.

L'activité maximale de la peroxydase a lieu 1 à 5 minutes après le mélange des solutions puis elle décroît en fonction du temps.

- Les bandes d'intérêt sont révélées par un bain de révélateur: le film est plongé dans la cuve jusqu'à ce qu'apparaissent des bandes.
- Passer le film une dizaine de secondes dans le fixateur. Rincer abondamment à l'eau de ville et laisser sécher.

Garder la membrane pour positionner les bandes en fonction des puits chargés et pour renseigner de l'échelle de taille.

Solutions et matériels : Solution de révélation Kodack, Fixateur Kodack

2.5) Techniques relatives aux protéines : analyse sur gel de polyacrylamide de protéines fusionnée au tag Lumio™ :

Les protocoles utilisés pour traiter les échantillons protéiques fusionnés avec le tag Lumio™ sont disponibles dans le manuel d'instruction fourni avec le kit « Lumio™ Green Detection Kit » de la société Invitrogen™.

2.6) Méthodes de détection de la dégradation de N-acyl-homoserine lactones

La détection des AHLs est réalisée grâce à des biosenseurs. Dans le cadre de ce travail, trois plasmides senseurs bioluminescents ont été employés : le pSB1142, le pSB1075 et le pSB401. La détection de la lumière produite par les senseurs bioluminescents se fait grâce à un luminomètre (Microlumet LB96P, EG&G Berthold) (Winson *et al.*, 1998).

Cocultures

On peut mettre en évidence la dégradation d'AHL's en mélangeant une culture liquide de cellules contenant un plasmide senseur à une culture de bactéries produisant l'AHL acylase.

Méthode :

- Inoculer d'une part 5 ml de LB avec une colonie de bactéries dont on veut tester la dégradation d'AHLs et d'autre part 5 ml de LB avec une colonie de bactéries portant un plasmide senseur bioluminescent.
- Incuber une nuit à 37°C sous agitation.
- Mettre la culture de bactéries exprimant l'AHL acylase à $DO_{600nm} = 0,6$ puis ajouter les AHL's.
- Laisser incuber 3 heures à 37°C. Diluer 10 fois la culture de bactérie possédant le plasmide senseur 1 heure avant de l'ajouter à la culture de bactéries test.
- Incuber 3h à 37°C sous agitation.
- Déposer 200µl de ce mélange dans une plaque multipuits.
- Mesurer la quantité de lumière produite au luminomètre.

2.7) Technique double hybride levurePrincipe du double hybride en levure

Le principe du double-hybride en levure se base sur l'observation suivante : un facteur de transcription fonctionnel consiste en deux domaines séparables, un domaine de liaison à l'ADN (DB, DNA binding) et un domaine de transactivation (AD, activation domain). Nous avons utilisé les DB et AD du facteur de transcription Gal4p de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. 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 DB-X et AD-Y permet de reconstituer une structure protéique semblable au facteur de transcription Gal4. L'expression de DB-X et AD-Y est sous le contrôle d'un variant relativement faible du promoteur *ADHI*. Trois gènes rapporteurs, *GAL1::HIS3*, *GAL1::lacZ* et *SPAL10::URA3*, sont intégrés dans le génome de la souche de levure utilisée (MaV103). Ils contiennent des sites de liaison pour Gal4p dans leurs promoteurs (Figure 5). Le critère généralement retenu pour accepter une interaction est qu'au moins deux des rapporteurs aient répondu positivement aux tests. En pratique, les levures (*MAV103*) sont d'abord transformées (voir protocole au point 2.3.2) avec le plasmide pVV212 codant DB-X, puis conjuguée avec des levures (*MAV203*) contenant le plasmide pVV213 codant AD-Y. Y et X étant à chaque fois des ORF's provenant de l'ORFéome de *Brucella*.

2.8) Pool d'ORF's de *Brucella*

Le pool d'ORF's de *Brucella* a été réalisé par Johann Mignolet (thèse en cours) et Alexandre Jamet (postdoctorat en cours). Le génome de *Brucella* étant séquencé, il a été possible de construire des amorces pour amplifier chacune des 3200 ORF's prédites du génome par PCR (Dricot *et al.*, 2001). La vérification de l'amplification des ORF's par PCR s'est faite sur gel en fonction des tailles attendues. Nous possédons actuellement au laboratoire deux types de pools : un pool vectoriel dans lequel les ORF's sont clonées dans le plasmide pDONR201 et un pool bactérien constitué de *E. coli* transformées avec ces pDONR201-ORF's. Les 35 plaques 96 puits représentant la banque d'ORF's clonées en pDONR201 ont été poolées de telle façon à ce que toutes les ORF's clonées en pDONR201 d'une même demi plaque soient regroupées en un seul puit. A partir de ces plaques contenant tout l'ORFéome sous forme de pDONR201, des réactions LR ont été réalisées pour cloner les ORF's dans le plasmide pVV213. Des levures MAV203 sont ensuite transformées par le pool de pVV213-ORF's. C'est avec ces levures que nous réalisons par la suite le crible double hybride et le mating avec les MAV103-pVV212-ACP.

2.9) Crible double hybride en levure visant à trouver les partenaires des 2 ACP's de *Brucella melitensis* dénommées : BMEI1111 et BMEI1475

étape 1 : - Mini-prep sur colonne à partir d'une culture de *E. coli* lancée la veille et contenant le plasmide pVV212.

- Réaction LR entre pVV212 et pDONR201 contenant la BMEI1111 et la BMEI1475 de *Brucella melitensis*.

étape 2 : - Transformation de levures MAV103 avec les plasmides pVV212 contenant les ORF's BMEI1111 et BMEI1475. Incuber toute la nuit à 30°C°.

étape 3 : - Lancer cultures de MAV103 contenant les plasmides pVV212 –BMEI111 et pVV212-BMEI1475.

étape 4 : - Réveil du pool d'ORF's clonées en pVV213 MAV 203 : 20 µl de pool + 20 µl de milieu SD-Leu puis placer 3 heures à 30°C° sous agitation.

- Spotter 6 µl du pool sur YEPD agar puis ajouter sur chaque spots 6 µl de MAV 103 pVV212-BMEI111 et BMEI1475. Laisser à 30°C° pendant 24 heures (MATING).

étape 5 : - Répliques velours à partir des boîtes de mating sur les milieux :

SD-Leu-Trp-His+3AT 20mM

SD-Leu-Trp : La réplique velours sur ce milieu sert à faire une copie de sauvegarde, les levures issues du mating étant auxotrophes pour la leucine et le tryptophane grâce à leur plasmides.

Placer toutes ces boîtes à 30°C° toute la nuit puis «cleaner» avec à l'aide de velours. Laisser incuber pendant 4-5 jours à 30°C°.

étape 6 : - Repiquer les clones dans des plaques 96 puits contenant du SD-Leu-Trp-His liquide et laisser incuber 24 heures à 30°C°.

étape 7 : - Spotter 6 µl des plaques sur les milieux sélectifs :

- SD-Leu-Trp-His+3AT 20mM
- SD-Leu-Trp-Ura
- YEPD plus membrane de nitrocellulose.
- SD-Leu-Trp (sauvegarde)

Placer les boîtes à 30 C° pendant 2-3 jours.

étape 8 : - Dénombrement des interactions sur les différents tests.

Test β-Galactosidase (Walhout *et al.*, 2001)

- Préparer un solution stock de tampon Z en dissolvant 16.1 g de Na₂HPO₄.7H₂O (ou 8.52 g anhydreux), 5.5 g de NaH₂PO₄.H₂O (ou 4.8 g anhydreux), 0.75 g de KCl, 0.246 g de MgSO₄.7H₂O (ou 0.12 g anhydreux) dans 1 L d'eau stérile, et ajuster le pH à 7.0.
- Répliquer les levures sur boîte YEPD avec filtre de nitrocellulose.
- Incuber sur la nuit à 30°C
- Pour chaque plaque, placer deux filtres de papier Whatman (Whatman, Cat.No. 1454125) dans une boîte de Petri vide de 15 cm.

- Pour chaque plaque préparer 6mL de tampon Z, auquel on ajoute 11 μ L de β -mercaptoéthanol et 100 μ L de X-Gal 4% (5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside, dissous dans du diméthylformamide).
- Verser \sim 200 mL d'azote liquide dans un seau à glace, placer sous hotte.
- Transférer le tampon Z dans les boîtes de Petri contenant les papiers Whatman ; s'assurer que tout le papier est imprégné et enlever les bulles d'air en soulevant les filtres à l'aide d'une pince à épiler.
- Avec une pince à épiler, saisir le filtre de nitrocellulose qui porte les levures, et le congeler pendant 10 secondes dans l'azote liquide.
- Dégeler à température ambiante tout en maintenant le filtre avec la pince à épiler.
- Placer délicatement le filtre sur le papier Whatman et enlever rapidement les bulles d'air.
- Incuber à 37°C ; observer régulièrement, et prendre des photos si nécessaire.
- Incuber sur la nuit à température ambiante, et observer le résultat. Différentes intensités de bleu indiquent différents niveaux d'activation du gène *lacZ*.

Test de croissance sur milieu SD –Leu –Trp –His +3AT

Le milieu sélectif solide –Leu –Trp –His +3AT a été réalisé comme décrit (Walhout *et al.*, 2001) (3AT 20 mM, 1,2,4-triaminotriazole, approx. 95% TLC, SIGMA Cat.No.A8056-100G).

Deux répliques-nettoyage sur velours ont été réalisées pour chaque test sur 3AT, à partir des boîtes de milieu SD –Leu –Trp portant les levures cotransformées (étape de mating).

L'observation de la croissance des levures sur SD –Leu –Trp –His +3AT est possible en général après 2 à 3 jours d'incubation à 30°C. Ce test peut-être utilisé de deux manières : un crible et un test dit de «phénotypage». Dans le cas du crible, les levures issues du mating sont répliquées à l'aide d'un velours sur un milieu SD-Leu-Trp-His+3AT. Cette étape permet de sélectionner les levures montrant une interaction. Pour le test de phénotypage, les levures sont répliquées à l'aide d'un velours sur un nouveau milieu SD-Leu-Trp-His+3AT et les interactions sont observées.

Test de croissance sur milieu SD –Leu –Trp –Ura

Le milieu sélectif solide –Leu –Trp –Ura a été réalisé comme décrit dans le point 1.1.2.4 et en y rajoutant tous les acides aminés sauf la leucine, le tryptophane et l'uracile.

Deux répliques-nettoyage sur velours ont été réalisées pour chaque test sur 3AT, à partir des boîtes de milieu SD –Leu –Trp portant les levures cotransformées (étape de mating).

L'observation de la croissance des levures sur SD –Leu –Trp –His –Ura est possible en général après 2 à 3 jours d'incubation à 30°C.

Contrôles du double-hybride en levure

Les cinq 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 full length + vecteur AD sans insert (contrôle positif)
- 5 : exprime une interaction relativement forte (entre DB-DP et AD-E2F)

Purification des produits PCR

Les produits de réaction PCR à séquencer sont d'abord purifiés sur colonne à l'aide du Invitex® PCR Purification Kit (Invitex MSBspin PCRapace, Cat.No.10202204), en suivant le

protocole du fabricant (Invitex® PCR Purification Kit Protocol with a microcentrifuge, Invitex).

Séquençage

Afin d'identifier les intervenants, le séquençage des produits PCR est réalisé par le département de l'URPHYM sur base du Kit ABI PRISM dye terminator (Perkin Elmer). Le principe appliqué dans ce kit est un cycle séquentiel avec assimilation de didéoxyribonucléotides marqués avec des molécules fluorescentes. Chacun de ces nucléotides possède son marquage propre (sa longueur d'onde d'émission), ce qui rend possible la lecture à partir d'une seule réaction. Ce type de réaction permet par la suite l'utilisation d'un séquenceur automatique. La réaction de séquençage est basée sur le principe de Sanger (1977). L'incorporation des didéoxyribonucléotides arrête la réaction de polymérisation ce qui permet d'obtenir une population de brins tronqués qui représentent la séquence d'ADN.

Bibliographie

F) Bibliographie

- Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A. E., Ugalde, R., Moreno, E., Moriyon, I. & Gorvel, J. P. (2005). Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol* **6**, 618-25.
- Bassler, B. L., Wright, M., Showalter, R. E. & Silverman, M. R. (1993). Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol Microbiol* **9**, 773-86.
- Camara, M., Williams, P. & Hardman, A. (2002). Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. *Lancet Infect Dis* **2**, 667-76.
- Camilli, A. & Bassler, B. L. (2006). Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* **311**, 1113-6.
- Celli, J. & Gorvel, J. P. (2004). Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Microbiol* **7**, 93-7.
- Celli, J., Salcedo, S. P. & Gorvel, J. P. (2005). *Brucella* coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1673-8.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B. L. & Hughson, F. M. (2002). Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* **415**, 545-9.
- Choi, S. H. & Greenberg, E. P. (1992). Genetic dissection of DNA binding and luminescence gene activation by the *Vibrio fischeri* LuxR protein. *J Bacteriol* **174**, 4064-9.
- Christie, P. J. & Vogel, J. P. (2000). Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol* **8**, 354-60.
- Chun, C. K., Ozer, E. A., Welsh, M. J., Zabner, J. & Greenberg, E. P. (2004). Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3587-90.
- Delrue, R. M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J. P. & Letesson, J. J. (2001). Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol* **3**, 487-97.
- Delrue, R. M., Deschamps, C., Leonard, S., Nijsskens, C., Danese, I., Schaus, J. M., Bonnot, S., Ferooz, J., Tibor, A., De Bolle, X. & Letesson, J. J. (2005). A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cell Microbiol* **7**, 1151-61.
- Dong, Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z. & Zhang, L. H. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3526-31.
- Dong, Y. H., Gusti, A. R., Zhang, Q., Xu, J. L. & Zhang, L. H. (2002). Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* **68**, 1754-9.
- Dong, Y. H. & Zhang, L. H. (2005). Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiol* **43 Spec No**, 101-9.
- Dunny, G. M. & Leonard, B. A. (1997). Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **51**, 527-64.
- Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealson, K. H. & Oppenheimer, N. J. (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**, 2444-9.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**, 269-75.

- Gilson, L., Kuo, A. & Dunlap, P. V. (1995). AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins. *J Bacteriol* **177**, 6946-51.
- Givskov, M., de Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P. D. & Kjelleberg, S. (1996). Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J Bacteriol* **178**, 6618-22.
- Hanzelka, B. L., Stevens, A. M., Parsek, M. R., Crone, T. J. & Greenberg, E. P. (1997). Mutational analysis of the *Vibrio fischeri* LuxI polypeptide: critical regions of an autoinducer synthase. *J Bacteriol* **179**, 4882-7.
- Hanzelka, B. L., Parsek, M. R., Val, D. L., Dunlap, P. V., Cronan, J. E., Jr. & Greenberg, E. P. (1999). Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *J Bacteriol* **181**, 5766-70.
- Henke, J. M. & Bassler, B. L. (2004). Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **186**, 6902-14.
- Kay, E., Reimmann, C. & Haas, D. (2006). Small RNAs in Bacterial Cell-Cell Communication. *Microbe* **1**, 63-69.
- Keller, L. & Surette, M. G. (2006). Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* **4**, 249-58.
- Kuo, A., Blough, N. V. & Dunlap, P. V. (1994). Multiple N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers of luminescence in the marine symbiotic bacterium *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol* **176**, 7558-65.
- Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E. & Gorvel, J. P. (2005). *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol* **8**, 60-6.
- Laue, B. E., Jiang, Y., Chhabra, S. R., Jacob, S., Stewart, G. S., Hardman, A., Downie, J. A., O'Gara, F. & Williams, P. (2000). The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* **146** (Pt 10), 2469-80.
- Leadbetter, J. R. & Greenberg, E. P. (2000). Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J Bacteriol* **182**, 6921-6.
- Lin, Y. H., Xu, J. L., Hu, J., Wang, L. H., Ong, S. L., Leadbetter, J. R. & Zhang, L. H. (2003). Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol Microbiol* **47**, 849-60.
- Manefield, M., Rasmussen, T. B., Henzter, M., Andersen, J. B., Steinberg, P., Kjelleberg, S. & Givskov, M. (2002). Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology* **148**, 1119-27.
- Nealson, K. H. (1977). Autoinduction of bacterial luciferase. Occurrence, mechanism and significance. *Arch Microbiol* **112**, 73-9.
- O'Callaghan, D. & MacMillan, A. in *Animal and Ectoparasitic source infections* (ed. Press, A.) 1991-2010 (2001).
- Parsek, M. R., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., Jr. & Greenberg, E. P. (1999). Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4360-5.
- Pearson, J. P., Van Delden, C. & Iglewski, B. H. (1999). Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* **181**, 1203-10.
- 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.

- Qin, Y., Luo, Z. Q., Smyth, A. J., Gao, P., Beck von Bodman, S. & Farrand, S. K. (2000). Quorum-sensing signal binding results in dimerization of TraR and its release from membranes into the cytoplasm. *Embo J* **19**, 5212-21.
- Redfield, R. J. (2002). Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiol* **10**, 365-70.
- Reiness, G., Yang, H. L., Zubay, G. & Cashel, M. (1975). Effects of guanosine tetraphosphate on cell-free synthesis of Escherichia coli ribosomal RNA and other gene products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 2881-5.
- Sauret, J. M. & Vilissova, N. (2002). Human brucellosis. *J Am Board Fam Pract* **15**, 401-6.
- Schauder, S., Shokat, K., Surette, M. G. & Bassler, B. L. (2001). The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol* **41**, 463-76.
- Sio, C. F., Otten, L. G., Cool, R. H., Diggle, S. P., Braun, P. G., Bos, R., Daykin, M., Camara, M., Williams, P. & Quax, W. J. (2006). Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from Pseudomonas aeruginosa PAO1. *Infect Immun* **74**, 1673-82.
- Smith, R. S., Kelly, R., Iglewski, B. H. & Phipps, R. P. (2002). The Pseudomonas autoinducer N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 production in human lung fibroblasts: implications for inflammation. *J Immunol* **169**, 2636-42.
- Sperandio, V., Torres, A. G., Jarvis, B., Nataro, J. P. & Kaper, J. B. (2003). Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8951-6.
- Sutherland, I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**, 3-9.
- Taminiau, B., Daykin, M., Swift, S., Boschioli, M. L., Tibor, A., Lestrade, P., De Bolle, X., O'Callaghan, D., Williams, P. & Letesson, J. J. (2002). Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen Brucella melitensis. *Infect Immun* **70**, 3004-11.
- Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P. T., Appleby, P., Sewell, H., Stewart, G. S., Bycroft, B. W. & Pritchard, D. I. (1998). The Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun* **66**, 36-42.
- Val, D. L. & Cronan, J. E., Jr. (1998). In vivo evidence that S-adenosylmethionine and fatty acid synthesis intermediates are the substrates for the LuxI family of autoinducer synthases. *J Bacteriol* **180**, 2644-51.
- Van Delden, C. & Iglewski, B. H. (1998). Cell-to-cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections. *Emerg Infect Dis* **4**, 551-60.
- Wang, L. H., Weng, L. X., Dong, Y. H. & Zhang, L. H. (2004). Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching AHL-lactonase. *J Biol Chem*.
- Welch, M., Todd, D. E., Whitehead, N. A., McGowan, S. J., Bycroft, B. W. & Salmond, G. P. (2000). N-acyl homoserine lactone binding to the CarR receptor determines quorum-sensing specificity in Erwinia. *Embo J* **19**, 631-41.
- Walhout, A. J. & Vidal, M. (2001). High-throughput yeast two-hybrid assays for large-scale protein interaction mapping. *Methods* **24**, 297-306.
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J. & Salmond, G. P. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 365-404.
- Yates, E. A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S. R., Sockett, R. E., Goldner, M., Dessaux, Y., Camara, M., Smith, H. & Williams, P. (2002). N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of Yersinia pseudotuberculosis and Pseudomonas aeruginosa. *Infect Immun* **70**, 5635-46.

- Zhang, L. H. (2003). Quorum quenching and proactive host defense. *Trends Plant Sci* **8**, 238-44.
- Zhang, L. H. & Dong, Y. H. (2004). Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol Microbiol* **53**, 1563-71.
- Zhu, J. & Winans, S. C. (1999). Autoinducer binding by the quorum-sensing regulator TraR increases affinity for target promoters in vitro and decreases TraR turnover rates in whole cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4832-7.

ANNEXE

MATERIEL ET METHODES

Table des matières :

1. Préparation de cellules CaCl ₂ compétentes.....	1
2. Extraction d'ADN plasmidique : mini et maxipréparation.....	1
3. Préparation d'ADN en petite quantité (minipréparation d'ADN plasmidique).....	2
4. Préparation d'ADN plasmidique en moyenne quantité (midipréparation d'ADN plasmidique).....	2
5. Extraction d'ADN d'un gel d'agarose.....	3
6. Réaction de ligation.....	3
7. Transformation bactérienne.....	4
7.1. Transformation par choc thermique.....	4
7.2. Transformation par choc électrique (électroporation).....	5
8. Solutions pour la migration en gel d'agarose.....	6
9. Solutions et tampons pour le Western blot.....	6
10. Solutions et matériels pour le transfert de protéines sur membrane de nitrocellulose.....	7

1. Préparation de cellules CaCl₂ compétentes

Les cellules sont rendues compétentes par un traitement avec une solution de CaCl₂ 60 mM + glycérol 15% froid afin de rendre la membrane plasmique perméable à l'ADN.

- Lancer une préculture:ensemencer 20 ml de LB avec une colonie de cellules à rendre compétente et laisser incuber une nuit à 37°C sous agitation.
- Le matin, inoculer 400 ml de LB avec 20 ml de la préculture et incuber à 37°C sous agitation jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 0,3 à 0,4.
- Laisser la culture 10 minutes sur glace.
- Centrifuger 10 minutes à 3000 rpm afin de culoter les cellules. Eliminer le surnageant.
- Resuspendre les bactéries culotées dans 80 ml final de CaCl₂ 60 mM + glycérol 15% stérile et froid.
- Centrifuger pendant 5 minutes à 2500 rpm. Eliminer le surnageant.
- Resuspendre les cellules dans 80 ml final de CaCl₂ 60 mM + glycérol 15% froid.
- Laisser 30 minutes sur glace.
- Centrifuger pendant 5 minutes à 2500 rpm.
- Resuspendre dans 16 ml final de CaCl₂+glycérol 15%.
- Aliquoter en 0,2 ml et 0,4 ml et stocker à -80°C.

2. Extraction d'ADN plasmidique : mini et maxipréparation

Ces techniques permettent d'isoler et de purifier les plasmides produits par des 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.

Les tampons utilisés pour les préparations d'ADN chez *E. coli*

S1 : Tampon de resuspension : 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, RNase A 100 µg /ml, pH8,0. Se conserve à 4°C.

S2 : tampon de lyse : 200 mM NaOH, 1% SDS. Se conserve à t° ambiante.

S3 : stoppe la lyse : 2,8M Kac, pH5,2. S3 se conserve à 4°C.

N2 : tampon d'équilibration : 100 mM Tris, 15% éthanol, 900 mM KCl ajusté avec H3PO4 pH6,3.

N3 : tampon de lavage : 100 mM Tris, 15% éthanol, 1150 mM KCl ajusté avec H3PO4 à pH6,3.

N5 : tampon d'éluion : 150 mM Tris, 15% éthanol, 1000 mM KCl ajusté avec H3PO4 à pH8,5.

3. Préparation d'ADN en petite quantité (minipréparation d'ADN plasmidique)

- Ensemencer 5 ml de milieu LB liquide (+ antibiotiques) avec une colonie isolée.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.
- Centrifuger 1,5 ml de la culture liquide dans un Eppendorf à une vitesse de 14000 rpm pendant 10 minutes. Ensuite éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot cellulaire dans 300 µl de S1.
- Ajouter 300 µl de S2 pour lyser les bactéries. Mélanger doucement par retournements, incuber 5 minutes maximum à température ambiante.
- Ajouter 300 µl de S3 et mélanger doucement par retournements, incuber 10 minutes sur glace.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 14000 rpm et récupérer ensuite le surnageant.
- Précipiter l'ADN en ajoutant 0,7 volume d'isopropanol. Vortexer.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 14000 rpm. Eliminer le surnageant.
- Ajouter 1ml d'éthanol 70% froid pour le lavage.
- Centrifuger 10 minutes à 14000 rpm. Eliminer prudemment le surnageant.
- Sécher le culot.
- Resuspendre dans 20 µl d'H₂O distillée stérile.
- Stocker à -20°C.

4. Préparation d'ADN plasmidique en moyenne quantité (midipréparation d'ADN plasmidique)

Cette technique utilise le kit NucleoBond® Qiagen et inclut une chromatographie sur colonne Nucleobond AX 100 échangeuse d'anions qui permet de préparer une quantité importante d'ADN plasmidique en éliminant les protéines, l'ARN et l'ADN génomique.

- Ensemencer 100 ml de milieu LB liquide (+ antibiotiques) dans un erlen de 500ml avec une préculture 10 ml provenant d'une colonie isolée.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.
- Centrifuger la culture pendant 15 minutes à 3500 rpm. Eliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 4ml de S1.

- Ajouter 4 ml de S2 et mélanger doucement par retournements.
- Laisser incuber 5 minutes maximum à température ambiante.
- Ajouter 4 ml de S3, mélanger par retournements, laisser 5-10 minutes sur glace. Il se produit une floculation.
- Filtrer le lysat à l'aide d'un filtre humidifié pour éliminer les déchets cellulaires ou centrifuger dans un corex à 13000 rpm pendant 20 min.
- Equilibrer une colonne NUCLEABOND AX100 avec 2,5 ml de N2.
- Déposer le lysat filtré sur la colonne équilibrée, l'ADN s'accroche à la résine.
- Laver la colonne 2 fois avec 5 ml de N3.
- Eluer l'ADN avec 5 ml de N5. L'éluat est réparti en 6 Eppendorfs (~800µl/Eppendorf)
- Ajouter 0,7 volume d'isopropanol (~600µl). Vortexer.
- Centrifuger à 14000 rpm à 4°C pendant 20 minutes.
- Ajouter 500µl/Eppendorf d'éthanol 70% froid.
- Centrifuger 10 minutes à 13000 rpm à 4°C.
- Eliminer l'éthanol et sécher le culot.
- Resuspendre l'ADN dans 50 µl d'eau distillée stérile.

5. Extraction d'ADN d'un gel d'agarose

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

- Exciser le fragment d'intérêt du gel à l'aide d'un scalpel ; 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.
- Vortexer la solution de silice du kit pour bien resuspendre les billes de silice.
- Ajouter 2 µl de cette solution de silice par µg d'ADN. Vortexer.
- Incuber 10 minutes à 55°C. Vortexer après 5 minutes d'incubation.
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.
- Retirer le surnageant.
- 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. Conserver à - 20°C.

6. Réaction de ligation

Pour lier de manière covalente des fragments d'ADN, on utilise l'enzyme ADN ligase du phage T4. Elle catalyse la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyle 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' d'une extrémité proche. Pour être active l'enzyme nécessite la présence d'ATP et d'ions Mg⁺⁺.

Méthode :

- Dans un eppendorf, placer un mélange de deux fragments à liguer dans les proportions suivantes : 3:1 insert/vecteur.
- Ajouter 1,5 µl de DNA ligase T4.
- Ajouter 3µl de tampon de ligation 5X.
- Compléter avec de l'eau distillée stérile pour arriver à un volume de 15 µl.
- Incuber à 14-16°C pendant 10 à 14 heures si les extrémités sont protrudantes, ou quelques heures à 25°C si les extrémités sont à bouts francs.

Témoins à utiliser :

- Un vecteur restreint dont le mélange de ligation ne contient pas de ligase : les molécules de ce vecteur restent linéaires et sont incapables de transformer efficacement des *E. coli* compétentes. Les colonies apparues sur milieu sélectif après transformation s'expliquent par la présence de vecteurs non restreints. Ce témoin permet d'évaluer la proportion des transformants dus aux vecteurs non restreints.
- Un vecteur restreint dont le mélange de ligation contient la ligase mais pas l'insert permet de vérifier l'efficacité de la ligase.

7. Transformation bactérienne

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

7.1. Transformation par choc thermique

Préparation des cellules CaCl₂ compétentes:

Des bactéries à Gram négatifs *E. coli* en début de phase exponentielle de croissance sont rendues artificiellement compétentes par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium (CaCl₂). Celui-ci déstabilise la paroi de la bactérie, qui gonfle alors en prenant l'aspect d'un sphéroblaste. L'ADN plasmidique ajouté forme avec le calcium un complexe résistant aux désoxyribonucléases. Ce complexe est supposé adhérer à la bactérie. Les bactéries sont ensuite soumises à un choc thermique qui permet au complexe de rentrer dans la cellule. Cette méthode a été employée lors de l'utilisation de la souche *E. coli* S17-1λpir.

Transformation des cellules CaCl₂ compétentes :

- Ajouter 1 à 10µl d'ADN plasmidique avec 40 µl de cellules compétentes ou 1 à 10 µl d'un mélange de ligation avec 100µl de cellules compétentes.
- Déposer 30 min sur glace.
- Réaliser un choc thermique de 2 min à 42°C.
- Ajouter 900µl de LB liquide.
- Incuber de 30 min à 1 h à 37°C.
- Etaler sur boîtes contenant un milieu sélectif et incuber une nuit à 37°C.

Notons que le temps d'incubation en milieu riche non sélectif permet aux bactéries de régénérer une paroi normale et aux gènes codant une résistance introduits de s'exprimer. Les transformants sont ensuite isolés par culture sur milieu sélectif.

7.2. Transformation par choc électrique (électroporation)

Le principe visant à rendre les cellules perméables est ici le même que dans le cas du choc thermique, sauf que la solution hypotonique n'est pas du chlorure de calcium, mais de l'eau bidistillée. Cette méthode a été employée lors de l'utilisation de la souche *E. coli* DH10B.

Préparation des cellules :

- Inoculer une colonie isolée de bactérie dans 50 ml de milieu toute une nuit sous forte agitation (~250 rpm) à température adéquate.
- Inoculer 2 aliquots de 500 ml séparés dans 2 erlens de 2 litres avec 25 ml de culture bactérienne.
- Mesurer la DO_{600nm}. Les cellules doivent être à une DO_{600nm} de 0,35-0,4 afin d'avoir une efficacité maximale.
- Une fois cette DO_{600nm} atteinte, transférer les erlens dans un bain de glace durant 25-30 min. Mélanger la culture de temps à autre afin de bien homogénéiser le refroidissement. A partir de cette étape, s'assurer que les cellules soient sans cesse à 4°C.
- Transférer la culture dans des bouteilles spéciales pour centrifugeuse, refroidie elles aussi à 4°C avant usage. Centrifuger 20 min à 4°C à 2500 rpm.
- Eliminer le surnageant et resuspendre les cellules dans 250 ml d'eau bidistillée stérile froide.
- Centrifuger 20 min à 4°C à 2500 rpm. Eliminer le surnageant et resuspendre les cellules dans 10 ml de glycérol 10% froid.
- Resuspendre dans un volume final de glycérol 10%. La concentration cellulaire est d'environ 1 à 3*10¹⁰ cellules/ml.
- Aliquoter les cellules et conserver à -80°C (pendant maximum 6 mois).

Transformation de cellules électrocompétentes :

- Laisser dégeler les cellules électrocompétentes sur glace.
- Placer dans une cuvette d'électroporation (Bio-Rad, Gene Pulser[®] Cuvette, 0,2cm electrode gap) stérile et froide (sur glace), 1 à 5 µl d'ADN plasmidique ou au maximum 10µl d'un mélange de ligation et 40 à 100 µl de cellules compétentes.
- Faire descendre le tout dans le fond de la cuvette en tapotant délicatement la cuvette et placer la solution 1 min sur glace.
- Bien essuyer la cuvette avec du papier afin de se débarrasser de la glace.
- Placer la cuvette dans l'électroporateur (Bio-Rad, Gene Pulser[®] II Apparatus).
- Régler l'appareil sur:
 - Différence de potentiel : 2,0 kV
 - Capacitance : 25µF
 - Résistance : 200Ohms
- Faire le choc électrique.
- Ajouter rapidement 700 µl de milieu riche 2YT.
- Transférer dans un Eppendorf et laisser 2 à 3 h à 37°C.
- Etaler sur milieu sélectif et incubé une nuit à 37°C.

8. Solutions pour la migration en gel d'agarose

Bleu d'électrophorèse

Bleu de bromophénol :	0,25%
Glycérol :	50%
EDTA :	100mM (solution d'EDTA 0.5M pH 8,0).
Eau distillée	

Tampon d'électrophorèse TAE (50X concentré)

Tris :	2M
EDTA :	100ml d'une solution de 0,5M, pH 8,0.
Acide acétique glacial :	0,95M

Porter le volume à un litre avec de l'eau distillée

9. Solutions et tampons pour le Western blot

Préparation du gel de polyacrylamide pour Western blot.

Le Running Gel, à 12% de polyacrylamide:

Pour 20 ml

Eau :	8,4 ml
Acrylamide :	6,2 ml
Tris HCl 1,5M pH 8,8 :	5,0 ml
SDS 10% :	0,2 ml
APS 10 % :	0,2 ml
TEMED :	8 µl

- Couler la solution entre les deux plaques de verre préalablement fixées sur leur support.
- Déposer 1ml d'isopropanol sur le gel pour permettre sa polymérisation, en effet l'oxygène de l'air inhibe la polymérisation.
- Lorsque le gel est polymérisé, enlever l'isopropanol par inversion du montage.

Le Stacking Gel :

Pour 8 ml

Eau :	4,76 ml
Acrylamide :	1,04 ml
Tris HCl 0,5M pH 6,8 :	1,5 ml
SDS 10% :	0,08 ml
APS 10% :	0,08 ml
TEMED :	8 µl

Placer le peigne entre les deux plaques de verre avant de couler le Stacking gel. Le couler jusqu'à ce que le liquide arrive au sommet des puits. Laisser polymériser puis retirer lentement le peigne. Remplir les puits avec le tampon d'électrophorèse (SDS-PAGE buffer 1X).

La solution d'acrylamide utilisée est référencée sous : LiquiGel (37,5:1), ICN Biomedicals Inc. , Cat n°: 800804.

Composition du SDS PAGE buffer 10X

Tris base :	30,35gr
Glycine :	144gr
SDS :	10gr

Amener le volume à 1 litre

Tampon de chargement protéique 5X (pour 20 ml)

50% Glycérol :	10 ml
25% β -mercapto-éthanol :	5 ml
10% SDS :	2 gr
Tris 1,5M pH 6,8 :	13 ml
0,005% Bleu de Bromophénol :	0,0005 gr

10. Solutions et matériels pour le transfert de protéines sur membrane de nitrocellulose

- Tampon de transfert (TOWBIN Buffer): (pour 1000 ml)

Tris :	48mM (5,8g)
Glycine :	39mM (2,9g)
SDS :	0,037% (0,37g)
Méthanol :	200 ml

Porter à volume avec de l'eau distillée

- Membrane de nitrocellulose : Hybond ECL

- Appareil de transfert: Trans-Blot SD Semi Dry Transfer

- Whatman Chromatography paper

Solutions pour l'étape du blocking:

Solution de Blocking

PBS 1X
Lait en poudre 5%
Tween 0,05%

PBS 20X : solution stock 20X

KH₂PO₄ : 2 mM
Na₂HPO₄ 10 mM
NaCl : 137 mM
KCl : 2,7 mM

PBS tween 0.05% (500 ml) :

PBS stock 20X : 25 ml
H₂O : 475 ml
Tween : 250 µl



Instruction Manual

Lumio™ Green Detection Kit

For specific and sensitive detection of
Lumio™ fusion proteins

Catalog no. LC6090

Version B
27 February 2004
25-0672

Table of Contents

Table of Contents	iii
Lumio™ Green Detection-Experienced Users Procedure	iv
Kit Contents and Storage	v
Accessory Products.....	vi
Introduction	1
Overview	1
Working with Arsenic Compounds	6
Experimental Overview	7
Methods	8
Preparing Samples	8
Using Lumio™ Green Detection Kit.....	12
Expected Results	18
Troubleshooting	19
Appendix.....	21
Recipes.....	21
Technical Service.....	22
Purchaser Notification	23
References	24

Lumio™ Green Detection-Experienced Users Procedure

Introduction This quick reference sheet is included for experienced users of the Lumio™ Green Detection Kit. If you are a first time user, follow the detailed protocol included in this manual.

Step	Action
Preparing Samples	Prepare samples from bacterial, mammalian, or <i>in vitro</i> lysates expressing the Lumio™ fusion proteins as described on pages 8-11. You will need at least 1 pmole of the Lumio™ fusion protein for detection.
Using the Lumio™ Green Detection Kit	<ol style="list-style-type: none"> 1. For bacterial or mammalian lysates that do not contain 1X Lumio™ Gel Sample Buffer, use 15 µl protein sample and add 5 µl 4X Lumio™ Gel Sample Buffer (see page 14 for details). For <i>in vitro</i> expressed protein samples already in 1X Lumio™ Gel Sample Buffer, use 20 µl of the sample (see page 14 for details). 2. Thaw the Lumio™ Green Detection Reagent and mix well. 3. To the protein samples from Step 1, add 0.2 µl Lumio™ Green Detection Reagent using a 2 µl-pipettor. Incubate at 70°C for 10 minutes. 4. Allow the samples to cool for 1-2 minutes and centrifuge briefly at high speed in a microcentrifuge. 5. Thaw the Lumio™ In-Gel Detection Enhancer and add 2 µl Lumio™ In-Gel Detection Enhancer to the samples. 6. Mix well and incubate at room temperature for 5 minutes. 7. Load 5-20 µl of the sample on an appropriate gel and perform electrophoresis. 8. After electrophoresis is complete, remove the gel from the cassette and proceed to Visualizing the Gel, below.
Visualizing the Gel	<p>Place the gel on a UV transilluminator equipped with a standard camera (be sure to select the ethidium bromide or SYBR® Green filter) or use a laser-based scanner to view and capture an image of the gel. The maximum excitation wavelength for Lumio™ Green Detection Reagent is at 500 nm and maximum emission wavelength is at 535 nm (page 5).</p> <p>Detection with Lumio™ Green Detection Kit will result in fluorescent Lumio™ fusion protein bands (page 18).</p>

Kit Contents and Storage

Contents and Storage

The Lumio™ Green Detection Kit is shipped on dry ice. The kit contents are described in the table below.

Sufficient reagents are included in the kit for 100 in-gel detections or 20 *in vitro* transcription-translation labeling reactions.

Reagent	Amount	Storage
Lumio™ Green Detection Reagent	20 µl	-20°C
Lumio™ Gel Sample Buffer (4X)	5 x 200 µl	-20°C
Lumio™ In-Gel Detection Enhancer	200 µl	-20°C



Note

The color of the Lumio™ Green Detection Reagent may change from colorless to pink during storage. This color change does not affect the functioning of the reagent.

Product Qualification

The Lumio™ Green Detection Kit is functionally tested as described below. Various dilutions of a purified Lumio™ fusion protein were prepared with the Lumio™ Green Detection Reagent and Lumio™ In-Gel Detection Enhancer as described on page 14. The samples were electrophoresed on a NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel with MES buffer. The protein bands were visualized and imaged using a UV transilluminator equipped with a standard camera.

Functional criteria are:

- The purified Lumio™ fusion protein must be clearly visible at all dilutions and the reagents must allow detection of 1 pmole of the purified Lumio™ fusion protein
- The gel must have consistent background and be free from blotches or spots

Accessory Products

Additional Products

Additional products are available separately from Invitrogen. Ordering information is listed below. For more details, visit our Web site at www.invitrogen.com or contact Technical Service (page 22).

Product	Quantity	Catalog no.
BenchMark™ Fluorescent Protein Standard	125 µl	LC5928
NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gels	10 gels	NP0321BOX
Novex 10% Tris-Glycine Gels	10 gels	EC6075BOX
XCell SureLock™ Mini-Cell	1 unit	EI0001
SimplyBlue™ SafeStain	1 L	LC6060
SilverQuest™ Silver Staining Kit	1 kit	LC6070

Lumio™ Vectors

A large variety of vectors are available from Invitrogen to generate N-terminal or C-terminal Lumio™ fusion proteins. For more information about these vectors, visit our Web site (www.invitrogen.com) or contact Technical Service (page 22).

Introduction

Overview

Introduction

The Lumio™ Green Detection Kit uses the Lumio™ Technology to facilitate in-gel detection of Lumio™ fusion proteins. For more details on Lumio™ Technology, see next page.

The kit is specially formulated for fast, sensitive, and specific detection, and is capable of detecting 1 pmole of a Lumio™ fusion protein (*e.g.* 1 pmole of a 30 kDa protein is 30 ng).



Important

Before you can use the Lumio™ Green Detection Kit to detect your protein of interest, you must express your protein using an expression construct containing your gene of interest fused to the Lumio™ sequence. A large variety of vectors are available from Invitrogen to generate N-terminal or C-terminal Lumio™ tag fusion proteins. For more information about these vectors, visit our Web site (www.invitrogen.com) or contact Technical Service (page 22).

Features

Important features of the Lumio™ Green Detection Kit are listed below:

- Lumio™ fusion protein sensitivity at nanogram level
 - Rapid detection of Lumio™ fusion proteins directly in the gel without the need for staining or western blotting
 - Capable of detecting N-terminal and C-terminal Lumio™ fusion proteins
 - Detection compatible with downstream applications such as Coomassie® staining, silver staining, fluorescent staining, western blotting, or mass spectrometry analysis
-

Continued on next page

Overview, Continued

Lumio™ Technology

The Lumio™ Technology uses the Lumio™ Green Detection Reagent and a Lumio™ tag incorporated into the sequence of interest to facilitate fluorescent in-gel detection of Lumio™ fusion proteins. For more details on the components of the Lumio™ System, see below.

Using the Lumio™ Technology for protein detection provides the following advantages:

- The small size of the Lumio™ tag (6 amino acids, 585 Da) is unlikely to interfere with the structure or biological activity of the protein of interest
 - The Lumio™ Green Detection Reagent binds the Lumio™ tag with high specificity and high binding affinity (nanomolar or lower dissociation constant)
 - The Lumio™ Green Detection Reagent is non-fluorescent until it binds the Lumio™ tag allowing specific detection of Lumio™ fusion proteins from endogenous proteins
-

Components of the Lumio™ System

The two major components of the Lumio™ System are described below:

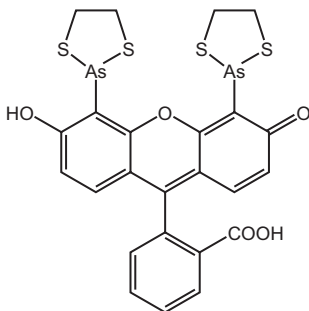
- The tetracysteine Lumio™ tag (Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys). When fused to a gene of interest (in the context of a Lumio™ vector), the Lumio™ tag specifically binds to the Lumio™ Green Detection Reagent allowing the fluorescent detection of Lumio™ fusion proteins. For more information on the tetracysteine motif, see next page.
 - A biarsenical Lumio™ Green Detection Reagent, which becomes fluorescent upon binding to recombinant proteins containing the Lumio™ tag. Lumio™ Green Detection Reagent is supplied pre-complexed to the EDT (1,2-ethanedithiol) which stabilizes and solubilizes the biarsenical reagent. For information on how the Lumio™ Green Detection Reagent binds the Lumio™ tag producing fluorescent protein bands, see page 4.
-

Continued on next page

Overview, Continued

Lumio™ Green Detection Reagent

The Lumio™ Green Detection Reagent is based on the FIAsh reagent (Griffin *et al.*, 1998) and is specifically formulated to allow labeling of Lumio™ fusion proteins prior to electrophoresis. The FIAsh™ (Fluorescein Arsenical Hairpin binding) reagent is a bisarsenical compound (see figure below for structure) used for site-specific labeling of proteins that contain a tetracysteine motif (CCXXCC), where C equals cysteine and X is any amino acid other than cysteine (Griffin *et al.*, 1998). The Lumio™ Green Detection Reagent is supplied pre-complexed to EDT (1,2-ethanedithiol) which stabilizes and solubilizes the biarsenical reagent. For information on how the Lumio™ Green Reagent binds the Lumio™ tag producing fluorescent protein bands, see next page.



Formula: C₂₄H₁₈As₂O₅S₄
Molecular Weight: 664.50

Tetra- cysteine Motif

The Lumio™ Green Detection Reagent binds a tetracysteine motif consisting of Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys where Cys equals cysteine and Xaa equals any amino acid other than cysteine. This motif is rarely seen in naturally occurring proteins allowing specific fluorescent labeling of recombinant proteins fused to the Lumio™ tag. In the Lumio™ System, the optimized tetracysteine motif is Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys as this motif has been shown to have a higher affinity for and more rapid binding to biarsenical compounds as well as enhanced stability compared to other characterized motifs (Adams *et al.*, 2002).

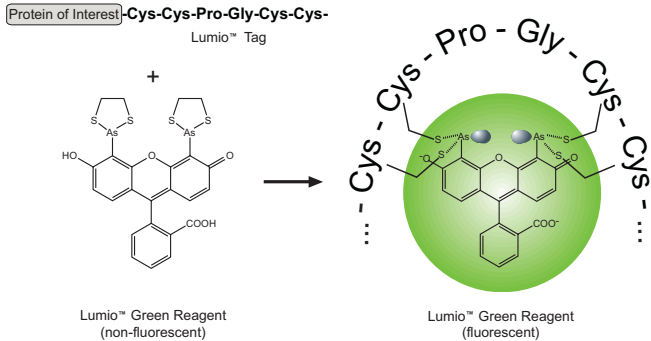
Continued on next page

Overview, Continued

Binding of the Lumio™ Green Reagent to the Lumio™ Tag

The Lumio™ Green Detection Reagent is non-fluorescent and becomes fluorescent upon binding to the tetracysteine Lumio™ tag as follows.

When the Lumio™ Green Reagent is not bound to a protein the small size of EDT permits free rotation of the arsenic atoms that quenches the fluorescence of fluorescein. However, when the Lumio™ Green Reagent is mixed with a Lumio™ fusion protein, the arsenic atoms of the reagent react with the tetracysteine motif of the protein and form four covalent bonds—the two arsenic groups of the Lumio™ Green Reagent each bind two thiols in the Lumio™ tag tetracysteine sequence (see figure below). This binding hinders the free rotation of the arsenic atoms and the fluorescein molecule of the Lumio™ Green Reagent becomes fluorescent (increases the fluorescence by 50,000-fold). The conversion of the Lumio™ Green Reagent to a highly fluorescent state can be detected at the appropriate emission peak (see next page). The high affinity binding of the Lumio™ Green Reagent with the Lumio™ tag allows specific detection of Lumio™ fusion proteins in the presence of endogenous proteins.

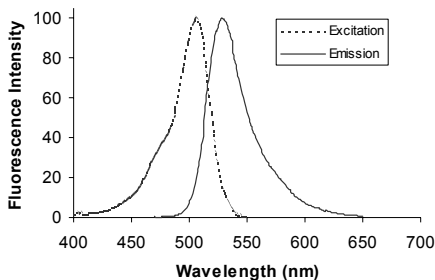


Continued on next page

Overview, Continued

Fluorescence Spectra

The Lumio™ Green Detection Reagent has maximum excitation at 500 nm (dye can also be excited with UV light but with lower efficiency) and maximum emission at 535 nm (see figure below). This allows the detection of the Lumio™ fusion proteins using a UV transilluminator equipped with a standard camera or a laser-based scanner.



Note

Proteins containing a C-terminal and N-terminal Lumio™ tag can be detected with the Lumio™ Green Detection Kit. However, the intensity of the signal may vary and is dependent on the individual protein.

The signal intensity is also dependent on the number of moles of protein contained in a protein band as one molecule of Lumio™ Green Reagent binds to only one Lumio™ tag on the protein.

For example, if you load 150 ng/band of two proteins with a molecular weight of 150 kDa and 30 kDa, respectively, after detection with Lumio™ Green Detection Kit the 30 kDa band fluoresces more intensely than the 150 kDa band. This is because there is only 1 picomole of the 150 kDa band while there are 5 picomoles of the 30 kDa band in the total mass loaded (150 ng/band).

Working with Arsenic Compounds

Introduction

Information on handling and disposing the biarsenical Lumio™ Green Detection Reagent is described below.



Exercise caution when handling the Lumio™ Green Reagent. Wear protective clothing, eyewear, and gloves suitable for use with dimethyl sulfoxide (*e.g.* nitrile gloves) when handling the Lumio™ Green Detection Reagent. Review the Material Safety Data Sheet (MSDS) before handling (page 22).

Dermal Toxicity Evaluation

A dermal toxicity evaluation of the Lumio™ Green Detection Reagent was independently performed by MB Research Laboratories, Spinnerstown, PA, USA by applying a full vial of material to the mouse skin. In this study, no adverse reaction or toxicity was noted. Although arsenic compounds are toxic, this product contains <0.2% of an organic arsenic compound that shows no toxicity at a maximum dose level likely to be handled. The toxicology of this material, however, has not been fully investigated. Handle according to your chemical hygiene plan and prevent contact with this material.

Accidental Spills and Accidental Contact

Treat accidental spills of the Lumio™ Green Detection Reagent on surfaces with 10% bleach for 10 minutes and then carefully clean up. Discard arsenic-containing waste according to your institution's guidelines.

Treat accidental contact of the Lumio™ Green Detection Reagent with human skin by washing excess reagent with soap and water as soon as possible. Consult a physician following contact with Lumio™ Green Reagent. Do not treat arsenic skin exposure with EDT (1,2-ethanedithiol) as this may promote uptake of the Lumio™ Green Reagent into the body.

Disposing the Lumio™ Green Reagent

All excess reagents that contain or have come in contact with arsenic compounds should be discarded according to your institution's guidelines and all applicable local, state, and federal requirements.

In general, we recommend disposing of protein samples labeled with the Lumio™ Green Detection Reagent and polyacrylamide gels containing protein samples labeled with the Lumio™ Green Detection Reagent as hazardous waste. For specific disposal requirements in your area, consult your safety officer. For MSDS information, see page 22.

Experimental Overview

Introduction

The steps involved in using the Lumio™ Green Detection Kit for detecting Lumio™ fusion proteins are described below.

To visualize Lumio™ fusion protein bands after detection, you will need a UV transilluminator or a laser-based scanner. See **Visualizing the Gel**, below.

Experimental Outline

The Lumio™ fusion proteins are labeled with the Lumio™ Green Detection Reagent for 10 minutes at 70°C. Then the Lumio™ In-Gel Detection Enhancer is added and the samples are incubated for 5 minutes at room temperature. The protein samples are electrophoresed and after electrophoresis, the gel is removed from the cassette. The gel is then visualized and imaged using a UV transilluminator equipped with a standard camera or a laser-based scanner (see **Visualizing the Gel**, below) to visualize the fluorescent Lumio™ fusion protein bands.

The gel can be stained with Coomassie®, silver, or fluorescent stains for total protein content after detection with the Lumio™ Green Detection Kit.

Visualizing the Gel

For optimal visualization of the fluorescent protein bands after detection with Lumio™ Green Detection Kit, you will need:

- UV transilluminator (302 or 365 nm)
To photograph a gel on the UV transilluminator, use a standard video camera, CCD (Charged Couple Device) camera, or a cooled CCD camera with ethidium bromide filter or SYBR® Green filter. **Note:** If you are using a 365 nm UV transilluminator, you may have to expose the gel for a longer time, as the sensitivity is lower than a 302 nm UV transilluminator.
OR
 - Laser-based scanner with a laser line that falls within the excitation maxima of the stain (500 nm), a 535 nm long pass filter, or a band pass filter centered near the emission maxima of 535 nm. The sensitivity of detection is higher with laser-based scanners equipped with appropriate filters than with UV transillumination.
-

Methods

Preparing Samples

Introduction

Brief instructions for preparing cell lysates after expression of the Lumio™ fusion proteins are described below. For details on Lumio™ fusion protein expression, see the manual supplied with the Lumio™ vector system.

Materials Needed

You will need the following items:

- Sample containing the Lumio™ fusion proteins

For bacterial lysate

- Lysis Buffer (recipe on page 21)
- 4X Lumio™ Gel Sample Buffer (included in the kit)
- 8 M urea, optional

For *in vitro* expressed proteins

- Acetone (cold)
- 4X Lumio™ Gel Sample Buffer (included in the kit)

For mammalian lysate

- NP-40 Lysis Buffer (recipe on page 21)
 - Protease inhibitors (optional)
 - Phosphate Buffered Saline (PBS)
-



Note

- It is important to prepare your samples as described in this section to obtain the best results with the Lumio™ Green Detection Kit
 - Samples prepared in standard (Laemmli) SDS-PAGE sample buffer are not compatible for use with the Lumio™ Green Detection Kit
 - If you are using purified or partially purified Lumio™ fusion proteins, proceed directly to **Using Lumio™ Green Detection Kit**, page 12
-

Continued on next page

Preparing Samples, Continued

Preparing Bacterial Lysates

Protocol for preparing lysates from bacterial samples expressing Lumio™ fusion proteins from Champion™ pET Lumio™ vectors is described below.

1. Thaw the cell pellets from the pilot expression (refer to the Champion™ pET Lumio™ System manual) and resuspend each pellet in 50 µl of Lysis Buffer (recipe is on page 21).
Note: To facilitate lysis, you may need to add lysozyme or sonicate the cells.
2. If you wish to analyze total cell lysates, proceed to **Using Lumio™ Green Detection Kit**, page 12 or store the samples at -80°C.
If you wish to prepare lysate fractions to analyze soluble and insoluble protein, proceed to Step 3.
3. Centrifuge samples at maximum speed in a microcentrifuge for 5 minutes at 4°C to pellet insoluble proteins. Transfer supernatant (soluble protein) to a fresh tube and store on ice.
4. Wash pellets once with Lysis Buffer to remove any residual soluble proteins. Resuspend the pellets in 50 µl 8 M urea.
5. Proceed to **Using Lumio™ Green Detection Kit**, page 12.

Continued on next page

Preparing Samples, Continued

Preparing *in vitro* Expressed Proteins

Protocol for acetone precipitation of *in vitro* expressed Lumio™ fusion proteins from Expressway™ Lumio™ vectors is described below.

1. To 5 µl of the protein reaction product (refer to the Expressway™ Lumio™ System manual), add 20 µl cold acetone. Mix well.
2. Incubate at -20°C for 20 minutes.
3. Centrifuge for 5 minutes at room temperature in a microcentrifuge at 12,000 rpm.
4. Carefully remove the supernatant, taking care not to disturb the protein pellet.
5. Resuspend the pellet in 20 µl 1X Lumio™ Gel Sample Buffer (dilute the 4X Lumio™ Gel Sample Buffer included with the kit to 1X with deionized water).
6. Proceed to **Using Lumio™ Green Detection Kit**, page 12.

Continued on next page

Preparing Samples, Continued

Preparing Mammalian Cell Lysate

Protocol for preparing lysate from a 6-well plate of cells (~95% confluent) expressing Lumio™ fusion proteins from Mammalian Gateway® Lumio™ vectors is described below.

1. Remove media from cells and wash cells 3 times with phosphate buffered saline (PBS).
 2. To each well of a 6-well plate, add 100 µl 1X NP-40 lysis buffer (recipe is on page 21).
 3. Incubate the plate for 2 minutes at room temperature.
 4. Scrape cells from bottom of the well taking care not to generate a lot of foam and transfer the lysate into a microcentrifuge tube placed on ice.
 5. Rinse the wells carefully with 50 µl 1X NP-40 lysis buffer and add it to the lysate in step 4. Keep the tube on ice.
 6. For cells expressing the p64 control protein with a Lumio™ tag, we recommend sonicating the lysates. The p64 control protein localizes to the nucleoli, which are not easily lysed by the lysis buffer. Sonicate the sample 3-4 times on ice for 20 seconds each.
 7. Centrifuge the lysate in a microcentrifuge at maximum speed for 2 minutes at 4°C.
 8. Transfer the supernatant to a fresh microcentrifuge tube placed on ice.
 9. Proceed to **Using Lumio™ Green Detection Kit**, page 12 or store the lysate at -80°C.
-

Using Lumio™ Green Detection Kit

Introduction

Instructions for using the Lumio™ Green Detection Kit for detecting Lumio™ fusion proteins are provided below.

For preparing lysates, see pages 8-11.

Lumio™ Gel Sample Buffer

The Lumio™ Gel Sample Buffer (4X) supplied with the kit is a proprietary sample buffer containing protein denaturing and reducing agents. The buffer is specifically formulated to provide optimal results with the Lumio™ Green Detection Reagent. **Always use the Lumio™ Gel Sample Buffer (4X) to prepare samples for electrophoresis (page 14).**

To prevent oxidation of the reducing agent in the buffer, store the Lumio™ Gel Sample Buffer (4X) at -20°C and minimize exposure to air. Use the buffer immediately upon removal from -20°C and return the buffer to -20°C immediately after use.

Lumio™ Enhancer

The Lumio™ In-Gel Detection Enhancer is a proprietary solution and is designed to reduce the non-specific binding of Lumio™ Green Detection Reagent with endogenous proteins.

BenchMark™ Fluorescent Protein Standard

The BenchMark™ Fluorescent Protein Standard (available separately from Invitrogen, page vi) allows easy and direct visualization of molecular weight ranges of your Lumio™ fusion protein on a SDS-PAGE gel. For detailed information and specifications, refer to the BenchMark™ Fluorescent Protein Standard manual.

The standard consists of 7 distinct protein bands in the range of ~11-155 kDa and is supplied in a ready-to-use format. The standard proteins are easily detected using a UV transilluminator or a laser-based scanner at the same excitation and emission wavelengths as your Lumio™ fusion protein.

Signal Stability

The Lumio™ Green Detection Reagent forms a covalent bond with Lumio™ tag of the protein producing a stable Lumio™ signal. Proteins labeled with the Lumio™ Green Reagent can be stored at -20°C for up to 5 days without any loss in signal.

Continued on next page

Using Lumio™ Green Detection Kit, Continued

Materials Needed

You will need the following items:

- Lumio™ Green Detection Reagent (included in the kit)
 - 4X Lumio™ Gel Sample Buffer (included in the kit)
 - Lumio™ In-Gel Detection Enhancer (included in the kit)
 - Protein samples containing the Lumio™ fusion proteins
 - Appropriate pre-cast gels and running buffer (page vi)
 - Water bath set at 70°C
 - UV transilluminator equipped with a standard camera or a laser-based scanner (see **Visualizing the Gel**, page 7)
-



For optimal results with the Lumio™ Green Detection Kit, follow these guidelines:

- Load at least 1 picomole of the Lumio™ fusion protein
 - Use 5 µl of BenchMark™ Fluorescent Protein Standard on a mini-gel as a molecular weight marker
 - **Always use the Lumio™ Gel Sample Buffer (4X) to prepare samples for electrophoresis**
 - Wear protective clothing, eyewear, and gloves suitable for use with dimethyl sulfoxide (e.g. nitrile gloves) when handling the Lumio™ Green Detection Reagent
 - Use the Lumio™ Gel Sample Buffer (4X) in a certified fume hood
 - Use an appropriate percentage of acrylamide gel that will best resolve your protein of interest
 - Visualize the gel immediately after electrophoresis to prevent diffusion of proteins as the proteins are not fixed in the gel during detection with Lumio™ Green Reagent
 - Avoid touching the gel with bare hands while handling or imaging the gel
 - Avoid storing the protein sample in the Lumio™ Gel Sample Buffer or Lumio™ Green Detection Reagent
-

Continued on next page

Using Lumio™ Green Detection Kit, Continued

Procedure

After preparing the lysate, prepare samples for electrophoresis using Lumio™ Detection Reagents as described below.

1. Prepare protein samples as follows:

Protein Sample	Sample Vol.	Lumio™ Gel Sample Buffer (4X) Vol.
Bacterial samples (page 9)	15 µl	5 µl
Mammalian lysate (Step 8, page 11)	15 µl	5 µl
Partially purified	15 µl	5 µl
Purified sample	15 µl	5 µl
<i>In vitro</i> expressed (Step 5, page 10)	20 µl	Not needed*

*There is no need to add Lumio™ Gel Sample Buffer (4X) as the sample is already prepared in this buffer.

2. Thaw the Lumio™ Green Detection Reagent and mix well.
3. To the protein samples from Step 1, add 0.2 µl Lumio™ Green Detection Reagent using a 2 µl-pipettor (P2 pipettor) in a fume hood. Mix well. Return the Lumio™ Green Detection Reagent to -20°C immediately after use.
4. Incubate at 70°C for 10 minutes.
5. Allow the sample to cool for 1-2 minutes and centrifuge briefly at maximum speed in a microcentrifuge.
6. Thaw the Lumio™ In-Gel Detection Enhancer and mix well.
7. Add 2 µl Lumio™ In-Gel Detection Enhancer to the sample.
8. Mix well and incubate the samples at room temperature for 5 minutes. Immediately return the Lumio™ In-Gel Detection Enhancer to -20°C. You may store Lumio™ labeled proteins at -20°C for up to 5 days (page 12).
9. Load 5-20 µl of the sample on an appropriate gel and perform electrophoresis. **Note:** For NuPAGE® Novex Gels, do not add NuPAGE® Antioxidant in the running buffer for electrophoresis.
10. After electrophoresis is complete, remove gel from the cassette and proceed immediately to **Visualizing and Imaging the Gel**, next page. **Note:** The sensitivity of detection is much higher when the gel is visualized and imaged after removal from the cassette.

Continued on next page

Using Lumio™ Green Detection Kit, Continued

Visualizing and Imaging the Gel

Be sure to adjust the settings on the camera **prior to turning on the UV light** on the UV transilluminator. The fluorescent dye of the Lumio™ Green Reagent is sensitive to photobleaching. Avoid exposing the gel to UV light for a long time.

1. Place the gel on a UV transilluminator equipped with a standard camera and make sure the ethidium bromide or SYBR® Green filter is selected on the camera.

You may also use a laser-based scanner with a laser line that falls within the excitation maxima of the stain (500 nm), and a 535 nm long pass filter or a band pass filter centered near the emission maxima of 535 nm (pages 5 and 7 for more details).

2. Image the gel with a suitable camera with the appropriate filters using 4-10 second exposure. You may need to adjust the brightness and contrast to reduce any faint non-specific bands.

You should see fluorescent bands of Lumio™ fusion proteins and the gel should have minimal background as shown on page 18. **Note:** The Lumio™ fusion protein bands appear white or black depending on the type of imaging system used for imaging the gels.



Note

- The fluorescent signal is stable for 10-15 minutes, if the gel is not exposed to UV light.
 - The fluorescence emission of the Lumio™ Green Detection Reagent is in the green light region. If you have a suitable imaging system with a colored camera and appropriate filters, you may be able to visualize and image the emitted green fluorescence.
 - Longer exposure times may produce a fluorescent dye front.
-



Important

The detection with Lumio™ Green Detection Kit is not permanent and is lost by subsequent staining of the gel with other protein stains. It is extremely important to record a permanent image of the gel prior to staining the gel with protein stains and gel drying.

Continued on next page

Using Lumio™ Green Detection Kit, Continued

Staining the Gel for Total Protein

After detecting the Lumio™ fusion proteins, the gel can be stained with SimplyBlue™ SafeStain (Coomassie® G-250 stain), Coomassie® R-250 stain, or a fluorescent protein stain such as SYPRO® Ruby Protein Gel Stain (available from Molecular Probes, cat. no. S-12000) to view the total protein content of the sample.

1. Record a permanent image of the gel after detecting the Lumio™ fusion proteins.
2. Follow the appropriate staining protocol described below.

SimplyBlue™ SafeStain Procedure

1. Rinse the mini-gel 3 times for 5 minutes with 100 ml deionized water.
2. Stain the gel for 1 hour with gentle shaking at room temperature with enough SimplyBlue™ SafeStain (page vi for ordering information) to cover the gel.
3. Wash the gel with 100 ml deionized water for 1-3 hours.

Coomassie® R-250 Staining Procedure

You may use any Coomassie® R-250 staining procedure of choice. Perform fixing, staining, and destaining steps using a procedure of choice.

Fluorescent Protein Staining Procedure

Follow the manufacturer's instructions to stain and view the protein bands on the gel using SYPRO® Ruby Protein Gel Stain (available from Molecular Probes, cat. no. S-12000).

Continued on next page

Using Lumio™ Green Detection Kit, Continued

Western Blotting

To perform western blotting and immunodetection after using the Lumio™ Green Detection of Lumio™ fusion proteins:

1. Record a permanent image of the gel after detecting the Lumio™ fusion proteins.
2. Perform western blotting and immunodetection using a method of choice.

To visualize Lumio™ fusion proteins transferred onto a nitrocellulose or PVDF membrane, see below.

Detecting Lumio™ Fusion Proteins on a Blot

Visualize the Lumio™ fusion protein transferred onto a nitrocellulose or PVDF membrane using any method described below.

- Use a hand held UV lamp to view proteins on the membrane.
 - Place the membrane on a UV transilluminator equipped with a standard camera. Visualize and image the membrane by exposing the membrane to UV light from the bottom or by exposing the membrane to UV light from the top (you may place the UV transilluminator on its side to illuminate the blot or use a top illuminating system).
 - Use a laser-based scanner with appropriate filters to visualize and image the membrane by epi-illumination (reflective).
-

Preparing Protein Bands for MS Analysis

Proteins detected with the Lumio™ Green Detection Kit are compatible with mass spectrometry (MS) analysis.

After detection with Lumio™ Green Detection Kit, excise the protein band/spot and prepare your samples for MS analysis using a method of choice or as directed by your core facility.

The Lumio™ Green Detection protocol produces the following protein modifications. Be sure to account for these during MS analysis.

- Cysteines in the protein are modified and will result in the addition of 97.07 Da to each cysteine.
 - The total molecular weight of the Lumio™ tag with the Lumio™ Green Reagent is 1060 Da (molecular weight of the Lumio™ Green Reagent without EDT is 475 Da and molecular weight of the Lumio™ tag is 585 Da).
-

Expected Results

Results

An example of Lumio™ Green Detection of Lumio™ fusion proteins using the procedure described on page 14 is shown below.

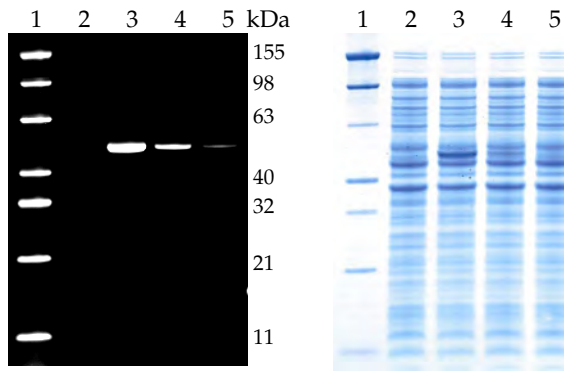
Protein samples were labeled using the Lumio™ Green Detection Kit and electrophoresed on a NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel. The Lumio™ fusion protein signal was detected and imaged on a UV transilluminator (302 nm) equipped with a standard camera (A), subsequently the gel was Coomassie® stained for total protein detection with SimplyBlue™ SafeStain (B).

Lane 1: 5 µl BenchMark™ Fluorescent Protein Standard

Lane 2: BL21 Star™ *E. coli* extract-negative control

Lanes 3-5: 1200 ng, 240 ng, 48 ng, respectively, of pure 48 kDa Lumio™ fusion protein mixed with BL21 Star™ *E. coli* lysate

Lumio™ Green Detection (A) SimplyBlue™ SafeStain (B)



Troubleshooting

Introduction Solutions for possible problems you might encounter while using the Lumio™ Green Detection Kit are listed below.

Problem	Cause	Solution
No bands or weak signal	Check labeling protocol	<p>Be sure to follow the labeling protocol as described on page 14 to obtain the best results.</p> <p>Make sure you have added the Lumio™ Green Detection Reagent to the samples prior to electrophoresis.</p> <p>Limit exposure of the Lumio™ Gel Sample Buffer (4X) to air. Always return the Lumio™ Green Reagent and Lumio™ Enhancer to -20°C immediately after use to preserve the activity of buffers.</p>
	Low protein load or low expression level	<p>Check total protein loaded on the gel by staining the gel with a total protein stain (page 16). Load at least 1 pmole of the Lumio™ fusion protein.</p> <p>Make sure the Lumio™ tag is in frame and the protein is expressed properly. A positive control is supplied with the Lumio™ vectors to verify the expression protocol.</p>
	Gel is exposed to UV light for a long time	Avoid exposing the gel to UV light for a long time. The fluorescent dye of the Lumio™ Green Reagent is sensitive to photobleaching.
	Gel is not visualized immediately or imaged properly	<p>Be sure to visualize the gel after removing gel from the cassette and view the gel immediately after electrophoresis. Use a UV transilluminator or a laser-based scanner using appropriate filters (page 7).</p> <p>Tip: If you have run BenchMark™ Fluorescent Protein Standard on the same gel and can view the standard bands on the gel, then you are imaging the gel properly.</p>

Continued on next page

Troubleshooting, Continued

Problem	Cause	Solution
High or uneven background	Improper handling of gels or dirty imaging platform	Avoid touching the gel with bare hands while handling or imaging the gel. Always clean the imaging platform with a paper towel prior to imaging the gel to minimize any background fluorescence.
	Protein overloaded	Decrease the protein concentration or lower the sample volume.
	Non-specific bands	Use the Lumio™ In-Gel Detection Enhancer to minimize non-specific binding. Certain proteins from <i>E. coli</i> lysates (SlyD, 21 kDa) and serum proteins (BSA, 66 kDa) from the mammalian cell culture medium may cross-react with the Lumio™ Green Reagent producing non-specific bands. Removing the cell culture medium and washing the mammalian cells 3-4 times with PBS after harvesting the cells minimizes the non-specific binding from BSA.

Appendix

Recipes

NP-40 Lysis Buffer (5X)

Mix the following items to prepare 200 ml of 5X NP-40 Lysis Buffer:

5 M NaCl	30 ml
NP-40 (Igepal CA-630, Sigma #I-3021)	10 ml
1 M Tris, pH 8.0	50 ml
<u>Water</u>	<u>110 ml</u>
Total Volume	200 ml

Store the buffer at room temperature.

Immediately before use, dilute 5X NP-40 buffer to 1X with deionized water and use this buffer to prepare lysates from mammalian cells (page 11). Add protease inhibitors (optional, but recommended).

Lysis Buffer

50 mM potassium phosphate, pH 7.8
400 mM NaCl
100 mM KCl
10% glycerol
0.5% Triton® X-100
10 mM imidazole

1. Prepare 1 M stock solutions of KH_2PO_4 and K_2HPO_4 .
 2. For 100 ml, dissolve the following reagents in 90 ml of deionized water:
 - 0.3 ml 1 M KH_2PO_4
 - 4.7 ml 1 M K_2HPO_4
 - 2.3 g NaCl
 - 0.75 g KCl
 - 10 ml glycerol
 - 0.5 ml Triton® X-100
 - 68 mg imidazole
 3. Mix thoroughly and adjust pH to 7.8 with HCl. Bring the volume to 100 ml.
 4. Store at 4°C.
-

Technical Service

Contact Us

For more information or technical assistance, call, write, fax, or email. Additional international offices are listed on our Web page (www.invitrogen.com).

Corporate Headquarters:

Invitrogen Corporation
1600 Faraday Avenue
Carlsbad, CA 92008 USA

Tel: 1 760 603 7200

Tel (Toll Free): 1 800 955 6288

Fax: 1 760 602 6500

E-mail: tech_service@invitrogen.com

European Headquarters:

Invitrogen Ltd
Inchinnan Business Park
3 Fountain Drive
Paisley PA4 9RF, UK

Tel: +44 (0) 141 814 6100

Tech Fax: +44 (0) 141 814 6117

E-mail: eurotech@invitrogen.com

MSDS

To request an MSDS, visit our Web site at www.invitrogen.com. On the home page, go to 'Technical Resources', select 'MSDS', and follow instructions on the page.

Limited Warranty

Invitrogen is committed to providing our customers with high-quality goods and services. Our goal is to ensure that every customer is 100% satisfied with our products and our service. If you should have any questions or concerns about an Invitrogen product or service, contact our Technical Service Representatives. Invitrogen warrants that all of its products will perform according to the specifications stated on the certificate of analysis. The company will replace, free of charge, any product that does not meet those specifications. This warranty limits Invitrogen Corporation's liability only to the cost of the product. No warranty is granted for products beyond their listed expiration date. No warranty is applicable unless all product components are stored in accordance with instructions. Invitrogen reserves the right to select the method(s) used to analyze a product unless Invitrogen agrees to a specified method in writing prior to acceptance of the order. Invitrogen makes every effort to ensure the accuracy of its publications, but realizes that the occasional typographical or other error is inevitable. Therefore Invitrogen makes no warranty of any kind regarding the contents of any publications or documentation. If you discover an error in any of our publications, report it to our Technical Service Representatives. **Invitrogen assumes no responsibility or liability for any special, incidental, indirect or consequential loss or damage whatsoever. The above limited warranty is sole and exclusive. No other warranty is made, whether expressed or implied, including any warranty of merchantability or fitness for a particular purpose.**

Purchaser Notification

Limited Use Label License No 167: Target Sequences for Synthetic Molecules

This product and/or its use is the subject of one or more of U.S. Patent Nos. 5,932,474, 6,008,378, 6,054,271, and 6,451,569 and foreign equivalents owned by and/or licensed to Invitrogen Corporation. The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product and components of the product in research conducted by the buyer (whether the buyer is an academic or for-profit entity). The buyer cannot sell or otherwise transfer (a) this product (b) its components or (c) materials made using this product or its components to a third party or otherwise use this product or its components or materials made using this product or its components for Commercial Purposes. The buyer may transfer information or materials made through the use of this product to a scientific collaborator, provided that such transfer is not for any Commercial Purpose, and that such collaborator agrees in writing (a) to not transfer such materials to any third party, and (b) to use such transferred materials and/or information solely for research and not for Commercial Purposes. Commercial Purposes means any activity by a party for consideration and may include, but is not limited to: (1) use of the product or its components in manufacturing; (2) use of the product or its components to provide a service, information, or data; (3) use of the product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product or its components, whether or not such product or its components are resold for use in research. Invitrogen Corporation will not assert a claim against the buyer of infringement of the above patents based upon the manufacture, use, or sale of a therapeutic, clinical diagnostic, vaccine or prophylactic product developed in research by the buyer in which this product or its components was employed, provided that neither this product nor any of its components was used in the manufacture of such product. If the purchaser is not willing to accept the limitations of this limited use statement, Invitrogen is willing to accept return of the product with a full refund. For information on purchasing a license to this product for purposes other than research, contact Licensing Department, Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California 92008. Phone (760) 603-7200. Fax (760) 602-6500.

References

Adams, S. R., Campbell, R. E., Gross, L. A., Martin, B. R., Walkup, G. K., Yao, Y., Llopis, J., and Tsien, R. Y. (2002). New Biarsenical Ligands and Tetracysteine Motifs for Protein Labeling in Vitro and in Vivo: Synthesis and Biological Applications. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 6063-6076.

Griffin, B. A., Adams, S. R., and Tsien, R. Y. (1998). Specific Covalent Labeling of Recombinant Protein Molecules Inside Live Cells. *Science* 281, 269-272.

©2004 Invitrogen Corporation. All rights reserved.

For research use only. Not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Coomassie® is a registered trademark of Imperial Chemical Industries, PLC. Triton® X-100 is a registered trademark of Rohm & Haas, Co.



Corporate Headquarters:

Invitrogen Corporation
1600 Faraday Avenue
Carlsbad, California 92008
Tel: 1 760 603 7200
Tel (Toll Free): 1 800 955 6288
Fax: 1 760 602 6500
Email: tech_service@invitrogen.com

European Headquarters:

Invitrogen Ltd
Inchinnan Business Park
3 Fountain Drive
Paisley PA4 9RF, UK
Tel (Free Phone Orders): 0800 269 210
Tel (General Enquiries): +44 (0) 141 814 6100
Fax: +44 (0) 141 814 6260
Email: eurotech@invitrogen.com

International Offices:

Argentina 5411 4556 0844
Australia 1 800 331 627
Brazil 55 11 5051 7422
Canada 800 263 6236
China 10 6849 2578
Hong Kong 2407 8450
Japan 03 3663 7974
New Zealand 0800 600 200
Singapore 65 686 186 38
Taiwan 2 2651 6156

For other countries see our website

www.invitrogen.com

