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

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Identification de gènes de virulence chez Brucella melitensis 16M par Signature Tagged Mutagenesis

Dricot, Amélie

Award date:
2000

Link to publication

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

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

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

Download date: 02. May. 2026

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

Identification de gènes de virulence chez *Brucella melitensis* 16M par « Signature Tagged Mutagenesis ».

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

Amélie Dricot

Juin 2000

Errata

Perspectives concernant le mutant 9C6 (FliF) à rajouter p 55.

L'atténuation du mutant a été confirmée et quantifiée *in vivo* selon la méthode d'infection en compétition. Dans le cas du mutant 9C6, le gène disrupté semble intervenir dans la formation d'un système flagellaire ou peut-être d'un système de sécrétion de type III. Si le mutant et la sauvage se trouvent dans le même compartiment intracellulaire, on peut penser que des effecteurs sécrétés par la souche sauvage pourraient complémenter la souche mutante. L'atténuation observée n'étant dès lors pas l'atténuation effective de ce mutant. Afin de vérifier cela, de nouvelles infections *in vivo* seront réalisées mais cette fois plus en compétition, ceci afin de déterminer si le mutant est atténué de façon plus importante lorsqu'il est seul que lorsqu'il est accompagné de la souche sauvage.

P 31.

La phrase « En effet, les clones incapables de pousser *in vivo* ne seront plus représentés ou nettement moins présents dans l'output par rapport à l'input pool (fig 15). ».

Lire « En effet, les clones incapables de pousser *in vivo* ne seront plus représentés ou nettement moins présents dans l'output par rapport à l'input pool. ».

P 57, 5) Le mutant 9A12.

La phrase « La vacuole phagolysosomiale étant pauvre en nutriments on comprend aisément que des mutants dans ce type de protéine aient du mal à s'y répliquer. ».

Lire « La vacuole de réplication de *Brucella* étant pauvre en nutriments, on comprend aisément que des mutants dans ce type de protéine aient du mal à s'y répliquer. ».

Le tagged mini-Tn*5*.

L'orthographe de ce mot a quelque peu varié durant la rédaction de ce mémoire. Finalement son orthographe correcte est « tagged mini-Tn*5* ».

Matériel et méthode.

P 62 , 5.1 Types de milieu utilisés pour la culture bactérienne. Ajouter les milieux pH suivant :

Milieu 2YT à pH 5 : pour 50 ml de milieu, il faut :
-24,3 ml d'acide citrique ($C_6H_5O_7Na_3.2H_2O_2$) 0,1M.
-25,7 ml d'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4) 0,2M.
-2,1 gr de 2YT solide.

Milieu 2YT à pH 5,4 : pour 50 ml de milieu, il faut :
-22,2 ml de $C_6H_5O_7Na_3.2H_2O_2$ 0,1M.

-27,8 ml de Na_2HPO_4 0,1M.
-2,1 gr de 2YT solide.

Milieu 2YT à pH 7 : pour 50 ml de milieu, il faut :
-6,5 ml de $C_6H_5O_7Na_3.2H_2O_2$ 0,1M.
-43,5 ml de Na_2HPO_4 0,1M.
-2,1 gr de 2YT solide.
Auto-claver les milieux.

P 42.
Graphiques 3.2 et 3.3 : en ordonnée lire « Log CFU » au lieu de « Log ».

Bibliographie.
P 96, la référence « Wilson.(1999) Bacteria-Host Interaction in Health and Disease. » doit être remplacée par : Henderson B., W.M., McNab R., Lax A. J. (1999) *Bacteria-Host Interaction in Healt Disease*. Wiley, New York.

Remerciements.
Pardon David et Val, j'ai été trop vite et du coup je vous ai oublié parmis les quelques noms que j'ai cités. Même si cela a été dit de vive voix, je tiens à mettre sur papier un grand merci à tous les deux. David pour ton aide précieuse et tes conseils tout au long de ce travail et pour tes explications sur le mutant qui nous intéresse tous les deux. Val, pour ta gentillesse et ton aide par-ci par-là quand j'en avais besoin.
Merci également aux lecteurs de ce mémoire pour le temps qu'ils y consacreront.

-Cotation pour l'élève Vitriol quant à son orthographe déplorable
et l'oubli de certains italiques -20/20

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

Identification de gènes de virulence chez *Brucella melitensis* 16M par « Signature Tagged Mutagenesis »

DRICOT Amélie

Résumé

Les mécanismes de virulence mis en jeu par *Brucella* sp. sont très peu connus et de nombreuses questions restent posées quant à la relation de ce pathogène avec son hôte. Dans le but de mieux comprendre les mécanismes de virulence de *Brucella*, nous avons dans un premier temps criblé *in vivo* une banque de 3 fois 96 mutants transpositionnels de *Brucella melitensis* via la méthode de « Signature Tagged Mutagenesis » (STM) qui nous a permis de sélectionner 11 mutants atténués *in vivo*. L'atténuation de ces 11 mutants a ensuite été quantifier en souris BALB/c selon le modèle d'infections compétitives, de même leur virulence dans des modèles *in vitro* (macrophages bovins et cellules HeLa) a été étudiée. Leur résistance aux stress oxydatifs et acides ainsi que leur capacité à pousser sur un milieu pauvre ont été investigués De même il a été montré qu'aucun des mutants n'étaient rugeux. Enfin, l'obtention des fragments d'ADN bordant le tagged mini-*Tn5* via les méthodes de PCR arbitraire(Arbitrary Polymerase Chain Reaction) et PCR inverse (IPCR), nous a permis d'identifier les gènes mutés. Les gènes identifiés peuvent être classés en différentes catégories reprenant des gènes de métabolisme, un gène de système flagellaire, un gène de symbiose et des genes de résistance aux stress.

Mémoire de licence en Sciences biologiques
Juin 2000
Promoteur: J.-J. Letesson

« It barks at no-one else but me, like its seen a ghost,. I guess its seen the sparks a-flowin, no-one else would know. Sometimes I get over charged thats when you see sparks. They asked where the hell I'm going at a thousand feet per second...Hey man slowdown. Idiot slow down.

Formation accélérée en biologie moléculaire.

Programme des 4 mois de la formation :

Outre les deux trois petites choses relatives à la biologie moléculaire ce programme de quatre mois vise les objectifs suivants :

	Résultats pour l'élève Vitriol
Ne pas poser de bètes questions	2/10
Ne pas dire de bétises	2/10
Ne pas faire de bétises	7/10
Nettoyer régulièrement sa tasse à café	-20/10
Rester Zen en toute circonstances	5/10
Ne pas jeter ou perdre une seule fois ses minipreps	0/10
Ecouter d'un air attentif voir passioné son tuteur	6/10
Ecouter d'un air passionné , le regard vif son promoteur	7/10
Atteindre un niveau d'abnégation total de soi	5/10
Faire preuve d'intelligence	5/10
Ne jamais oser faire preuve d'humour sarcastique envers ses supérieurs	3/10
Rire à toutes les blagues qu'on vous fait (même si elle sont mauvaises)	9/10
Penser que la vie est quand même passionnante	10/10

Merci Mr. chef Letesson pour l'attention, les conseils et la confiance que vous m'avez apporté. Je ne pense pas qu'on puisse rêver d'un meilleur boss (et votre cravate est super !). Merci mon maître Calou pour m'avoir supporter et suivi si longtemps avec tant de patience et merci surtout pour tout ce que tu m'as appris (la formation accélérée c'était toi). Tu

m'auras souvent bien fait rire de mes erreurs et j'ai particulièrement apprécié ton énorme coup de main dans les derniers moments alors que je n'en pouvait plus, tu es mon idole !
Merci Cricri chéri pour ta disponibilité et toutes les petites choses qui m'ont souvent facilité la vie, tu fus bon pour moi malgré ton grand âge.
Merci à tous les autres du labo , Zettouille , Anne, Xa, Nanard, Kat, Mimi, Poos, Garçon Rose-May, Nat (et tous les autres que je ne peux pas tous citer tellement il y en a), pour votre disponibilité et vos conseils. Vous avez tous fortement contribué à divers degrés à ce que l'ambiance de travail soit agréable, vous ne vous imaginez pas à quel point c' était important pour moi.
Merci mes géniteurs papa maman pour avoir un jour eu l'envie de faire un deuxième enfant et de l'avoir tout de même gardé après sa naissance. Je ne peux pas écrire ici tout ce que vous êtes pour moi mais en gros, vous avez fait de moi ce que je suis aujourd'hui et quoi qu'on en dise, ce n'est pas si mal. Je vous aime...
Merci Jérémy pour ta présence.
Merci aux personnes du laboratoire de Mr. Goffinet pour les séquençages.
Et finalement merci aux nombreuses souris (quoi qu' elles n'en aient pas grand chose à faire d'autant plus ou elles se trouvent maintenant) qui ont servi aux infections. Les connaissances scientifiques actuelles ne seraient pas ce qu'elles sont si il n'y avait pas tout ces petits ou grand cobayes animaux. Sachons les utiliser avec parcimonie (ce pourquoi je n'ai pas toujours été à la hauteur).
Un dernier petit mot pour mes compagnons de route et je ne sais plus quoi écrire bref soit, vous savez tous quoi et bonne ... pour la suite.

A Martin mon
filleul,

Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
CFU : colony forming unit
G- : gram négatif
IC : index de compétition
ID : dose infectante
IP : intra-péritonéale
IPCR : inverse polymerase chain reaction
IVET : *in vivo* expression technology
Ivi : *in vivo* induced gene
Kan : kanamycine
LB : Luria Bertani
LD : dose léthale
LPS : lipopolysaccharide
NADPH : nicotinamide adénosine dinucléotide
Nal : acide nalidixique
Nal r : résistant à l'acide nalidixique
OMS : organisation mondiale de la santé
pb : paire de base
PBS : phosphat buffer salin
PCR : polymerase chain reaction
PMN : polymorphonucléaire
RIVET : resolvase in vivo expression technology
SPV : *Salmonella* plasmid for virulence
SPI : *Salmonella* pathogenicity island
STM : signature tagged mutagenesis
Tn : transposon
Yop : *Yersinia* outer membrane protein

Table des matières

Avant-propos : quelques chiffres. 5
1.Introduction 8
1.1 Virulence et pathogénicité: définition et caractéristiques. 8
1.2 Le cycle infectieux. 10
1.2a Le recrutement. 10
1.2b L'adhérence. 10
1.2c La colonisation et l'invasion. 11
1.2d La multiplication, pathologie et transmission. 12
1.3 Le schéma classique de la phagocytose en cellules phagocytaires professionnelles. 13
1.4 Les bases génétiques de la virulence. 16
1.4a Les plasmides de virulence. 16
1.4b Les bactériophages. 16
1.4c Les îlots de pathogénicité. 17
1.5 Les systèmes de sécrétion 18
1.5a Le système de sécrétion de type III. 18
1.5b Le système de sécrétion de type IV 19
1.6 Brucella spp. 21
1.6a Généralités. 21
1.6b Epidémiologie 21
1.6c Cycle infectieux de *Brucella*. 22
1.6d Les facteurs de virulence chez *Brucella spp.* 24
1.7 Techniques moléculaires d'étude de l'expression des gènes de virulence induit in vivo par un pathogène durant son cycle infectieux. 27
1.7a In Vivo Expression Technology (IVET). 27
1.7b Signature Tagged Mutagenesis (STM) (fig 14). 30
1.7c Le séquençage des génomes. 33
2.But du mémoire. 34
3.Résultats et discussion. 36
3.1 Identification de mutants atténués par Signature Tagged Mutagenesis (STM) chez B. melitensis 16M. 36
3.1a La méthode STM et ses contraintes. 36
3.1b Identification par STM de mutants de *Brucella* atténués en souris. 39
3.2 Caractérisation phénotypique des 11 mutants. 40
3.2a Confirmation *in vivo* de l'atténuation. 40
3.2b Confirmation *in vitro* de l'atténuation. 41
3.2c Caractérisation phénotypique des 11 mutants par expérimentation *in vitro*. 42
3.2c1 Test de croissance en présence d' H_2O_2. 42

3.2c2 Test de croissance sur milieu minimum (MM). 43
3.2c3 Test de croissance aux pH 5,5.4 et 7. 44
3.2c4 Cristal violet 44
3.3 Résumé de la caractérisation phénotypique des 11 mutants. 45
3.4 Caractérisation génotypique des 11 mutants : les différentes techniques employées en vue d'aboutir au séquençage des gènes disruptés par le tagged Mini-Tn5. 45
3.4a « Matériel de base », l'obtention de l'ADN génomique des 11 mutants. 46
3.4b Distinction des 11 mutants par Southern blot. 46
3.4c PCR arbitraire sur l'ADN génomique. 47
3.4d IPCR sur fragments d'ADN génomique restreints via l'enzyme *Eco*RV. 49
3.4e Mini prep et restriction *Eco*RI diagnostique. 51
3.4f PCR pour séquençage. 51
3.4g Résultats du séquençage. 51
3.5Discussion générale. 52
1) Le mutant 8A8. 52
2) Le mutant 8C7. 53
3) Le mutant 9C6. 54
4) Le mutant 9A3. 55
4. Conclusions et Perspectives 59
5.Matériel et méthodes. 62
5.1Types de milieu utilisés pour la culture bactérienne. 62
5.2 Souches bactériennes et plasmides. 63
5.3 Les manipulation en biomoléculaire 64
5.3a Electrophorèse en gel d'agarose. 64
5.3b Purification de bandes d'ADN extraites d'un gel d'agarose. 65
5.3c Extraction d'ADN génomique. 66
5.3d Restrictions. 66
5.3e Ligations avec la ligase T4. 67
5.3f Cellules CaCl2 compétentes. 68
5. 3g Transformation des cellules compétentes 69
5. 3h Minipréparation d'ADN plasmidique 69
5. 3i Southern blot 70
5.3j Polymerase Chain Reaction (PCR). 73
5.5k La PCR arbitraire. 74
5.5l L'inverse PCR 75
5.3m Signature Tagged Mutagenesis (STM). 76
5.4 Les manipulations en microbiologie. 78
5.4a Confirmation in vivo de l'atténuation par méthode d'infection compétitives. 78
5.4b Infection de cellules HeLa et de macrophages. 79
5.4c Test H2O2. 81
5.4d Test sur milieu minimum (MM). 81

5.4e Cristal violet.....81

6 Bibliographie.....83

Identification de gènes de virulence chez *Brucella melitensis* 16M par « Signature Tagged Mutagenesis ».

Principales causes de décès

nombre de décès pour toutes causes : 53,9 millions dans le monde en 1998

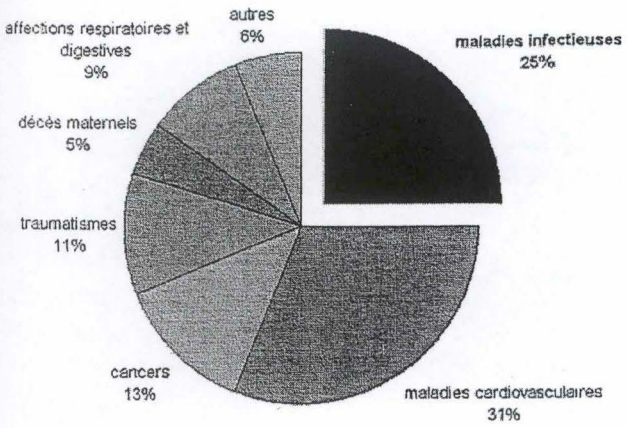


Fig 1A

Principales causes de décès prématurés

de 0 à 44 ans
ensemble du monde, estimations pour 1998

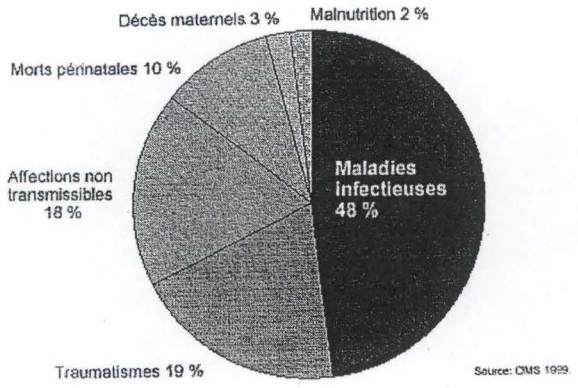


Fig 1B

Principales causes de décès chez les enfants

de 0 à 4 ans
ensemble du monde, estimations pour 1998

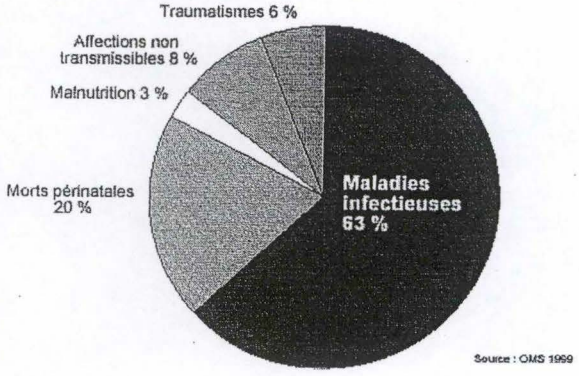


Fig 1C

Principales causes de décès dans les pays à faible revenu

Asie du sud-est et Afrique,
estimations pour 1998

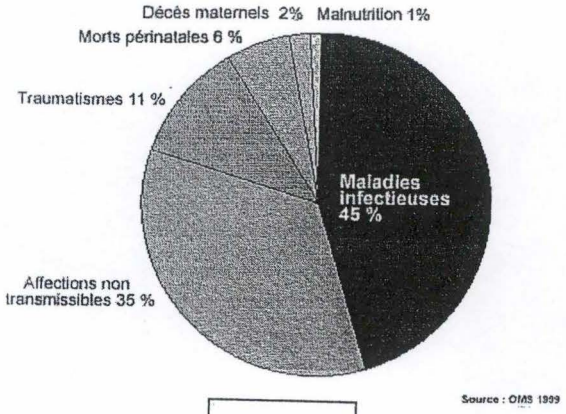


Fig 1D

La charge de la morbidité

Années de vie corrigées de l'incapacité (AVCI) perdues en 1998
par suite de maladies infectieuses (en millions, tous âges confondus)

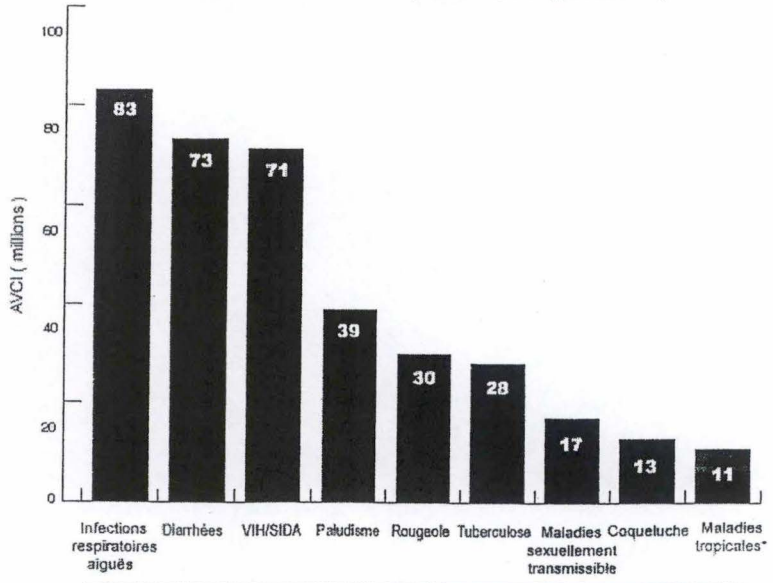


Fig 1E: une AVCI correspond à la perte d'une année de vie en bonne santé.

Avant-propos : quelques chiffres.

Le rapport de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) de 1999 fait état qu'en 1998, 58.9 millions d'êtres humains sont morts à travers le monde entier. La première cause de mortalité sont les accidents cardiovasculaires (31 %) suivis de très près par les maladies infectieuses qui constituent 25 % de la mortalité mondiale (fig 1A, table 1). En se concentrant sur une tranche d'âge allant de 0 à 44 ans, les décès dus aux maladies infectieuses sont largement majoritaires avec 48 % de la mortalité mondiale (fig 1B), chez les enfants de 0 à 4 ans, ce taux atteint le chiffre impressionnant de 68 % (fig 1C). Il est étonnant de constater qu'à l'aube du troisième millénaire, tant de gens meurent encore chaque année suite à des infections et que le taux de morbidité humaine toujours dû à ces mêmes maladies reste en permanence très élevé à l'échelle mondiale (fig 1D). On constate que ces maladies infectieuses font beaucoup plus de dégâts dans les pays en voie de développement que dans les pays industrialisés (jusqu'à 45 % de la mortalité en Afrique et au sud-est de l'Asie) (fig 1E), et ce en raison de différents facteurs comme la pauvreté du secteur sanitaire, la malnutrition, les problèmes d'accessibilité à l'eau potable, les diverses pollutions et les problèmes socio-politique des pays concernés.

Toute fois, fortunés que nous sommes de vivre dans les pays développés, il ne faudrait pas pour autant se croire à l'abri de ce fléau. Même si durant les dernières décennies plusieurs maladies comme la tuberculose, la peste, la diphtérie, ... pouvaient être considérées comme presque totalement éradiquées dans nos régions, on constate aujourd'hui une recrudescence de ces maladies dans les pays industrialisés. L'augmentation des mouvements de population, l'explosion du trafic passager international, le transport à grande échelle d'animaux vivants, la baisse de la garde vaccinale, l'importance du rôle que jouent des patients immunodéfficients en tant que réservoir bactérien, ... sont autant de raisons expliquant non seulement cette recrudescence de maladies infectieuses dans les pays où elles n'existaient presque plus, mais aussi l'explication de l'apparition de maladies encore jusque là inconnues (ex : virus Ebola) ou dont on ne connaît pas la cause (pathologie idiopathique) (Henderson B., 1999c).

Cause de la mortalité	Mortalité estimée	Agents infectieux
Maladies respiratoires	7-10 000 000	Bactéries, virus, protozoaires et champignons
Diarrhées	4 300 000	Bactéries et virus
Tuberculose	3 300 000	Bactéries
Sida	1-2 000 000	Virus
Malaria	1-2 000 000	Protozoaires
Hépatite	1-2 000 000	Virus
Rougeole	220 000	Virus
Méningite bactérienne	200 000	Bactéries
Bilarziose	200 000	Vers parasites
Pertussis	100 000	Bactéries
Amoebiasis	100 000	Protozoaires
Hoockworm	50 000	Vers parasites
Rage	35 000	Virus
Fièvre jaune	30 000	Virus
Paludisme	20 000	Protozoaires

Table 1 : The World Health Organization ; estimation récente la mortalité mondiale dûe à des organismes pathogènes (Wilson, 1999).

Avec la découverte des antibiotiques qui apparut comme « LA » solution, les recherches dans le domaine de la lutte anti-bactérienne se relâchèrent. Mais, les utilisations abusives ou inconsidérées de tout l'arsenal d'antibiotique disponible permirent une apparition plus rapide de souches pathogènes devenues résistantes à ces produits, par exemple, certaines zones à risque pour la tuberculose enregistrent de nombreux cas de résistance pour la plupart des médicaments habituellement prescrits. Dans certains pays, on compte jusqu'à 50 % de résistance à la pénicilline dans les cas de traitements de pneumonies et méningites, ce chiffre peut monter à une valeur de 98% dans certains cas de traitements de gonoccocies.

Aujourd'hui nous devons faire face à deux problèmes, le premier, aurait pour titre « la fin du miracle antibiotique » étant donné les apparitions toujours plus nombreuses des souches pathogènes pharmacorésistantes et l'obligation dans certains cas d'utiliser des cocktails d'antibiotiques pour venir à bout de certaines maladies. Tandis que le deuxième problème, lié au ralentissement des recherches et la pression sélective exercée par les antibiotiques, fait qu'à cette heure, les pathogènes ont évolués bien plus ces dernières décénies que les connaissances scientifiques à leur sujet. Un retard dont les conséquences se font fortement ressentir à travers toute la planète.

Face à cette catastrophe, que peut-on bien faire ? Diverses précautions tels que la vigilance vaccinale, l'utilisation raisonnée des antibiotiques, l'amélioration des secteurs sanitaires, l'octroi d'allocations financières pour les traitements de maladies dans les pays en voie de développement constitueraient déjà de grandes avancées qui pourraient fortement contribuer à faire baisser le taux mondial de mortalité dû aux maladies infectieuses. Le développement de nouveaux vaccins préventifs, efficaces, intelligents (ciblés sur une fonction spécifique de la bactérie), sans danger et à prix modique est d'une importance capitale si on veut pouvoir limiter l'apparition de ces maladies. Cependant, leur développement n'est pas chose aisée parce qu'il nécessite la connaissance approfondie de l'organisme ciblé, pour cela, diverses techniques comme IVET (In Vivo Expression Technology) (Mahan *et al.*, 1993), STM

(Signature Tagged Mutagenesis) (Hensel *et al.*, 1995)le séquençage des génomes... sont d'ores et déjà très utilisées. De plus, il est nécessaire de pouvoir effectuer des tests, d'abord sur modèle animal adéquat et ensuite, sur un échantillon représentatif de population humaine. À cela viendront s'ajouter les problèmes de conditionnement, de coût, ... La découverte ainsi que la mise sur le marché de nouveaux vaccins nécessite donc beaucoup de temps, d'argent et de travail.

(Lecture de référence : rapport de l'OMS 1999.)

1.Introduction

1.1 Virulence et pathogénicité: définition et caractéristiques.

Tout au long de l'histoire de la microbiologie, diverses définitions des termes virulence et pathogénicité ont été proposées.(Pour revue voir Casadevall *et al.*,1999). Zinsser, en 1914, défini la pathogénie comme la capacité d'un microorganisme à produire la pathologie. Selon lui, la virulence avait 2 composantes ; l'une rassemblait les propriétés passives, comme les endotoxines (par exemple le LPS (lipopolysaccharide) des bactéries Gram négative qui permet la résistance aux mécanismes bactéricides du sérum de l'organisme hôte) ; tandis que l'autre regroupait l'ensemble des molécules sécrétées ou exotoxines. Ford en 1927, quant à lui avait défini la virulence comme étant l'infectivité d'un microorganisme c'est à dire sa capacité à se reproduire dans l'hôte et à être toxique pour ce dernier. En 1983, Hoeprich identifia 3 propriétés de la virulence à savoir l'invasivité, la toxicité du microorganisme pathogène et l'hypersensibilité de type IV [(1)] de l'hôte envers celui-ci, il fut donc le premier a introduire le concept d'une relation hôte-pathogène.

(1) Hypersensibilité de type IV ou hypersensibilité retardée : lors de cette réaction, les cellules T_H1 sensibilisées lors d'un contact antérieur avec l'antigène vont migrer vers le site d'infection et y être activées. Leur activation va entraîner le recrutement d'autres cellules dont beaucoup de macrophages. Ces cellules vont alors infiltrer le tissu et provoquer une accumulation de liquides et de protéines, ce qui entraînera l'apparition d'une lésion.

Aujourd'hui l'idée que la virulence est une propriété intrinsèque des microorganismes a été abandonnée au profit de compréhension de la virulence dans le contexte d'une relation hôte-pathogène. En effet, pour être virulent, un microorganisme devra non seulement pénétrer dans son hôte de prédilection, échapper à ses systèmes de défense, trouver la niche propice à sa multiplication et utiliser de façon optimale les ressources présentes.

L'hôte quant à lui, outre l'activation de son système immunitaire (qui dans certaines circonstances peut ne pas lui être bénéfique), possède d'autres moyens lui permettant d'empêcher l'invasion par le pathogène comme par exemple, la barrière épidermique, le pH acide au niveau de son système gastrique et reproducteur, les surfaces muqueuses, l'hygiène corporelle et alimentaire, ...

C'est donc en fonction de tous ces paramètres que la pathologie pourra alors se manifester à divers degrés. Cette dernière apparaissant alors lorsque l'hôte, en fonction de toutes ces circonstances, ne parvient plus à maintenir son homéostasie interne.

Dans ce contexte, la nature ainsi que la proportion et l'étendue des dommages occasionnés dépendront de la virulence du microorganisme et du statut immunitaire de l'hôte. La virulence serait donc une propriété du pathogène mais serait surtout modulée par la susceptibilité ou la résistance de l'hôte à ce pathogène (Cossart, 1997 ; Henderson B., 1999a).

Actuellement, un microorganisme pathogène peut être défini comme étant n'importe quel organisme causant la pathologie et dont la survie dans son hôte dépend de sa capacité à se répliquer et à persister à l'intérieur de celui-ci, en évitant activement les pièges cellulaires ou humoraux de ce dernier, qui en principe devraient faire diminuer fortement la charge microbienne ou encore l'éliminer totalement (Falkow,).

La virulence quant à elle peut être définie comme la capacité du microorganisme à infecter ou à endommager son hôte. Elle peut être quantifiée par une mesure de la dose requise du pathogène ou d'un de ces constituants pour infecter (ID50 pour Infectious Dose 50) ou pour tuer (LD50 pour Lethal Dose 50) 50 % de la population des hôtes (Lipsitch and Moxon,

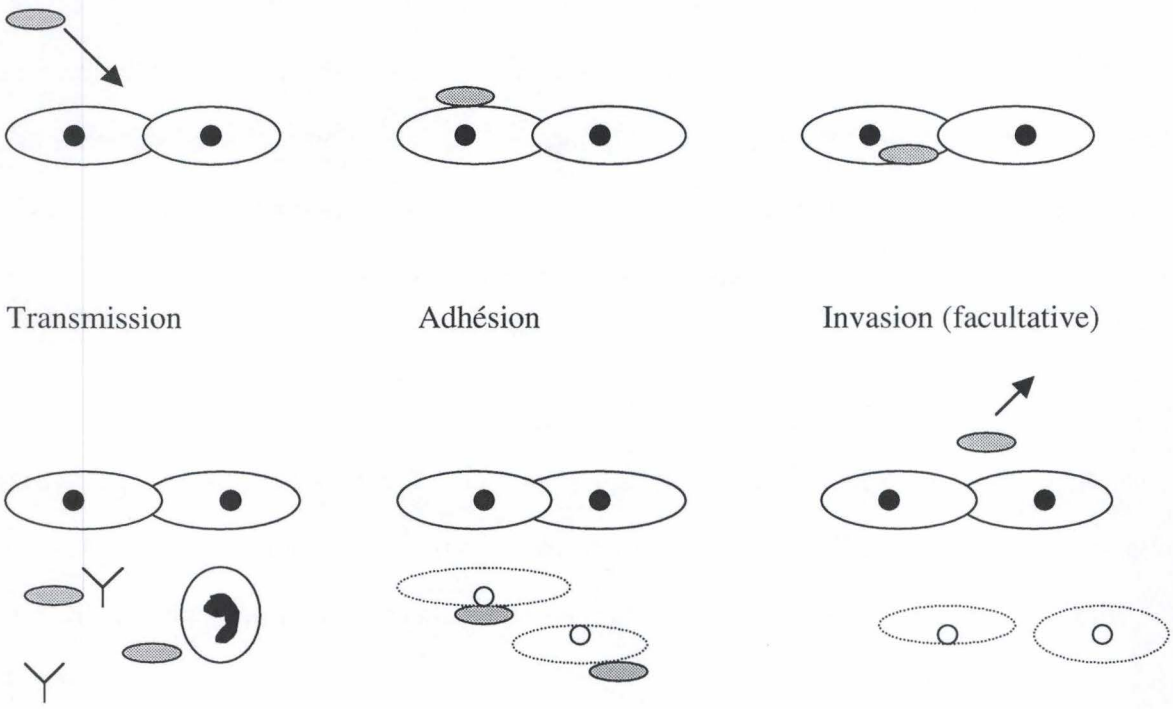


Fig 2 :Les différentes étapes cycle infectieux (Wilson, 1999 #236). Lors de son cycle infectieux, la bactérie va devoir adhérer aux surfaces épithéliales ou muqueuses afin de pouvoir envahir les tissus sous-jacents. Durant son périple, elle devra faire face aux défenses immunitaires de l'hôte. La pathologie apparaîtra lors de la destruction tissulaire induite directement ou indirectement par la bactérie. Elle pourra éventuellement sortir de son hôte et être transmise à un autre organisme

1997). Enfin, il faut noter que les bactéries pathogènes sont généralement classées en deux groupes ; les pathogènes primaires qui causent des pathogénies chez les individus normaux et les pathogènes dits opportunistes qui causent la maladie uniquement chez les individus présentant une déficience de leur système de défense (Falkow, ; Henderson B., 1999a).

1.2 Le cycle infectieux.

Le cycle infectieux d'une bactérie peut se décomposer en 5 étapes : le recrutement, l'adhésion, l'invasion, la multiplication et la transmission (fig 2).
On observe cependant des espèces pour lesquelles certaines de ces étapes sont facultatives. Etant donné la variété et la multitude des mécanismes pouvant être mis en jeu lors du processus infectieux, il ne sera donné dans les pages suivantes qu'une description non exhaustive de certains d'entre eux.

1.2a Le recrutement.

Le recrutement est l'étape précédant l'apparition de la pathogénie qui consiste en la mise en présence du microorganisme et d'un hôte adéquat. En effet, les conditions de vie essentielles au pathogène comme la présence de certains nutriments, la température, les conditions de vie en aérobiose, etc...et les facteurs de l'organisme hôte, tels que le statut immunitaire, l'hygiène, la présence des récepteurs appropriés aux adhésines du microorganisme, les facteurs psychologiques, ... constitueront en soi une limite dans le choix de l'hôte adapté au microorganisme.

1.2b L'adhérence.

L'adhérence aux surfaces épithéliales et muqueuses représente la première épreuve à franchir pour le pathogène. Le mucus, par exemple, représente à lui seul un gros problème pour certaines bactéries, celui-ci peut éliminer la plupart des bactéries grâce à ses propriétés de viscosité. Ensuite, le péristaltisme ainsi que les mouvements des cellules ciliées les

ramèneront à l'extérieur de l'organisme (Muller and Schmitz, 1997). De plus, le mucus contient aussi différentes substances comme les mucines, qui miment les ligands eucaryotiques des bactéries empêchant ainsi celles-ci de se fixer à la bonne cible, d'autres intervenants comme les lysozymes, les substances bactéricides et les IgA vont également ralentir ou empêcher la fixation et la pénétration du pathogène dans son hôte (Kilian M, 1988). En contrepartie, certaines bactéries ont en leur possession des moyens leurs permettant d'échapper au mucus, ceux-ci sont, par exemple, les flagelles et les systèmes d'orientation chémotactiques qui permettent les déplacements orientés de ces bactéries dans le mucus (Moulder, 1985), les mucinases qui clivent le mucus et fournissent ainsi des nutriments aux bactéries (Smith, 1995) et les IgA protéases qui clivent les IgA (Falkow, ; Hedges *et al.*, 1998).

1.2c La colonisation et l'invasion.

Si certaines bactéries, comme *Escherichia coli* où *Vibrio cholerae* provoquent respectivement des infections du tractus urinaire et digestif en colonisant les surfaces muqueuses tout en restant extracellulaire (Isberg, 1991), il n'en va pas de la même façon pour grand nombre d'autres pathogènes qui pénètrent dans les tissus voir dans les cellules.

La pénétration dans les cellules et tissus est un phénomène qui peut être soit actif, soit passif. L'internalisation en tant que phénomène actif, se passe lorsqu'il y a un contact physique entre une adhésine bactérienne et un récepteur à l'adhésine présent ou induit sur les surfaces épidermiques ou muqueuses de son hôte (DeVinney *et al.*, 1999 ; Finlay and Falkow, 1989). L'interaction adhésine-recepteur va, dans la plupart des cas, générer l'activation de voies de transduction du signal qui aboutira bien souvent à un réarrangement du cytosquelette, ce qui en final permettra l'internalisation par endocytose du pathogène (Finlay and Falkow, 1989; Henderson B., 1999e ; Weingart and Weiss, 2000). Un exemple de pénétration active est observé chez *Salmonella* qui pour son entrée en cellule fait, entre autres, appel à l'activation d'un de ses systèmes de sécrétion afin d'injecter dans la cellule hôte des protéines effectrices

Etape	Vitesse de multiplication et fonction
Interraction avec les surfaces muqueuses	Croissance rapide dans les muqueuses pour saturer les récepteurs qui pourraient bloquer les bactéries en contact avec les surfaces épithéliales
Logement primaire dans les tissus	Croissance rapide de petits nombres de bactéries envahisseuses pour remplacer les pertes infligées par les défenses de l'hôte lors de la réaction inflammatoire dûe à l'invasion bactérienne
Phase aigüe de la pathologie	Croissance rapide dans les tissus pour produire les effets de la pathologie avant que la réponse immune protectrice ne puisse être mise en place
Tropisme vers les tissus	Croissance subtentielle, mais pas nécessairement rapide pour ammener à une densité de population suffisante
Pathologie chronique	Croissance lente à toutes les étapes pour stimuler le moins possible la réponse immune

Table 2 : Variation du taux de croissance bactérien en fonction des étapes du cycle infectieux (Smith, 1998).

qui induiront son endocytose (Francis *et al.*, 1992). La pénétration en tant que phénomène passif se fait généralement en des sites spécifiques. Beaucoup de pathogènes intestinaux pénètrent les tissus via les cellules M (Siebers and Finlay, 1996). Les cellules M ont pour fonction de capter les antigènes du bol alimentaire et de les transférer intacts aux cellules immunitaires se trouvant dans les follicules lymphoïdes sous jacents qui se chargeront alors d'activer une réponse immunitaire appropriée en cas d'infection (Hathaway and Kraehenbuhl, 2000). Certaines bactéries entéropathogènes vont utiliser ce moyen de transport soit pour simplement traverser la barrière épithéliale ou soit pour pénétrer dans les entérocytes (Siebers and Finlay, 1996). En ce qui concerne les pathogènes extracellulaires qui se logent dans les tissus, les principaux problèmes rencontrés sont de faire face aux constituants immunitaires des liquides tissulaires. Là aussi, divers mécanismes bactériens permettant de passer outre ces systèmes de défense sont dores et déjà connus tel que la capsule polysaccharidique bactérienne qui bloque la voie alterne du complément au niveau du facteur C3b (Horstmann, 1992), la sialylation des enveloppes cellulaires des gonocoques qui permet (via un pouvoir mimétique des cellules eucaryotes) la fixation du facteur H inhibiteur du complément (Fearon, 1978), la possession de protéines de type Ig like (mimant les immunoglobulines de l'hôte) chez les bactéries gram positive, les coagulases (Falkow,) et la variation antigénique comme c'est le cas pour *Neisseria* (Mehr and Seifert, 1998).

1.2d La multiplication, pathologie et transmission.

Une fois sa niche trouvée, le pathogène pourra alors s'y multiplier suffisamment pour assurer sa pérennité tout en induisant la pathologie. Ce faisant, il devra encore et toujours faire face au système de défense de l'organisme infecté. De même, durant son installation, le pathogène va encore exprimer différentiellement un ensemble de gènes de virulence, en réponse aux différents stimuli rencontrés comme les variations d'accessibilité d'oxygène, de fer et d'autres nutriments essentiels, les variations de pH, les variations de sites anatomiques, les variations de température les conditions aérobies ou anaérobies, etc... (Smith, 1998). La vitesse ou le

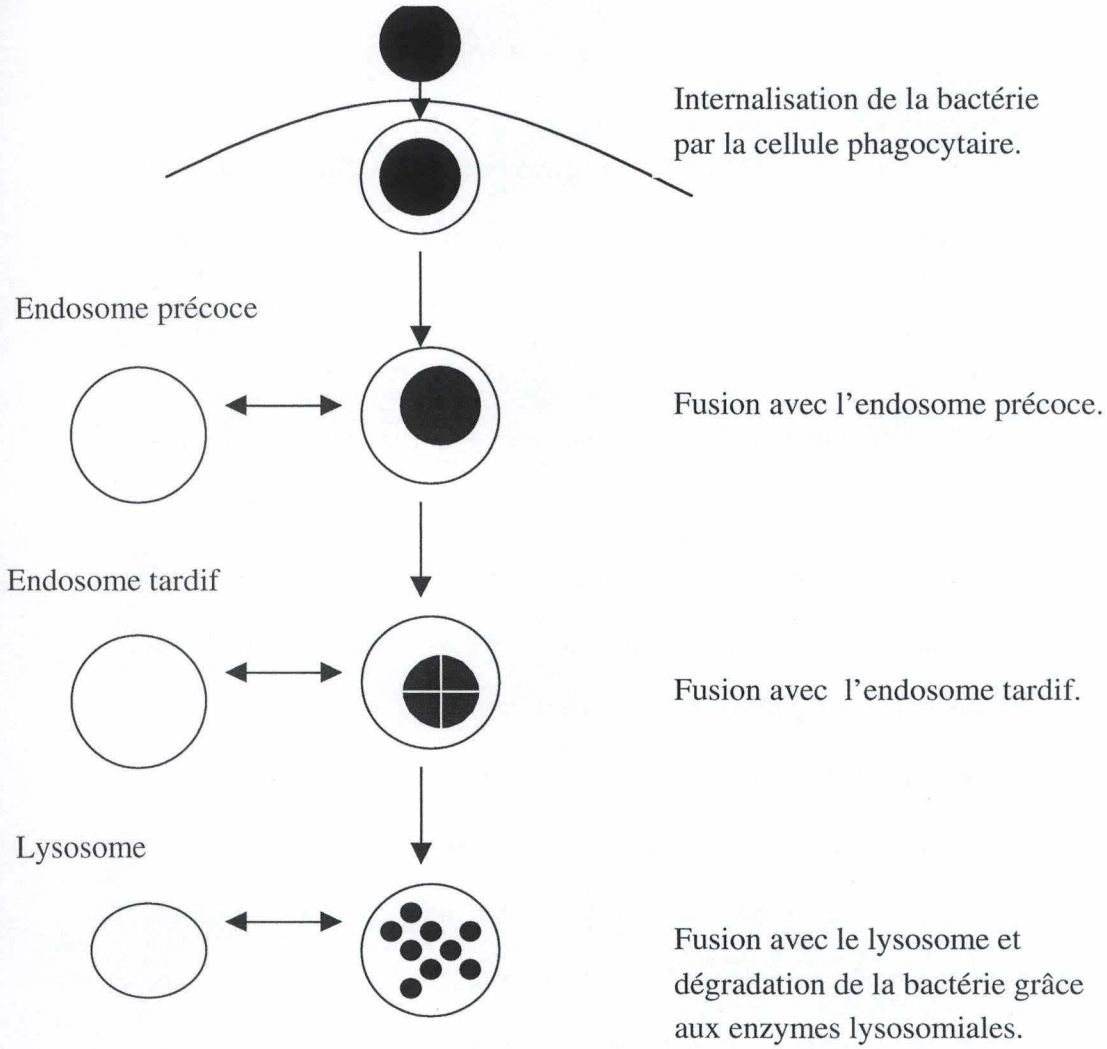


Fig 3 : Schéma classique de la phagocytose en cellules phagocytaires professionnelles et non professionnelles. Après internalisation de la bactérie par la cellule phagocytaire, le phagosome contenant la bactérie va fusionner séquentiellement avec un endosome précoce, un endosome tardif et enfin avec un lysosome contenant des enzymes lysosomiales permettant la destruction de la bactérie (d'après R-M Delrue).

taux de cette multiplication pourra elle aussi varier en fonction de différentes circonstances (Smith, 1998) (table 2). Souvent, on dira que la phase de multiplication constitue la période d'incubation de la pathologie ensuite observée. La transmission du pathogène à un autre organisme se fera lorsque celui-ci pourra de nouveau accéder aux portes de sorties de l'organisme tel que le tractus gastro-intestinal, le tractus génital, les glandes sécrétrices de l'épiderme, ...

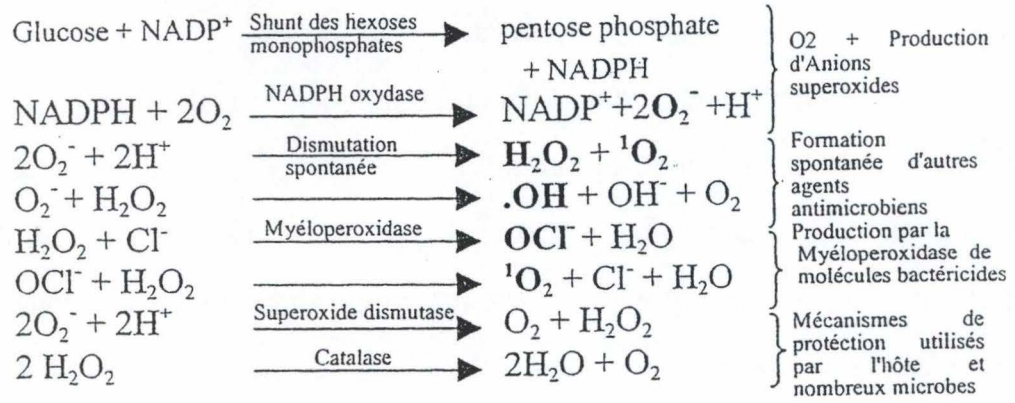
En conclusion, la virulence est un processus multifactoriel, très diversifié et seulement pleinement exprimé *in vivo* (Smith, 1998), impliquant entre autres l'adhésion et l'entrée du pathogène dans son hôte, sa multiplication, l'évitement des systèmes de défense et son éventuelle transmission à d'autres hôtes, le tout via l'expression et la sécrétion d'une énorme quantité de facteurs de virulence (Cornelis, 1998). Tout ceux-ci vont alors s'intégrer dans différents pattern et la somme de la contribution de tous ces facteurs additionnés aux facteurs de l'hôte, donnera alors la pathologie s'exprimant à divers degrés (Heithoff *et al.*, 1997b).

1.3 Le schéma classique de la phagocytose en cellules phagocytaires professionnelles.

Au cours du processus d'invasion, les bactéries vont alors devoir faire face à la cellule phagocytaire. Une fois le microorganisme ingéré par le phagocyte, il se trouve enfermé dans un phagosome qui va alors fusionner séquentiellement avec un endosome précoce, un endosome tardif et finalement avec le lysosome contenant des enzymes lysosomiales (fig 3). Cette maturation progressive du phagosome en phagolysosome va permettre d'aboutir à la dégradation du microorganisme via divers mécanismes comme le burst oxidatif médié par la NADPH-oxydase, la libération d'hydrolases acides, la libération de produits de dégradation de l'arginine (NO et NO2) par l'oxyde nitrique synthase et l'acidification de la vacuole (fig 4).

En contrepartie, les pathogènes ont développé divers mécanismes leur permettant d'échapper à cette mise à mort par les cellules phagocytaires.

Mécanismes dépendants de l'oxygène:



Mécanismes indépendants de l'oxygène:

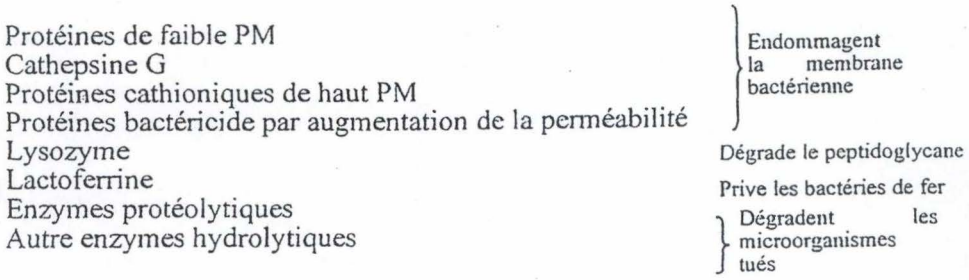


Fig 4: Description des systèmes antimicrobiens dans la vacuole phagocytaire. Les molécules bactéricides sont indiquées en caractères gras. O_2^-: anion superoxyde; $1O_2$: oxygène monoatomique (activé); OH: radical hydroxyle libre (Roitt, 1990).

1) Eviter la phagocytose.

Pour éviter la phagocytose, beaucoup de bactéries dont *H. influenza, N. meningitids, S. pneumoniae* et *E. coli* synthétisent des exo polymères (la capsule polysaccharidique) qui recouvrent leur surface, la capsule est à la base déjà très peu immunogène et donc elle n'induit pas une augmentation d'une réponse à médiation cellulaire ou humorale. La capsule peut empêcher la phagocytose de différentes manières ;

1) Elle peut empêcher l'attachement des anticorps et/ou des composants du complément à la surface bactérienne.
2) Elle peut lier et masquer les anticorps et composés du complément de façon à empêcher leur interaction avec leur récepteur approprié se trouvant sur la cellule phagocytaire.

D'autres bactéries ont trouvé le moyen d'échapper à la phagocytose en produisant des « Fc-binding protein » (protéines se liant au fragment Fc des anticorps), le fragment Fc est en fait la région de l'anticorps qui est reconnue par un récepteur spécifique sur le phagocyte. Les bactéries liant ainsi « à l'envers » les anticorps se retrouvent tapissées d'un manteau d'anticorps et sont donc invisibles pour les phagocytes. Des exemples de ce système sont les protéines A de *S. aureus* et les protéines G de *S. pyogene* (Henderson B., 1999d). Enfin, dans le cas particulier d'hôte ayant déjà vu le pathogène, la variation antigénique qui consiste en un changement régulier par le pathogène de ces antigènes de surface peut également permettre d'échapper aux systèmes de défense (ou tout au moins de retarder les attaques par ce dernier). *Neisseria gonorrhoeae* et *N. meningitidis* par exemple, change constamment leur type de pilus ainsi que leurs protéines de surface (OPA) par variation antigénique (Seifert, 1992).

2)Destruction du phagocyte.

Une solution très simple est de détruire la cellule phagocytaire, soit en induisant sa nécrose, soit en provoquant son apoptose. L'hémolysine HlyA de certaines souches pathogènes de *E. coli* par exemple, va s'ancrer dans la membrane plasmique de la cellule hôte et y former un pore qui conduira a la lyse de la cellule (Finlay and Falkow, 1997). Ces mêmes *E. coli* pathogènes peuvent également sécréter un facteur de type 1 qui déstabilise la protéine Rho

nécessaire à la polymérisation de l'actine de la cellule hôte, l'altération de l'organisation de l'actine mènera à la nécrose de la cellule (Falzano *et al.*, 1993 ; Wilkins and Lyerly, 1996). Les souches pathogènes de Yersinia évitent la phagocytose via la sécrétion de protéines (grâce à leur système de sécrétion de type III) dans le cytoplasme de la cellule phagocytaire dans le but d'induire sa nécrose et/ou son apoptose (Mills *et al.*, 1997 ; Monack *et al.*, 1997).

3) Affronter le phagocyte.

Une fois phagocyté, le pathogène peut encore avoir recourt à trois types de solution. La première étant de sortir de la vacuole d'internalisation pour aller se loger à l'abri dans le cytoplasme de la cellule phagocytaire comme le fait *Listeria*, celle-ci dégrade la vacuole phagocytaire via les sécrétions d'enzymes (hémolysines, listeriolysine O et phospholipase C) et se loge dans le cytoplasme du macrophage où elle trouve alors les nutriments dont elle a besoin (de Chastellier and Berche, 1994; Portnoy and Jones, 1994). La deuxième consiste en l'inhibition par le pathogène de la fusion entre le phagosome qui la contient et la vacuole de lysozyme, c'est le cas de *Brucella* (voir plus loin) et de *Salmonella.* Enfin, la troisième consiste en la résistance aux activités bactéricides grâce à des propriétés structurales, et à la dégradation via la superoxide dismutase (SOD) et la catalase des intermédiaires toxique de l'explosion respiratoire (Henderson B., 1999b).

1.4 Les bases génétiques de la virulence.

On peut maintenant se poser la question suivante, comment se fait-il que dans certains cas, il existe des souches bactériennes qui sont pathogènes alors que leurs homologues dans la même espèce ne le sont pas (*E. coli* commensal >< *E. coli* pathogène) ? D'où leurs provient cette faculté d'être virulentes pour leurs hôtes ? Tout comme les facteurs de résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds et certaines fonctions métaboliques spécialisées, les facteurs de virulences bactériens peuvent être encodés par des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, transposons ou phages. Malgré le faible pourcentage du génome que représente ces éléments, ils interviennent proportionnellement plus dans la virulence que le chromosome.

1.4a Les plasmides de virulence.

En ce qui concerne les plasmides par exemple, on sait que les déterminants pour l'invasion et l'expansion intercellulaire de *Shigella flexneri* (Parsot, 1994) sont encodés sur un grand plasmide de virulence. Un simple transfert horizontal de ce plasmide dans une souche de laboratoire de *E. coli* rend cette dernière invasive alors qu'il ne l'était pas avant transfert (Ochman, 1997 ; Sansonetti *et al.*, 1982). De même, on connaît chez *Salmonella* l'existence d'un plasmide de 70 kDa codant essentiellement pour l'opéron *spv* , ce dernier aurait une fonction importante concernant la croissance de la bactérie dans le foie et la rate de souris (Gulig and Doyle, 1993). La virulence des 3 espèces de Yersinia pathogènes (*Y. pestis, Y. pseudotuberculosis, Y. enterolitica*) requiert également la présence d'un plasmide de 70 kb (Lee and Schneewind, 1999; Portnoy *et al.*, 1981).

1.4b Les bactériophages.

De nombreux bactériophages peuvent jouer un rôle dans le transfert de gènes bactériens. Un bactériophage, littéralement « phage mangeur de bactéries », peut lors de ces cycles infectieux transférer de l'information génétique entre les différentes souches bactériennes qu'il infecte. Par exemple, les gènes codant pour la toxine du choléra (*ctxAB*) chez *V. cholerae* sont

SPIs	Gènes encodés et fonctions
SPI-1	Encode pour un système de sécrétion de type III (Galan and Curtiss, 1989) Certaions effecteurs sécrétés dans le cytosol de la cellule hôte vont conduirent à un réarrangement du cytosquelette des cellules épithéliales de l'intestin en vue de permettre l'internalisation de la bactérie (Francis *et al.*, 1992), tandis que d'autres vont induire l'apoptose des cellules epithéliales (Monack *et al.*, 1996).
SPI-2	Encode pour un autre système de sécrétion de type III qui permet à la bactérie de survivre en macrophage via la sécrétion de facteur qui vont lui permettre d'éviter sa destruction par les intermédiaires réactionnels dérivés de l'oxygène qui sont produits la NADPH oxydase (Shea *et al.*, 1996).
SPI-3	Encode pour des gènes qui semblent indispensables pour la survie dans le macrophage et pour l'invasion des cellules épithéliales (Blum *et al.*, 1994 ; Kaper J.B., 1999).
SPI-4	Fonction encore inconnue(Blum *et al.*, 1994 ; Kaper J.B., 1999).

Table 3 : quelques ilôts de pathogénéicité et leurs fonctions associées chez *Salmonella typhimurium (Tsolis et al., 1999).*

encodés dans le génome du phage filamenteux CTXphi, une infection d'une souche de *Vibrio* non pathogène par ce phage peut la rendre virulente (Boyd and Waldor, 1999).

1.4c Les îlots de pathogénicité.

Des études récentes ont permis de mettre à jour l'existence de grands segments d'ADN particuliers présents dans les génomes de certaines espèces et souches bactériennes. Ces segments baptisés îlot de pathogénicité, présentent chez les bactéries Gram négatives, les caractéristiques suivantes (Kaper J.B., 1999) :

a) Ils contiennent beaucoup de gènes de virulence rassemblés en entité génétiques distinctes et compactes, qui sont généralement encadrées de Direct Repeat (DR) et dont le contenu en G+C est différent du reste du génome bactérien.
b) Ils sont présents dans les souches pathogènes et absents ou ont une distribution sporadique dans les souches non pathogènes de la même espèce ou d'une espèce proche.
c) Ils occupent de grandes régions du génome (d'une grandeur supérieure à 30 Kb).
d) Il y a association avec des gènes de tRNA et/ou des séquences d'insertion.
e) Ils présentent des gènes de mobilité (souvent cryptiques) comme les éléments IS (Insertion Sequence), les intégrases, les transposases et des origines de réplication plasmidique.
f) Ils présentent une grande instabilité.

Par exemple, les souches de *E.Coli* uro et entéropathogéniques possèdent des inserts d'ADN de 35 à 170 Kb qui n'existent pas chez la souche de *E. coli* commensal. Chez *Salmonella*, plusieurs îlots de pathogénicités, baptisés SPIs, ont été décrits (table 3). Dans la plupart des cas, ils encodent pour des systèmes de sécrétion dont le rôle est primordial lors du cycle infectieux de la bactérie (table 4).

Lors d'une interaction hôte-pathogène, une quantité importante de facteurs de virulence vont être produits et sécrétés. Ces protéines extracellulaires ont un rôle primordial pour la virulence

Organism[a]	Description	Functions	Size (kb)	Junction	Associated sequence(s)
E. coli 536 (UPEC)	PAI I_{536}	Hemolysin	70	DR 16 bp	*selC*
E. coli 536 (UPEC)	PAI II_{536}	Hemolysin, P fimbriae	190	DR 18 bp	*leuX*
E. coli 536 (UPEC)	PAI III_{536}	S fimbriae	25		*thrW*
E. coli 536 (UPEC)	PAI IV_{536}	Yersiniabactin synthesis, uptake	45		*asnT*
E. coli J96 (UPEC)	PAI I_{J96}	Hemolysin, P fimbriae	170		*pheV*
E. coli J96 (UPEC)	PAI II_{J96}	Hemolysin, P fimbriae, cytotoxic necrotizing factor 1	110	DR 135 bp	*pheR*
E. coli CFT073 (UPEC)	PAI I_{CFT073}	Hemolysin, P fimbriae	58	DR 9 bp	*metV*
E. coli K1	*kps* PAI	Capsule	ND[b]		*pheV*
E. coli E2348/69 (EPEC)	LEE	Type III secretion, invasion	35		*selC*
E. coli O157:H7 (EHEC)	LEE	Type III secretion, invasion	43		*selC*
E. coli EPEC2	LEE	Type III secretion, invasion	>35		*pheU*
E. coli ETEC	Tia-PAI	Invasion	46		*selC*
Y. enterocolitica	HPI	Yersiniabactin synthesis, transport	43		*asnT*
Y. pseudotuberculosis	HPI	Yersiniabactin synthesis, transport	36	DR 16 bp	*asnTUW*
Y. pestis	HPI (*pgm* locus)	Yersiniabactin synthesis, transport; hemin uptake	102	IS*100*, DR 16 bp	*asnT*
Yersinia spp.	Yop virulon	Type III secretion, effectors (YOPs)	47		Plasmid
S. flexneri 2a	SHI I	Enterotoxin, immunoglobulin A protease	51	IS elements	
S. flexneri	SHI II	Aerobactin synthesis, transport	ND		*selC*
Shigella spp.	Entry region	Type III secretion, invasion	37		Plasmids
S. enterica	SPI-1	Type III secretion, invasion into epithelial cells, apoptosis	40		
S. enterica	SPI-2	Type III secretion, invasion into monocytes	40		*valV*
S. enterica	SPI-3	Invasion, survival in monocytes	17		*selC*
S. enterica	SPI-4	Invasion, survival in monocytes	25		Putative tRNA gene
V. cholerae	VPI	Tcp adhesin, regulator	40	DR 136 bp	*ssrA*
H. pylori	*cag* PAI	Type IV secretion, *cag* antigen	40	DR 31 bp	*glr*
C. difficile	PaLoc	Large clostridal cytotoxins	20		
D. nodosus	*vap* region	Vap antigens	12	DR 19 bp	*serV*
D. nodosus	*vrl* region	Vrl antigens	27		
P. syringae	*hrp* cluster	Type III secretion, effectors	35		
Erwinia spp.	*hrp* cluster	Type III secretion, effectors			
A. tumefaciens	T-DNA	Crown gall tumor induction, opine production	20	DR 25 bp	Plasmid
L. ivanovii	*vis* gene cluster	Internalins, sphinomyelinase	23		
S. aureus	SaPI1	Toxic shock syndrome toxin 1, putative superantigen	15.2	DR 17 bp	

[a] EPEC, enteropathogenic *E. coli*; EHEC, enterohemorrhagic *E. coli*; ETEC, enterotoxigenic *E. coli*.
[b] ND, not determined.

Table 4: Quelques exemples d'ilôts de pathogénicité connus chez diverses espèces bactériennes et leurs fonctions (Kaper , 1997).

du pathogène parce qu'ils interagissent directement avec les facteurs de l'hôte. On sait aujourd'hui que plus ou moins 20 % des protéines synthétisées par une bactérie pathogène ont une destination externe ce qui implique l'existence de divers mécanismes de sécrétion de ces protéines.

1.5 Les systèmes de sécrétion .

Pour la sécrétion des protéines, divers machineries comme le GSP (General Secretory Pathway), les systèmes de sécrétion de types I, II, III, IV et V (Lee, 1997 ; Pugsley, 1993 ; Wandersman, 1996 ; Wilson, 1999) sont déjà connus. Intéressons-nous plus particulièrement aux types III et IV qui sont dans la plupart des cas encodés par des îlots de pathogénicité et qui ont un rôle à jouer dans les processus d'échappement de la phagocytose (table 4).

1.5a Le système de sécrétion de type III.

L'étude de ce système, fort conservé et existant uniquement chez des espèces de bactéries Gram - pathogènes de plantes et animaux (Cornelis, 1998), a permis de mettre en évidence que son acquisition se fait le plus souvent par transfert horizontal de gènes (Galan and Collmer, 1999). Il a été en effet constaté que les éléments qui le constituent sont souvent encodés dans des éléments extra chromosomiques comme les plasmides, ou dans des îlots de pathogénicité. Ce système a pour but de délivrer directement des protéines effectrices du cytoplasme bactérien jusqu'à l'intérieur du cytosol de la cellule hôte où ces protéines pourront exercer leurs effets sur les processus cellulaires de l'hôte (Galan and Collmer, 1999). Par exemple, chez *Yersinia* qui présente une localisation extracellulaire (Simonet *et al.*, 1990), le système de type III ainsi que l'opéron Yop (Yersinia outer membrane protein) sont dans ce cas-ci encodés sur un plasmide de 70 Kb. Les effecteurs Yops agissent au sein de la cellule eucaryote (Boland *et al.*, 1996; Rosqvist *et al.*, 1991 ; Rosqvist *et al.*, 1995), ce qui nécessite leur sécrétion par le système de type III (Ruckdeschel *et al.*, 1997), ces protéines vont

Protein	Size (kDa)	Activity and features	Relevant similarities
YopE	22.9	Inhibition of phagocytosis; disruption of the cytoskeleton	ExoS (*P. aeruginosa*),[a] SptP/StpA (*Salmonella*)[b]
YopH	51.0	Inhibition of phagocytosis; protein tyrosine phosphatase	Eukaryotic phosphatases SptP/StpA (*Salmonella*)[b]
YopM	41.6	Unknown; Leu-rich repeats	y4fR (*Rhizobium*),[c] IpaH (*Shigella*),[d] numerous proteoglycans, GPIb-α
YpkA/YopO	81.7	Ser/Thr kinase	Eukaryotic Ser/Thr kinase, COT oncogene[e]
YopP/YopJ	29.9	Apoptosis induction; inhibition of TNF-α release	AvRxv (*X. campestris*),[f] AvrA (*Salmonella*)[f]
YopT	35.5	Disruption of cytoskeleton	p76 (*H. somnus*)[g] (partial)

Table 5: Les effecteurs Yops chez *Yersinia* et leurs fonctions (Kaper, 1997).

permettre à la bactérie de résister aux défenses immunes non spécifiques tout d'abord en détruisant les capacités signalétiques et phagocytaires des macrophages pour finalement induire leurs apoptose (Table5) (Cornelis, 1998; Ruckdeschel *et al.*, 1997).

Le système de sécrétion de type III possède 3 caractéristiques principales :

1)Les protéines sécrétées ne possèdent pas de séquence signal. Il faut toute fois rester prudent sur ce point, en effet, certaines recherches poussent à croire que les protéines sécrétées pourraient être reconnues par une courte séquence présente à leur extrémité N-terminal (Michiels *et al.*, 1990).

2)La sécrétion des protéines effectrices nécessite une protéine chaperone. Chaque protéine effectrice ayant sa chaperone particulière (Galan and Collmer, 1999).

3)Nécessité d'une large zone de contact avec la cellule hôte pour activer pleinement le système (Galan and Collmer, 1999).

Et il nécessite l'action coordonnée de 2 entités :

1)La machinerie de sécrétion ancrée dans les enveloppes bactériennes, permettant de transloquer les protéines au travers de celles-ci (Hueck, 1998).

2)Un appareil d'injection qui va en quelque sorte se planter dans la cellule hôte afin d'y déverser directement les protéines effectrices (Russel, 1994).

En microscopie, ce système de sécrétion ressemble fort à une seringue (fig. 6). Cet appendice qui est en fait le système de sécrétion de type III de *Salmonella* (encodé sur SPI-1) va permettre de transférer directement des facteurs de virulence à l'intérieur du cytoplasme de la cellule hôte (Falkow, 1999 ; Heithoff *et al.*, 1997b).

1.5bLe système de sécrétion de type IV .

Le système de type IV de sécrétion permet l'exportation de composants multimoléculaires à travers la membrane bactérienne jusqu'à l'espace extracellulaire ou à l'intérieur d'autres cellules (Winans *et al.*, 1996). Chez *Helicobacter pylori,* un îlot de pathogénicité appelé cag comporte parmis ses 31 gènes 6 gènes présentant de fortes homologies avec des gènes

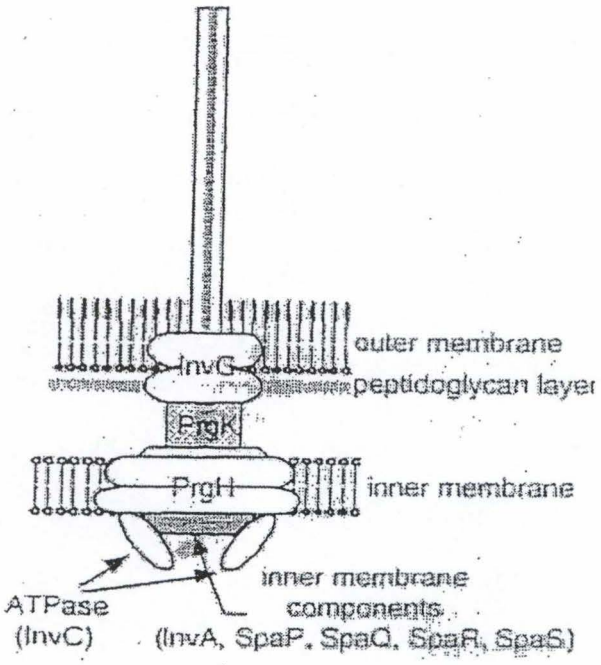


Fig 6: Représentation schématique du système de sécrétion de type III chez *S. typhimurium*, et de la localisation supposée de ses différents éléments dans les enveloppes (Covacci *et al.*, 1999)

assemblés en opéron chez *Bordetella pertussis, Agrobactérium tumefaciens, E. coli, Legionella pneumophila, Rickettsia prowazekii et Brucella suis.* Chez ces espèces, cet opéron code pour un système de sécrétion de type IV (Covacci and Rappuoli, 1998; Winans *et al.*, 1996).

Chez *E. coli*, l'opéron *Vir* encode les composants du pilus conjugatif ainsi que les protéines nécessaires pour un transfert d'ADN bactérien jusqu'à une autre bactérie. Le type IV de *B. pertussis* permet la sécrétion de toxines dans le milieu extracellulaire (Covacci *et al.*, 1999). Chez *A. tumefaciens*, ce système permet le transfert du plasmide Ti de la bactérie jusqu'au noyau de la cellule végétale infectée (fig7). Le système de sécrétion de type IV semble résulter de l'association de nombreuses protéines Vir. Par exemple, la protéine VirB2 constituerait une sous-unité structurale du pilus conjugatif, l'association en complexe des protéines VirB4, VirB7, VirB9, VirB10, VirB11 et VirD4 permettraient la formation de la structure centrale minimale pour la biogenèse du type IV (fig 8) (Covacci *et al.*, 1999). Chez *L. pneumophila* et *R. provazekii* qui sont des parasites intra vacuolaires, certaines études mènent à penser que le type IV pourrait servir à l'exportation, dans la membrane vacuolaire ou dans le cytoplasme de la cellule hôte de macromolécules permettant d'adapter l'environnement vacuolaire en fonction des besoins de la bactérie (fig 7) (Anderson, 1998; Shuman, 1998).

Récemment O'Callaghan *at al.*, 1999 ont pu mettre en évidence un type IV chez *B. suis*.Etant donné qu'il existe des similitudes de comportement entre *B. abortus* et *L. pneumophila* en ce qui concerne l'évitement de la fusion du phagosome avec le lysosome, on peut penser que le système de type IV chez *Brucella* aurait une fonction similaire.

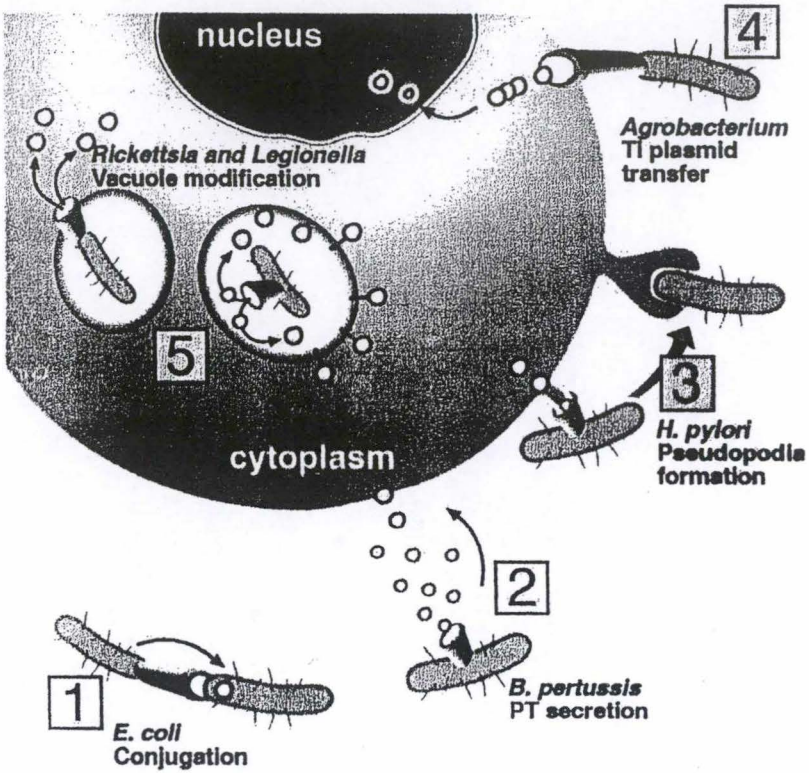


Fig 7:Représentation schématique des fonctions du système de sécrétion de type IV chez diverses espèces. 1: chez *E. coli*: transfert conjugatif d'ADN; 2: chez *B. pertussis*: exportation de toxines dans le milieu extracellulaire; 3: chez *H. pyloris*: sécrétion dans la cellules eucaryote de facteurs induisants la formation de pseudopodes; 4: chez *A. tumefaciens*: transfert du plasmide Ti dans le noyau de la cellule eucaryote et 5: chez *Rickettsia, Legionella* et *Brucella*: sécrétion de molécules effectrices dans le cytoplasme ou dans la vacuole de la cellule eucaryote(Covacci *et al.,* 1999)..

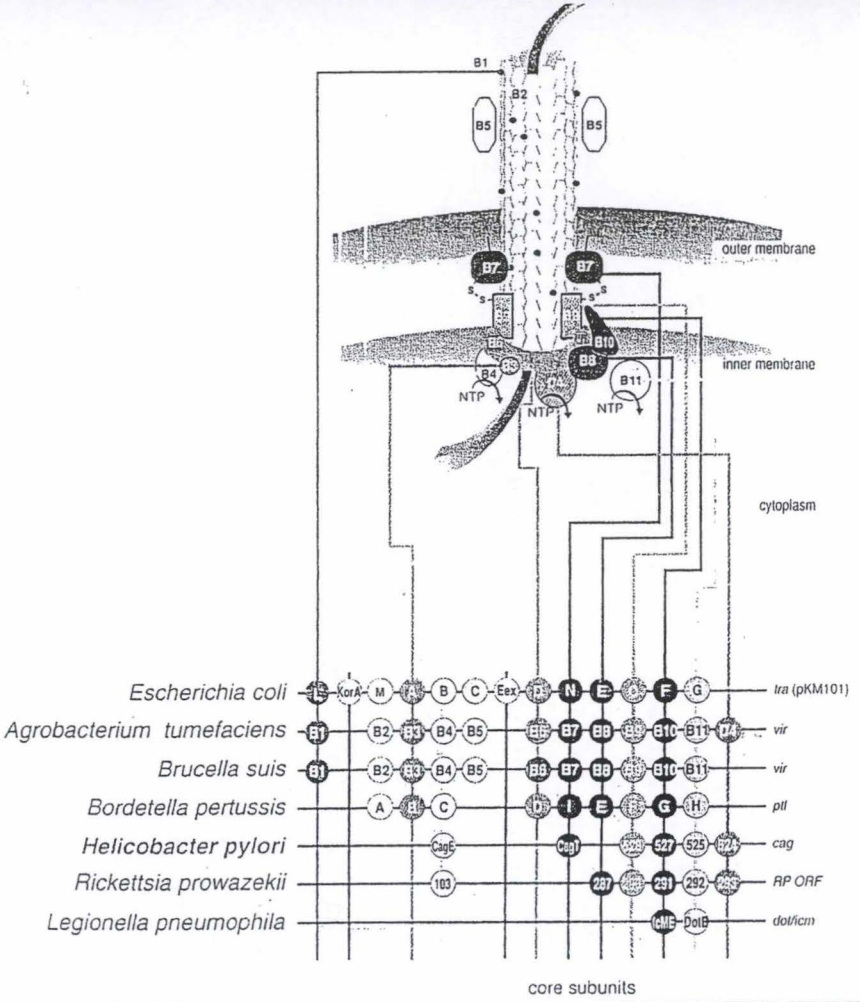


Fig 8: Représentation schématique de la structure supposée du système de sécrétion de type IV et de l'opéron l'encodant chez diverses bactéries. (Covacci *et al.*, 1999).

1.6 Brucella spp.

Ayant passé en revue le cycle infectieux et les mécanismes de virulence chez différentes espèces bactériennes, on peut maintenant se poser la question de savoir ce qui se passe lorsque *Brucella* infecte son hôte.

1.6a Généralités.

Le genre *Brucella*, apparenté à la sous classe α2 des protéobactériacées, est constitué de 6 espèces classiques chacune spécifique de leur hôte, *B. melitensis* (chez les caprins), *B. abortus* (chez les bovins), *B. suis* (chez les porcins), *B. neotomae* (ches les petits rongeurs), *B. canis* (chez les canidés). Récemment diverses nouvelles espèces ont été identifiées chez des mammifères sauvages.

Brucella est une bactérie Gram négative, aérobie, non fermentante et parasite intracellulaire facultative. L'absence d'observation d'un flagelle chez les différentes souches de *Brucella* suggère que celle-ci serait non mobile, il faut toute fois rester prudent sur ce point étant donné que des études récentes font état de la présence de gènes chez *Brucella* qui auraient des homologies avec les gènes flagellaires de *E. coli* (Halling,, 1998; D. Fretin en cours de thèse). Vu au microscope, *Brucella* se présente sous la forme d'un coccobacille de 0.6 à 1.5 µm de long et de 0.5 à 0.7 µm de diamètre qui s'associe parfois en de courtes chaînes ou par paires (Corbel *et al.*, 1984). Son génome est constitué de 2 chromosomes circulaires de 1.5 et 2.1 Mb, la présence naturelle d'un éventuel plasmide n'a pu être détectée (Jumas-Bilak *et al.*, 1998; Michaux *et al.*, 1993).

1.6b Epidémiologie

Brucella est un important pathogène primaire infectant principalement les mammifères domestiques comme les ovins, les caprins, les porcins et les bovins, causant ainsi de graves pertes économiques aux éleveurs (Trujillo *et al.*, 1994). La maladie qu'elle provoque, appelée

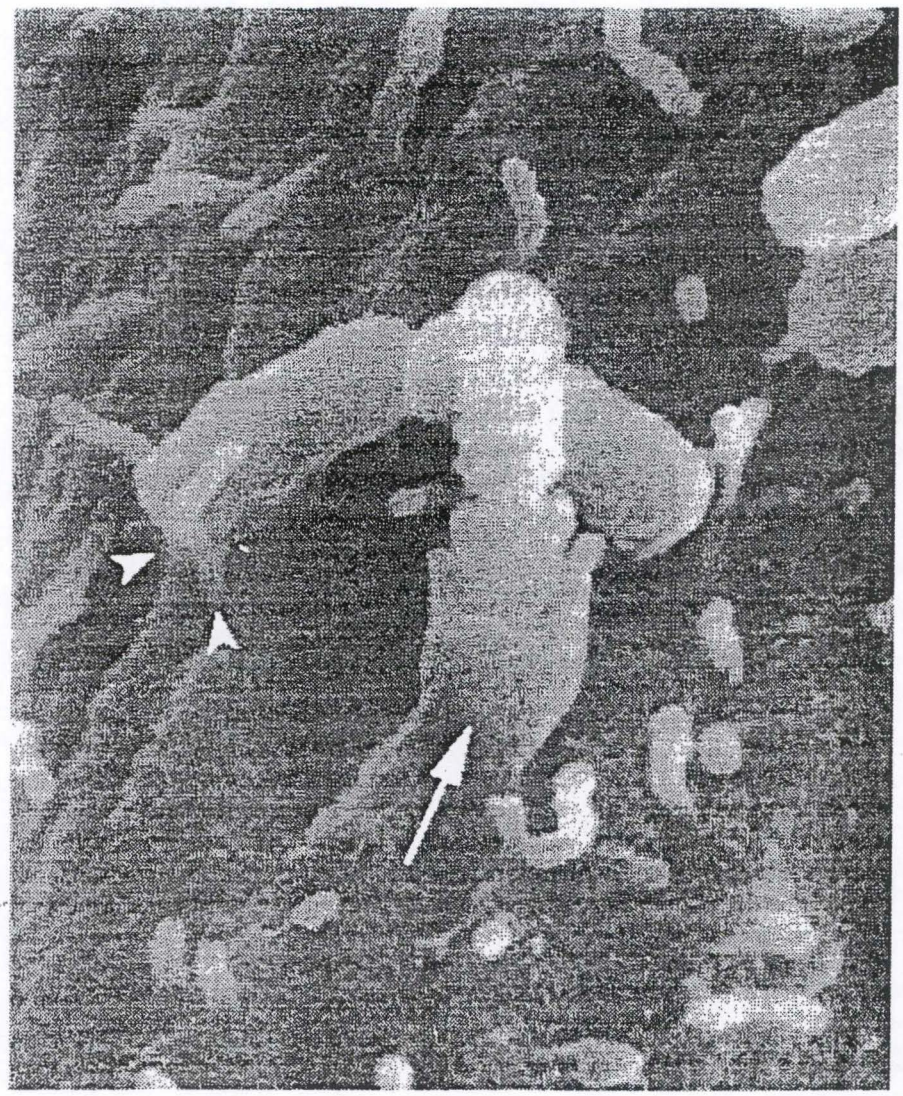


Fig 8: Photo en microscopie électronique à balayage de B. abortus envahissant une cellule phagocytaire non professionnelle. La bactérie s'associe aux microvillosités et pénètre dans la cellule hôte par un mécanisme d'induction de la phagocytose (Zipper-phagocytosis), sans induire de réarrangements important du cytosquelette de la cellule hôte.(ref Pizarro cerda 1999)

brucellose, touche les animaux ainsi que les individus entrant en contact avec un organisme infecté ou un produit dérivé contaminé.

La brucellose animale se caractérise le plus souvent chez les femelles gestantes par des avortements spontanés (Bell, 1988). Chez les mâles, la brucellose est caractérisée par la stérilité ou la production de sperme bacillifère, des orchites et des épididymites.

La brucellose humaine, quant à elle se caractérise par l'apparition de fièvres ondulantes et chroniques encore appelées fièvre de Malte. D'autres symptômes atypiques ont également été observés comme des troubles nerveux, des arthrites, des endocardites et des problèmes ostéo-articulaire (Young, 1995).

1.6c Cycle infectieux de *Brucella*.

Brucella pénètre dans son hôte via les conjonctives, le tractus digestif et les lésions cutanées (Pizarro-Cerda J., 1999). Les mécanismes par lesquels *Brucella* adhère et pénètre dans son hôte ne sont pas connus, bien que l'on suppose qu'elle soit activement internalisée dans les cellules eucaryotes via un mécanisme dépendant de l'actine et médié grâce à l'interaction avec un récepteur (Pizarro-Cerda, 1999) (fig 8). Toutefois, on sait avec certitude qu'une fois à l'intérieur de l'organisme, les *Brucella* vont être phagocytées par les cellules phagocytaires professionnelles comme les monocytes et les leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) ainsi que par les macrophages tissulaires dérivants de la différenciation des monocytes (Jones and Winter, 1992), de même que par les cellules phagocytaires non professionnelles présentes dans le trophoblaste (Detilleux *et al.*, 1990)

Le trafic intracellulaire de *Brucella* dans ces deux types de cellules étant relativement semblable (Pizarro-Cerda J., 1999), nous ne détaillerons ici que le trafic en cellules phagocytaires non professionnelles.

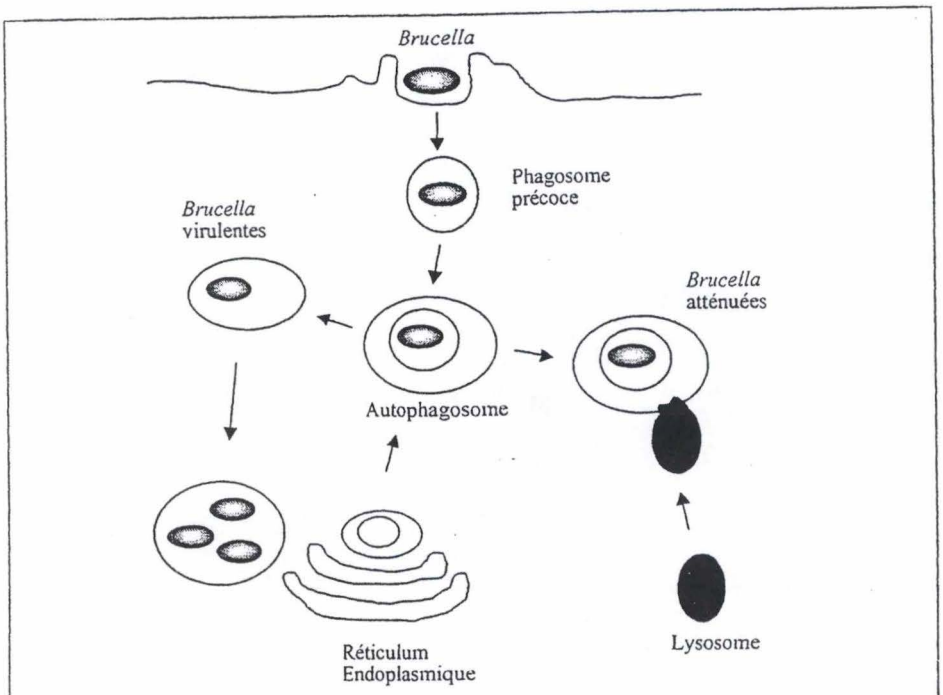


Figure 2. Modèle proposé pour le trafic intracellulaire de B. abortus *dans les cellules HeLa (Pizarro-Cerdá, 1998). Après invasion, les souches virulentes S2308 et avirulentes S19 sont localisées dans un phagosome précoce capable de fusionner avec un autophagosome provenant du réticulum endoplasmique. La souche S19 est incapable d'inhiber la maturation de son phagosome qui fusionne avec des lysosomes et provoque sa dégradation. Par contre, la souche S2308 détourne la voie de maturation de l'autophagosome et utilise le transport rétrograde pour accéder au réticulum endoplasmique, où la réplication a lieu.*

Fig 9: Modèle proposé pour le traffic intracellulaire de *B. abortus* dans la cellule HeLa (Pizarro *et al*, 1998). Après invasion, les souches virulentes et avirulentes de *Brucella* sont localisées dans un phagosome précosse pouvant fusionner avec un autophagosome provenant de réticulum endoplasmique. La souche atténuée est incapable d'inhiber la maturation de son phagosome qui fusionne avec le lysosome. Par contre, la souche virulente détourne la voie de maturation de l'autophagosome et utilise le transport rétrograde pour accéder au réticulum endoplasmique où sa réplication sembla avoir lieu.

Brucella, une fois dans sa vacuole d'internalisation, va interagir avec l'endosome précoce mais va éviter la fusion avec l'endosome tardif (fig 9) (Pizarro-Cerda *et al.*, 1998).

Une étude menée par Pizarro-Cerda *at al.* En 1998 sur la souche de *Brucella abortus* 2308 virulente et la souche vaccinale B19 atténuée nous apprend qu'au début de l'infection, les deux souches, après internalisation dans la cellule, se retrouvent de la même façon dans le phagosome. Quelques temps après, la souche virulente quant à elle se trouve localisée dans une structure indépendante, ce qui suggère que la souche virulente évite la fusion avec l'endosome tardif. Une heure après l'infection, les *Brucella* de la souche virulente sont alors localisées dans une vésicule faite de plusieurs membranes mises les unes autour des autres et ressemblant fort à une vacuole d'autophagosome (fig 10) (Dunn, 1994). Pour rappel, un autophagosome provient d'une invagination membranaire d'origine golgienne, réticulienne, plasmique ou encore lysosomiale et à pour fonction la dégradation de débris cellulaire. La transition des brucelles de l'endosome précoce jusqu'à l'autophagosome suggère une convergence de ces deux voies (bien que les opinions divergent !) (Liou *et al.*, 1997). *Brucella* prendrait donc avantage de cette convergence pour interagir avec la vacuole autophagique à partir de l'endosome précoce. En microscopie, les *Brucella* virulentes sont retrouvées dans un compartiment dont les marqueurs indiquent que l' autophagosome qui contient *Brucella* est en interaction avec le réticulum endoplasmique (Detilleux, *et al.*,1990a; Detilleux, *et al.*,1990b). *Brucella* pourrait ainsi avoir pour site de multiplication le réticulum endoplasmique.

Sachant cela, on peut maintenant se demander quels sont les facteurs de virulence produits par *Brucella* et requis pour sa survie en cellules phagocytaires professionnelles et non professionnelles.

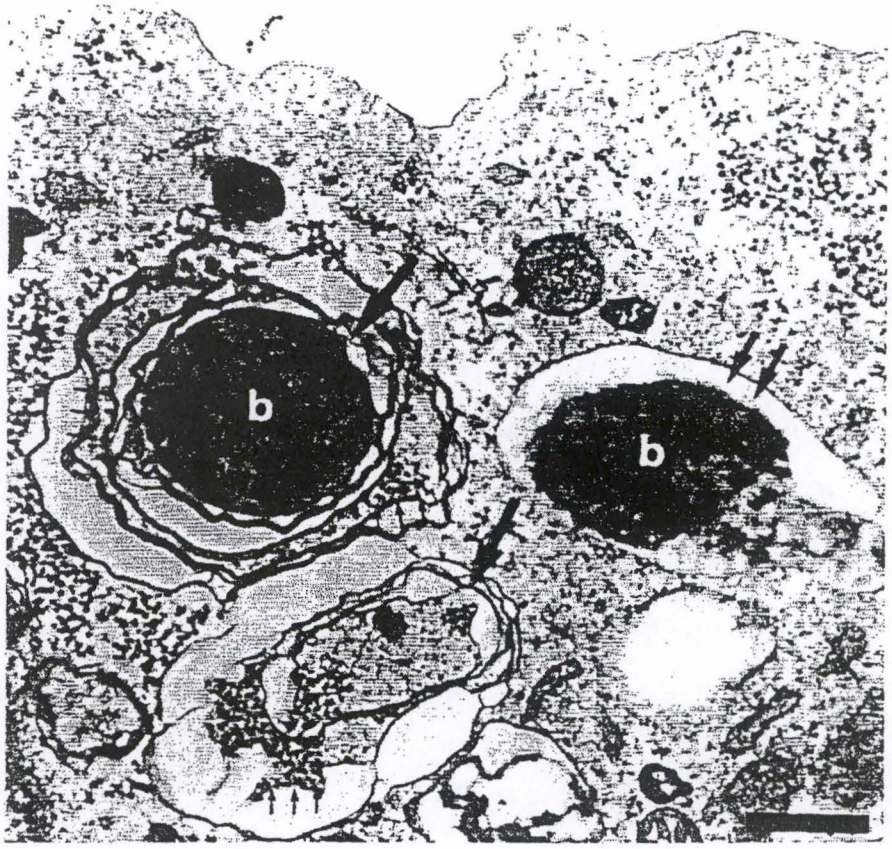


Fig 10: *B. abortus* dans un phagosome, observée en microscopie électronique à transmission. La bactérie (b) est détectée dans deux compartiments différents. Dans un phagosome présentant une seule membrane (double flèche) et dans un compartiment multimembranaire (simple flèche) qui est souvent associé au réticulum endoplasmique.(Pizarro *et al.*,1999)

1.6d Les facteurs de virulence chez *Brucella spp.*

La virulence de *Brucella* est due à sa capacité d'éviter les mécanismes de défense de son hôte ainsi qu'à survivre et proliférer dans les cellules phagocytaires professionnelles et non professionnelles (Sangari et Anguero, 1996; Detilleux, *et al.,* 1990).Contrairement à la plupart des autres bactéries Gram -, *Brucella* ne sécrète pas d'exotoxines connues, ne possède pas de capsule polysaccharidique ni de fimbriae et n'use pas de la variation antigénique (pour revue voir Moreno 1997). Divers facteurs de virulence sont néanmoins déjà connus chez *Brucella*, parmis ceux-ci, on trouve la chaîne O du LPS (Kreutzer *et al.*, 1979) (Schurig *et al.*, 1991), le système à deux composant BvrR-BvrS (Sola-Landa *et al.*, 1998), le système de sécrétion de type IV (O'Callaghan *et al.,* 1999) ainsi que diverses protéines de stress (Rafie-Kolpin *et al.*, 1996).

1.6e1) Le LPS de *Brucella*.

Brucella existe naturellement sous deux phénotypes, les *Brucella* ayant la chaîne O du LPS ont un phénotype smooth (lisse), au contraire celles ne possédant pas cette chaîne O présentent un phénotype rough (rugueux). Kreutzer *at al.* en 1979, furent les premiers a démontrer que la perte de la chaîne O du LPS chez *B. abortus* lorsqu'elle passe d'un phénotype smooth à rough entraîne une perte de la virulence pour les souches rough *in vivo* (Allen *et al.*, 1998 ; Kreutzer *et al.*, 1979 ; Schurig *et al.*, 1991). Une étude menée par Godfroid *at al.*, 1998, suggère que la chaîne O du LPS serait essentielle pour la survie de la bactérie en souris mais pas *in vitro* en macrophage. De plus, contrairement aux autres LPS chez d'autres bactéries Gram -, le LPS de *Brucella* se révèle être un faible activateur des mécanismes bactéricides induits lors de la phagocytose (Rasool *et al.*, 1992). Il faut également noter qu'il existe naturellement des espèces rough de *Brucella* (B. ovis, B. neotomae) et qui sont tout aussi pathogènes que les souches smooth des autres espèces, ce qui force à penser

que la chaîne O du LPS ne serait pas l'unique facteur de virulence chez *Brucella* (Corbel, 1984 ; Rasool *et al.*, 1992).

1.6e2) Le système à deux composants BvrR-BvrS.

Chez *B. abortus* 2308, il a été démontré que ce système joue un rôle critique concernant l'invasion cellulaire et la virulence (Sola-Landa *et al.*, 1998), en conférant à *B. abortus* une résistance aux polycations bactéricides présents dans la vacuole phagocytaire. Comme tout système à deux composants, ce système se compose d'un régulateur (BvrR) et un senseur (BvrS) agissant de pair. Il est très probable que ce système a deux composants soit impliqué dans la régulation de nombreux gènes de virulence. Comme c'est le cas chez *Salmonella* ou le système PhoP-PhoQ active, entre autres, la transcription des gènes *pmrA* et *pmrB* (Gunn and Miller, 1996), ces gènes quant à eux régulent la structure des lipides A de façon à induire la résistance à la polymyxineB, un polycation bactéricide (Guo *et al.*, 1997). Or, chez *Brucella* le noyau et/ou le lipide A du LPS sont également impliqués dans la résistance aux polycations bactéricides (Martinez de Tejada *et al.*, 1995).

1.6e3) Le système de sécrétion de type IV chez *Brucella suis.*

Les mécanismes par lesquels *Brucella* parvient à modifier le trafic intracellulaire ne sont pas connus, mais la découverte récente (suite au screening d'une banque de mutants TnBlaM pour leur incapacité a pousser en cellules HeLa) d'un système de sécrétion de type IV chez *B. suis* (O'Callaghan *et al.*, 1999), ouvre de nouvelles perspectives quant à la connaissance des processus de virulence chez *Brucella*. Le type IV chez *L. pneumophila* est requis pour l'altération de la voie d'endocytose des macrophages infectés (Vogel *et al.*, 1998). R-M Delrue (thèse en cours) a dores et déjà pu démontrer l'implication des protéines VirB dans le trafic intra cellulaire de *Brucella melitensis* et postule que le type IV chez cette dernière serait impliqué dans l'établissement du compartiment RE-like dans lequel *Brucella* se multiplie.

1.6e4) Les protéines de stress comme facteurs de virulence chez *Brucella*.

Les techniques d'électrophorèse à deux dimensions en gel de polyacrylamide ont été employées pour l'étude de la réponse physiologique de *B. abortus* lors de sa croissance en macrophages et sous différentes conditions de stress (conditions oxydatives, bas pH, déprivation nutritionnelle et choc à hautes températures) (Rafie-Kolpin *et al.*, 1996). Les différents types de patterns de synthèse protéique ainsi obtenus ont alors été comparé à l'image obtenue pour la croissance en macrophages, même si des recouvrements existent entre les patterns obtenus aux différentes conditions et celui obtenu pour la croissance en macrophage, ils demeurent cependant très différents. Cette étude suggère que si *B. abortus* parvient à survivre dans le macrophage, c'est entre autre grâce à sa capacité d'adapter sa synthèse protéique en fonction des stress rencontrés. Toutefois, il apparaît clairement que les réponses induites lors de la croissance intracellulaire ne sont pas juste la somme des réponses observées lors des différents stress (Rafie-Kolpin *et al.*, 1996).

D'autres protéines de stress comme HF-1 (Host Factor 1) joue un rôle important pour la survie intracellulaire de *B. abortus*, des expérimentations ont en effet montré que des mutants pour le gène *hfq* présentent une sensibilité marqué à l'H_2O_2 et une moins bonne survie au condition acide du milieu (Robertson and Roop, 1999). Chez *E. coli* les produits du gène *hfq* sont des protéines HF-1 se liant à l'ARN (protéines chaperonnes des ARN) et qui participent à la régulation de la résistance aux stress durant la phase stationnaire (Muffler *et al.*, 1997; Tsui *et al.*, 1994).

La protéine chaperonne DnaK, qui est également une protéine de stress, joue quant à elle un rôle essentielle pour la multiplication de *B. suis* dans des cellules U937 dérivée de phagocytes ou lorsqu'elle est soumise à des condition de bas pH et de haute température (44 C°) (Kohler, *et al*, 1996).

On a longtemps cru que les protéines RecA (protéase impliquée dans la réparation de l'ADN) et HtrA (High-temperature-requirement A protein induite lors de changements de température) avaient un rôle crucial dans la virulence. Des études sur des mutants n'exprimant

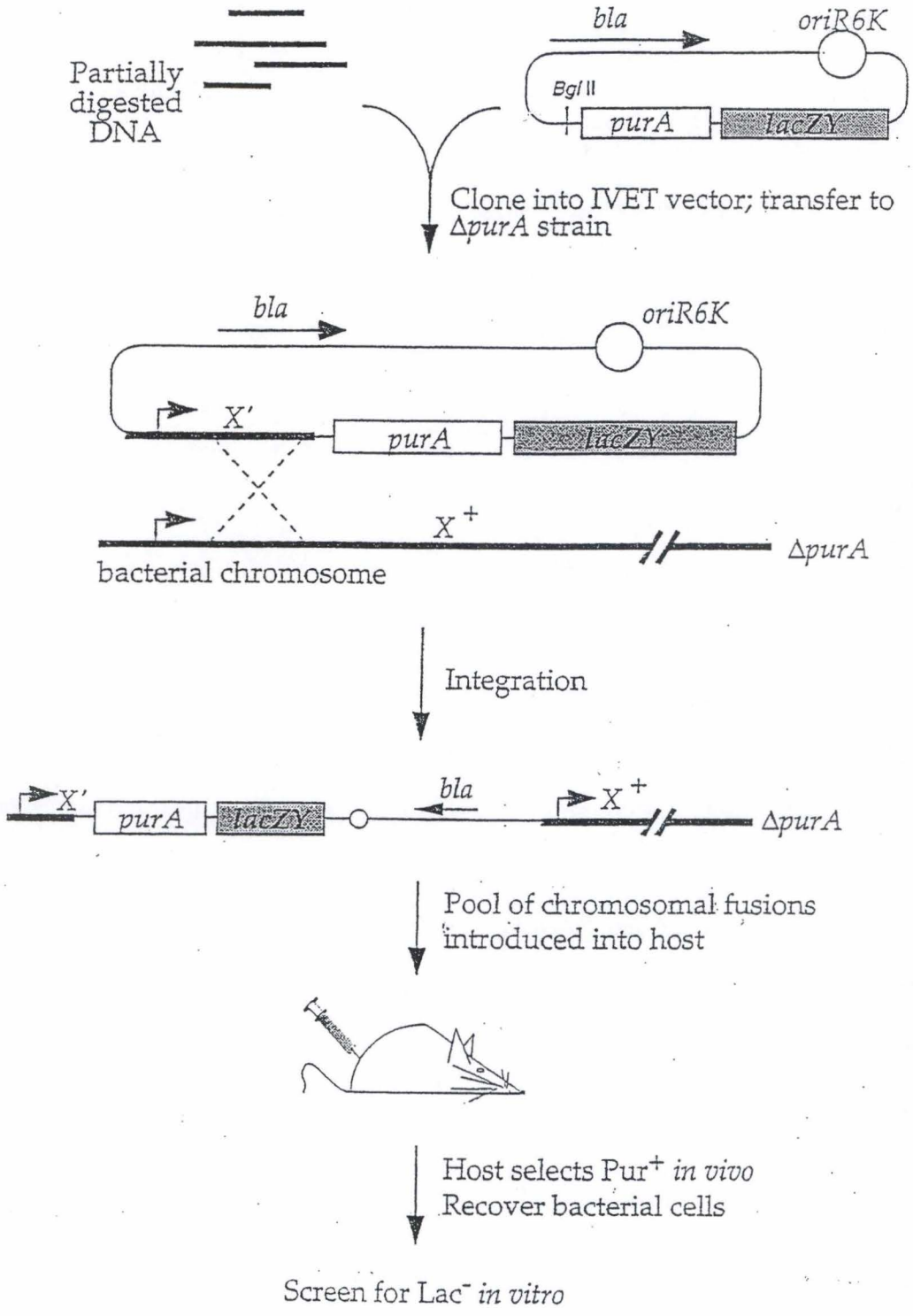


Fig 11: In Vivo Expression Technology (IVET)(Mahan *et al.*, 1993). Utilisation du plasmide vecteur IVET portant l'opéron rapporteur *purA- lacZ* dans la souche de *S. typhimurium purA*⁻ avirulente, afin de détecter l'expression de gènes de virulence spécifiquement induits *in vivo*.

pas ces protéines et montrant une diminution de la multiplication bactérienne durant les premiers jours post infection démontrent cependant que ces mutants sont quand même capables d'établir l'infection chronique et sont donc virulents (1997; Phillips *et al.*, 1995 ; Tatum *et al.*, 1993). De même, des mutants pour la catalase et l'uréase, qui normalement détoxifient les substances toxiques produit lors de la phagocytose, restent virulents (Sola-Landa, *et al.*,1998).

Même si les études *in vitro* ont permis de découvrir certains facteurs de virulence chez *Brucella* (Rafie-Kolpin *et al.*, 1996 ; Sola-Landa *et al.*, 1998)., les mécanismes moléculaires supportant sa pathogénie restent mal connus.

Quels sont les facteurs nécessaires à *Brucella* pour survivre et effectuer son cycle lorsqu'elle est confrontée à l'entièreté de son hôte ? Cette question, primordiale pour la compréhension de la pathologie induite par *Brucella*, ne pourra être élucidée que via l'utilisation de techniques permettant l'étude de la bactérie *in vivo*.

1.7 Techniques moléculaires d'étude de l'expression des gènes de virulence induit *in vivo* par un pathogène durant son cycle infectieux.

Dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels un pathogène est capable d'envahir et de se répliquer à l'intérieur de son hôte, il est nécessaire d'identifier les gènes qui sont requis pour ces étapes. Deux techniques d'étude de la virulence *in vivo* sont expliquées dans les lignes qui suivent.

1.7a In Vivo Expression Technology (IVET).

Cette technique, mise au point par Mahan en 1993, va permettre l'étude des gènes préférentiellement induits lors d'une infection *in vivo* par un pathogène (Chiang *et al.*, 1999; Mahan *et al.*, 1993).

Premier essai en IVET : une sélection positive (fig 11)

La première étude en IVET fut menée sur un mutant auxotrophe avirulent *purA*- de *Salmonella typhimurium*. Ce mutant est incapable d'infecter son hôte étant donné qu'il a perdu le gène *purA* (adenylosuccinate synthetase) indispensable à la voie de biosynthèse des purines, il peut néanmoins pousser sur milieu de laboratoire si la purine est ajoutée à ce milieu. La méthode va consister à réaliser un transfert conjugatif entre la souche de *Salmonella* avirulente et un plasmide provenant d'un *E.coli* donneur. Le plasmide, suicide chez *Salmonella* et possédant un gène de résistance à l'ampicilline, comporte en plus un fragment du génome de *S.typhimurium* inséré en amont des gènes rapporteurs *purA* et *lacZ* (β-galactosidase). Si un évènement de recombinaison simple a lieu entre ce plasmide et le chromosome de *Salmonella*, le fragment d'ADN d'intérêt (en amont des gènes *purA* et *lacZ*) sera dupliqué laissant ainsi une copie intacte du gène en aval du promoteur potentiellement activé *in vivo*. Les bactéries intégrantes sont ensuite sélectionnées sur milieu avec ampicilline et ensuite injectées dans un modèle animal. Durant l'infection, seules les bactéries dont le gène rapporteur *purA* est induit vont pouvoir survivre, ce qui signifie que le plasmide se sera intégré en aval d'un promoteur activé *in vivo*. Après incubation, les organes infectées sont récupérées afin d'en extraire les bactéries, celles-ci sont alors étalées sur du milieu additionné d'X-Gal qui est le substrat de la β-galactosidase. Une sélection des colonies LacZ- est alors réalisée, les colonies blanches étant celles dont le gène *purA* est exprimé uniquement *in vivo*. Une fois ces clones sélectionnés, il sera possible de récupérer une partie du gène d'intérêt en vue de le cloner pour ensuite le séquencer (Mahan *et al.*, 1993 ; Moors *et al.*, 1995)

Les premières IVET requiéraient la possibilité d'avoir des mutants auxotrophes atténués, ce qui réduit déjà considérablement le champ des études possibles. Une variante se basant sur une sélection aux antibiotiques a alors été mise au point. Ici les gènes rapporteurs sont *lacZ* et le gène *cat* (chloramphénicol acétyl transférase) qui induit la résistance au chloramphénicol. L'infection est réalisée comme précédemment avec en plus l'administration d'une dose de chloramphénicol à l'animal afin de pouvoir sélectionner les intégrants exprimant le gène *cat in vivo* (Mahan *et al.*, 1995).

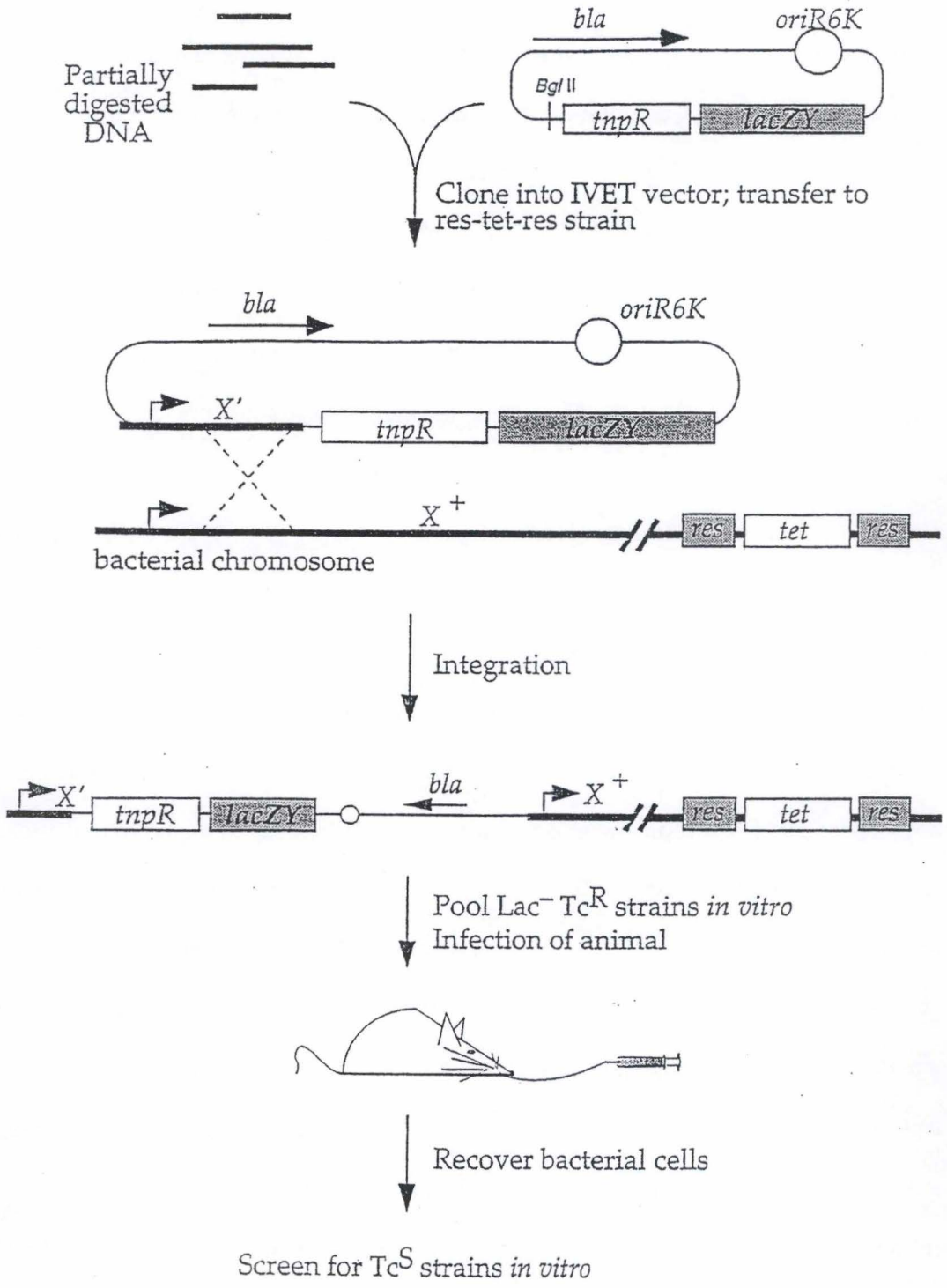


Fig 12: Principe de la technique RIVET utilisant le gène de la résolvase comme rapporteur. La perte du marqueur de résistance à la tétracycline indiquera une activation transcriptionelle en aval de *res in vivo* (Camilli *et al.*, 1994).

Les deux premières méthodes IVET se sont révélées être fort intéressantes pour l'étude des promoteurs qui sont intensément activés durant l'infection, cependant, elles ne permettent pas l'étude des promoteurs activés transitoirements c'est-à-dire induit uniquement lors d'une étape bien précise de l'infection. C'est donc dans le but de résoudre ce problème que Camilli *at al.* en 1994 mirent au point la technique RIVET (Resolvase in Vivo Expression Technology) (fig 12), la résolvase possède la particularité de médier l'excision site spécifique de n'importe quel fragment d'ADN pourvu qu'il soit flanqué de deux site *res* . Donc, dans ce cas le gène rapporteur utilisé est le gène *tnpR* qui code pour la résolvase. Si la protéine est exprimée *in vivo* ne fusse que transitoirement, elle va médier l'excision du gène de résistance à la tétracycline qui est encadré des deux sites *res* (Camilli,*et al.,* 1994). La perte de ce marqueur permettra donc de sélectionner les bactéries dont le gène rapporteur aura été spécifiquement induit, même transitoirement, durant l'infection.

Ces techniques ont comme avantage que les conditions *in vivo* permettent d'identifier tous les types de facteurs de virulence potentiellement exprimés. La recombinaison simple homologue présente également l'avantage de laisser une copie intacte du gène. Et enfin, le screen d'un pool de bactéries évite de devoir tester chaque clone individuellement. Par contre ces méthodes ont l'inconvénient de ne pas tenir compte des gènes exprimés constitutivement, alors que ces derniers pourraient jouer un rôle *in vivo*. De même, il faut savoir qu'un gène préférentiellement induit *in vivo*, ne constitue pas pour autant un facteur de virulence étant donné que tous les gènes exprimés *in vivo* ne sont pas forcément ceux nécessaire à cette croissance et à la survie de la bactérie dans un contexte d'infection (Chiang *et al.*, 1999). Enfin, il faut également savoir qu'il existe des régulations post-transcriptionnelles des ARNm ainsi que des régulations post-traductionnelles des protéines pouvant de ce fait modifier leur activité et dont la méthode ne tient pas compte.

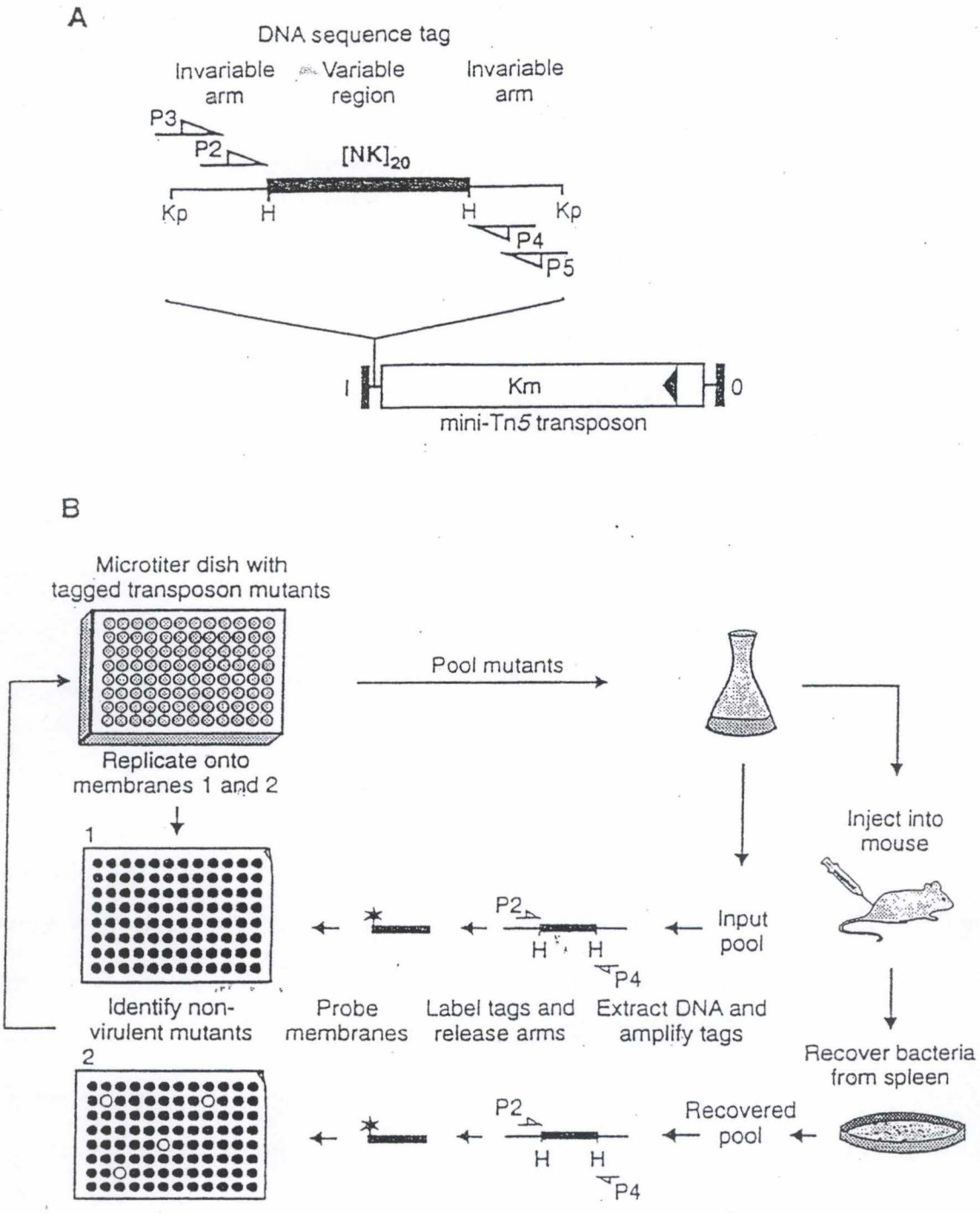


Fig 13: Représentation schématique de la méthode STM permettant l'identification *in vivo* de gènes de virulence par une sélection négative(Hensel *et al.*, 1995). En A, la représentation du transposon utilisé pour effectuer la mutagenèse aléatoire. Ce transposon possède une séquence tag unique facilement amplifiable et marquable via l'emploi des amorces P2 et P4. En B, les différentes étapes du crible effectué selon la méthode STM. La banque de mutants transpositionnels va d'une par être poolée pour réaliser les infections *in vivo* et d'autre par les tags des mutants vont être amplifiées et marquées pour être hybridés sur une membrane représentant la banque de départ (input). Après un temps d'incubation défini, les mutants vont être extraits des rates des souris afin d'amplifier et marquer les séquences tag qui pourront ensuite être hybridées sur la membrane (output). La comparaison des output et input pools vont alors permettre la sélection des mutants n'étant plus représentés dans l'output.

Heithoff et ses collaborateurs utilisèrent cette méthode pour réaliser une étude chez *Salmonella*, durant laquelle plus de 100 gènes *ivi* (*in vivo* induced genes) étaient spécifiquement induits pendant des infections en modèle murin et en macrophages. Ce qui permis l'identification par homologie de gènes correspondant à des adhésines et invasines de pathogènes procaryotes et eucaryotes, ces gènes étant groupés sur un des îlots de pathogénéicité de *Salmonella* (Heithoff *et al.*, 1997a).

1.7b Signature Tagged Mutagenesis (STM) (fig 13).

L'emploi de techniques tel que la mutagenèse transpositionelle a déjà permis le screening de milliers de mutants présentant des phénotypes particuliers dûs à la perte de fonction (de Lorenzo, 1990). Même si cette technique s'est révélé être très intéressante pour des études *in vitro*, elle est cependant inadapté pour des études *in vivo*. En effet cela supposerait de pouvoir tester chaque mutant individuellement, ce qui n'est pas possible quand au départ, on dispose par exemple, d'une banque de 3000 mutants.

La signature tagged mutagenesis, une nouvelle méthode décrite par Hensel *at al.* en 1995, combine la puissance de la mutagenèse insertionnelle et la capacité de tester un grand nombre de mutants *in vivo*, dans un nombre restreint d'animaux modèles. Elle permet également une identification facile et rapide de mutants avirulents parmi un pool de cellules mutagénéisées. Une première étape est la réalisation d'une banque de mutants transpositionnels. Pour ce faire la mutagenèse est pratiquée via l'utilisation d'une banque de transposons quelques peu modifiés. En effet, chaque transposon outre la présence d'un gène de résistance à la kanamycine, possède une courte séquence tag (40 bp) constituée d'une région variable au centre flanqué de bras invariants. Diverses précautions ont été prises concernant cette séquence tag :

a) La région centrale (40bp) et variable de la séquence tag a été générée de tel sorte qu'il y a moins de une chance sur 2.10^{17} d'obtenir deux fois la même séquence.

b) Les bras invariants de part et d'autre de la partie variable de la séquence tag sont facilement amplifiable par PCR.

La banque de tagged Mini-Tn*5* ainsi générée va alors pouvoir servir a faire la mutagenèse, les clones mutants, sur base de leur signature propre, pourront ensuite être sélectionnés et ordonnés en plaques 96 puits. Les mutants vont dans un premier temps être poolés de façon à obtenir un mélange représentant de façon équivalante chaque clone mutant, ceci représente l'input pool. De ce pool de cellules, on va alors extraire l'ADN génomique en vue d'amplifier et de marquer par PCR (Polymerase Chain Reaction) chacune des séquences tag pour ensuite les hybrider sur la membrane préalablement strippée avec chacune des tags présentes dans la banque de tagged Mini-Tn*5*. Le même pool de cellules va également servir a infecter un modèle animal approprié. Après un temps d'incubation, l'organe d'intérêt des animaux infectés est récupéré et l'ADN génomique des clones mutants récupérés est extrait, ceci constitue l'output pool. Les mêmes PCR sont alors effectuées en vue d'hybrider les séquences tag sortantes sur la membrane de départ. La révélation et la comparaison des deux membranes (celle représentant l'input pool et celle représentant l'output pool) permettra alors de visualiser les mutants atténués. En effet, les clones incapables de pousser *in vivo* ne seront plus représentés ou nettement moins présents dans l'output par rapport à l'input pool (fig15).

Chez *S. typhimurium*, la méthode a permis l'identification de plusieurs gènes, dont 4 faisant partie de la famille des gènes *inv/spa* encodés sur l'îlot de pathogénéicité I de *Salmonella.* D'autre gènes, dont les produits sont impliqués dans la formation d'un second système de sécrétion de type III furent également identifiés dans l'îlot de pathogénicité II de Salmonella (Hensel et al., 1995; Shea, et al.1996).

Chez *Mycobacterium tuberculosis*, la méthode permis d'isoler 3 mutants atténués ne pouvant pas synthétiser ou transporter le complexe PDIM (phthiocerol dimycocerosate) qui consiste en des lipides associés à la membrane, nécessaire à la croissance dans le poumon et n'existant que chez les bactéries pathogène de ce groupe (Cox *et al.*, 1999).

Preliminary characterization of virulence-attenuated mutants[a]

	Organisms				
	Salmonella typhimurium	***Vibrio cholerae***	***Yersinia enterocolitica***	***Staphylococcus aureus***	***Streptococcus pneumoniae***
Mutants and models[b]	43/1152 Mouse, IP	51/1100 Mouse, oral	55/2016 Mouse, IP	287/2768 Mouse, IP, IV, SC Rabbit, IV	126/1250 Mouse, IN
Anti-host (virulence) factors	5 *rfb*, 4 *spv*	5 *rfb*, 4 *tcp*	16 LPS, 8 *lcrV*, 2 *yopP*	ND	*yhd*, *nanA*, *lytA*, *iga*, IgA1-protease-like, CBP-like
Unknown[c]	9	2	2	67	55
Regulators	*ompR/envZ*, 4 SPI2 (2 comp.)	*toxT*, *pta*-like, *ptfA*-like	3 *virF*, *pspC*-like	2 *lacR*, *purR*, AraC family	ND
Transporters	11 T3S	*mgtE*	14 T3S, *irp1*, *pstC*-like	10 peptide, 3 *lsp*, 2 Ala, *putP*, *nikA*	2 Gln, 2 polyamine, 5 hypothetical
DNA replication and repair	ND	ND	*topA*, *dnaJ*-like	*recA*, *recQ*-like, 2 *umuC*-like, *polA*-like, *hexA*-like, *dnaD*-like	*mutX*, *radA*-like *recJ*-like
Cellular metabolism	3 *pur*	4 *pur*, 2 *bioB*, 28 auxotrophs	ND	*pur*, *thrB*-like, 10 *fem*-like, 5 *trp*-like, 3 *lys*-like, 2 *asd*-like, 2 TCA cycle	4 *pur*, *glnA*-like, *phoH*-like, *adh*-like
Cellular repair	*clpP*-like	ND	ND	*clpX*-like, *msrA*-like	*clpP*-like
Miscellaneous			*nlpD*-like, *yifH*-like	2 IS elements	

Table 6: Liste de mutants STM qui ont déja pu être caractérisés chez différentes espèces. Les gènes identifiés sont regroupés en différentes classes (Perry, 1999)

Récemment, STM appliquée *in vitro* a permis le screen d'une banque de 1330 mutants de *B. suis* pour leur capacité de survie et de multiplication intracellulaire dans des monocytes humains. Ce screen a permis d'isoler 18 mutants atténués et le séquençage des gènes disruptés par le Mini-Tn*5* amena à l'identification de gènes déjà connus et impliqués dans l'opéron VirB ainsi que des gènes intervenant pour la biosynthèse du LPS. De plus, des gènes impliqués dans la régulation de l'expression d'autres gènes, impliqués dans des voies de biosynthèses ainsi que des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose, ont également été identifiés (Foulongne *et al.*, 2000).

Une étude menée par P. Lestrate (en cours de thèse) sur 700 mutants de *B. melitensis* 16M a également permis de mettre en évidence l'atténuation de certains mutants *in vivo*.

La technique a permis la détection de beaucoup d'autres gènes impliqués dans la virulence, notament chez *Streptococcus pneumoniae* (Polissi,*et al.*, 1998), *Staphylococcus aureus*(Mei *et al.*, 1997), *Yersinia enterocolitica* (Darwin,et al. 1999),*Vibrio cholerae*(Chiang et Mekalanos, 1998) et *Legionella pneumophila* (Edelstein *et al.*, 1999) (table 6).

Les avantages majeurs de la technique STM sont de pouvoir screener un nombre important de mutants transpositionnels *in vivo,* et ce dans un nombre restreint d'animaux modèles. Les gènes détectés par cette méthode sont ceux strictement nécessaires à la croissance et à la survie de la bactérie *in vivo*. Cependant, le fait de détecter des insertions du Mini-Tn*5* indépendantes dans les mêmes gènes suggère que la mutagenèse ne serait pas totalement aléatoire (Hot-Spot de mutagenèse) (Chiang *et al.*, 1999; Foulongne *et al.*, 2000). Il faut également noter que la méthode risque de ne pas détecter les mutants faiblement atténués, la comparaison de l'input avec l'output n'étant pas toujours aisée (Chiang *et al.*, 1999). Deux mutants différents présent ensemble dans un même compartiment pourraient également se complémenter et ne pas apparaître atténués lors de la détection par STM (Foulongne *et al.*, 2000). Jusqu'à ce jour aucun criblage n'a été réalisé sur plus de 1500 mutants transpositionnels dans les différentes espèces étudiées par STM et donc ces criblages sont loin

d'être à saturation ; les génomes de par leur taille pouvant encore être bien plus explorés (Chiang *et al.*, 1999).

1.7c Le séquençage des génomes.

La connaissance du génome complet d'un pathogène, via l'emploi des techniques existantes, constituerait une approche puissante permettant d'identifier des facteurs de virulence et des structures tel que les îlots de pathogénicité sur base de leur caractéristiques propres. En 1995, le séquençage complet du génome de *H. influenza* fut enfin terminé et depuis, les génomes de 30 autres pathogènes bactériens ont été ou sont en cours de séquençage (« The Institute of Genomic Research », site Web : http://www.tigr.org/tdb/mdb/hidb/hidb.html). Dores et déjà, le séquençage de génome a permis de trouver ou de supposer l'existence d'îlots de pathogénicité chez *M. tuberculosis*, *V. cholerae* et *H. pylori* (Reidl, 1999).

Le séquençage complet du génome de la souche virulente de *N. meningitidis* MC58 (qui use de la variation antigénique) a permis par exemple, de réaliser une étude sur des protéines de surfaces potentiellement intéressantes pour l'élaboration d'un nouveau vaccin (Pizza *et al.*, 2000).

De même, le génome partiellement séquencé de la souche atténuée de *M. bovis* (qui sert de vaccin préventif pour la tuberculose (BCG)), a également permis de réaliser une étude comparative avec le génome de *M. tuberculosis* virulent. Cette étude permettant de mieux cerner les différences existant entre les deux souches, a pour but d'améliorer le diagnostic de la tuberculose et d'envisager de nouvelles approches vaccinales (Behr *et al.*, 1999).

2.But du mémoire.

Brucella est une bactérie Gram négative, parasite intra-cellulaire facultative. La virulence de *Brucella* semble principalement être dûe à sa capacité à survivre et à se multiplier à l'intérieur des cellules phagocytaires professionnelles et non professionnnelles. Les mécanismes de la virulence de *Brucella* sont à ce jour très peu connus. L'objectif de ce mémoire va être d'essayer d'identifier *in vivo* des facteurs intervenant dans la virulence de *Brucella melitensis*. Pour ce faire, ce travail va être divisé en trois étapes.

1) La sélection de mutants avirulents via la méthode de Signature Tagged Mutagenesis

La première étape va être la sélection de mutants avirulents de *B. melitensis* via le crible *in vivo* de 300 mutants transpositionnels par la méthode de « Signature Tagged Mutagenesis » (STM)

2) Caractérisation phénotypique des mutants avirulents sélectionnés par STM.

Afin de confirmer et de quantifier les atténuations observées pour les mutants sélectionnés par la méthode STM, leur virulence sera analysée dans différents modèles ; le modèle souris et dans deux types de modèles cellulaire (macrophages bovins et cellules HeLa). De même, différents tests *in vitro* permettant de caractériser les mutants du point de vue de leur rugosité et de leur résistance aux différents stress seront réalisés.

3) Caractérisation génotypique des mutants avirulents de *B. melitensis* 16M.

Afin de savoir quels sont les gènes qui ont été disruptés par le tagged mini-Tn*5* pour les mutants identifiés, nous allons employer les techniques de PCR arbitraire et d'inverse PCR (IPCR) afin d'amplifier les fragments d'ADN bordant le transposon. Ensuite les fragments amplifiés seront clonés et séquencés. Finalement les recherches d'homologie de séquence

dans les banques de données via les programmes blastx et blastn vont nous permettre d'attribuer une fonction éventuelle aux gènes disruptés chez chaque mutants.

3.Résultats et discussion.

3.1 Identification de mutants atténués par Signature Tagged Mutagenesis (STM) chez *B. melitensis* 16M.

3.1a La méthode STM et ses contraintes.

La méthode STM a pour objectif de cribler *in vivo* une banque de mutants transpositionels afin de détecter des mutants affectés dans leur capacité à produire une infection. Les tagged Mini-Tn*5* utilisés pour la mutagenèse comportent chacun une séquence tag unique, facilement amplifiable et marquable. La méthode va consisté à amplifier et à marquer les tags présentes dans l'input pool pour les hybrider sur une membrane préalablement blottée à l'aide des mêmes séquences tag. Ensuite après infection, les tags présentes dans l'output pool sont également amplifiées, marquées et hybridées sur la membrane. La révélation en radioactivité permettra de comparer les input et output pools afin de détecter des mutants moins virulents *in vivo*.

La méthode originelle décrite par Hensel *et al.* en 1995 présentait plusieurs facteurs pouvant influencer la reproductibilité des résultats (Chiang *et al.*, 1999) :

1) La complexité de l'inoculum c'est-à-dire le nombre de mutants différents pouvant servir à faire l'infection peut jouer sur les résultats obtenus. Il existe deux raisons majeures à cela, la première est que plus la complexité du pool infectant augmente, plus la probabilité que des mutants virulent ne soient pas bien représentés dans l'organe infecté augmente. Ce qui amènera à l'identification de faux positifs et à un manque de reproductibilité. Par exemple des pools de 192 et 96 mutants par animals infectés sont beaucoup trop complexes pour obtenir des résultats reproductibles chez *S. typhimurium* et *V. cholerae* respectivement (Chiang, 1998 ; Hensel, 1998).

La deuxième raison est que lors des analyses d'hybridation, la quantité de tags marquées pour chaque tagged Mini-Tn*5* est inversement proportionnelle à la complexité du pool (Hensel *et al* ., 1995)

2) Les séquences tag ont été générées de sorte qu'il y ait moins de une chance sur 2.10^{17} d'obtenir deux fois la même séquence tag. Cependant, des homologies de séquence peuvent amener à des hybridations croisées des tags sur la membrane, empêchant ainsi de détecter un mutant avirulent (Chiang, 1998 ; Mei *et al.*, 1997).

3)La voie d'infection à appliquer et le choix du modèle animal sont également des facteurs influençant les résultats obtenus. Chez *Salmonella* par exemple, des infections par voie gastrique ne donnent pas de résultats reproductibles (Hensel *et al* ., 1995). Certaines bactéries ont besoin d'un modèle animal adapté à la pathologie qu'elles causent (Coulter *et al.*, 1998), en effet un modèle animal non approprié pourrait permettre à la bactérie de passer une étape de son cycle infectieux et ne pas permettre l'identification des gènes requis pour cette étape (Darwin and Miller, 1999; Shea *et al.*, 1996).

4) Finalement, parce que le nombre de mutants virulents doit être représenté de façon équivalente dans l'output pool, le nombre de bactéries récupérées est aussi important pour l'obtention de résultats reproductibles. Pour cela, deux facteurs sont à déterminer :

a) Le choix de la dose infectante ; par exemple pour une infection par *Y. enterocolitica*, une surdose de bactéries est nécessaire pour récupérer les mutants non atténués. Il y a cependant une limite supérieure à la quantité de mutants pouvant infecter un animal simultanément (Darwin et Miller, 1999).

b) Le temps d'incubation optimal doit également être déterminé étant donné qu'il peut être variable en fonction de l'hôte et de la bactérie utilisée pour faire l'infection.

3.1b La méthode STM appliquée à *Brucella* et état d'avancement.

En vue d'appliquer la méthode à *B. melitensis* 16M, P. Lestrate a quelque peu modifié cette méthode en sélectionnant dans le pool originel de tagged Mini-Tn*5*, 96 tagged Mini-Tn*5* présentant chacune une séquence tag unique et ne cross-hybridant pas. Ces 96 tags ont également été sélectionnées sur base de leur efficience d'amplification et de marquage par PCR. Une banque de 3000 mutants transpositionnels a alors été générée en effectuant 96 conjugaisons indépendantes entre la souche de *E. coli* S17 λpir donneuse (contenant le plasmide portant le tagged Mini-Tn*5*) et la souche de *B. melitensis* 16M Nal^R receveuse. Les mutants ont ensuite été formatés en plaques 96 puits selon le même ordre que sur la membrane où les 96 séquences tag ont été déposées individuellement. (Par exemple, les différents mutants de la conjugaison n°1 ont été placé dans le puit n°1, les mutants de la conjugaison n°2 ont été placé dans le puit n°2, ect...)

L'hôte naturel de *B. melitensis* est la chèvre, cependant il est possible d'induire une infection systémique par *Brucella* chez la souris (Crawford *et al.*, 1996). Lors d'infections réalisées par injection en intra péritonéale (IP) avec 5.10^5 CFU (Colony Forming Unit) de *Brucella*, il a été constaté que le nombre de bactéries dans la rate augmentait jusqu'à une valeur de $1,75.10^7$ après une période d'incubation de 5 jours. Au-delà de ce délais, le nombre de bactérie demeure stable pendant quelques semaines et puis diminue jusqu'à une disparition totale de la bactérie dans le modèle murin (Crawford *et al.*, 1996). En vue d'appliquer la technique STM à des mutants de *B. melitensis*, il a fallu déterminer le temps optimal d'incubation et la complexité du pool infectant pour obtenir des résultats reproductibles. Il a été démontré qu'une période d'incubation de 5 jours ainsi qu'une complexité de 96 mutants étaient optimal pour une infection par des mutants de *Brucella* dans le modèle souris (P. Lestrate en cours de thèse). Les conditions optimales étant définies, 700 mutants de la banque de 3000 mutants transpositionnels ont été criblés par la méthode STM menant à l'identification de 20 mutants atténués (Lestrate *et al.*, 2000).

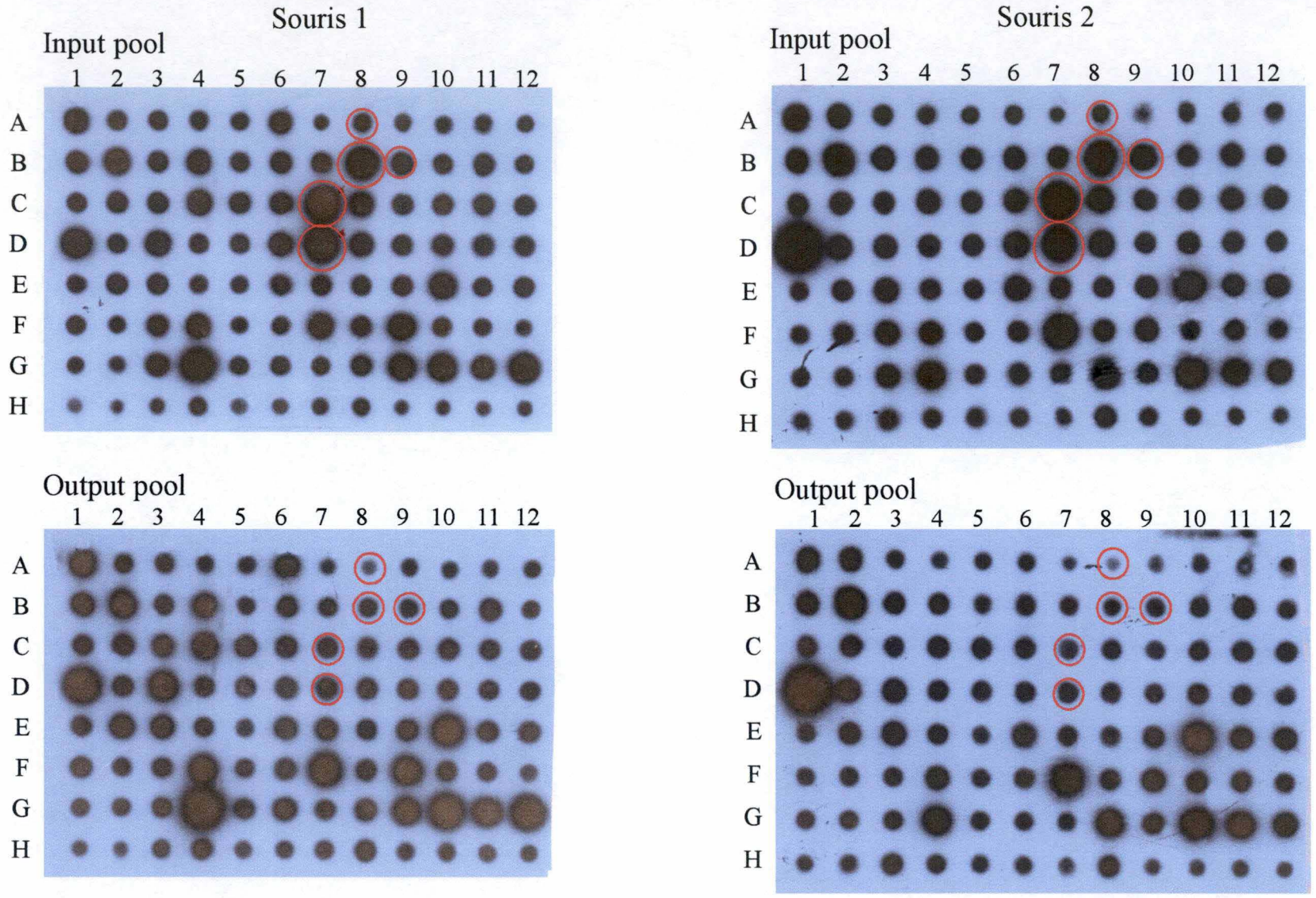


Photo 1 : résultats obtenus par la méthode STM pour le crible *in vivo* du pool 8 comprenant 96 mutants. Le crible a été réalisé dans deux souris BALB/c afin de vérifier la reproductibilité du crible.
Les spots entourés d'un cercle rouge représentent les mutants atténués après passage en souris (output pool) et ont été comparés aux spots obtenus pour ces mêmes mutants avant l'infection des 2 souris (input pool).
Les résultats obtenus sont reproductibles dans les deux souris. Dans ce cas les mutants 8A8, 8B8, 8B9, 8C7, 8D7 (entourés d'un cercle) ont été sélectionnés.

3.1c Identification par STM de mutants de *Brucella* atténués en souris.

Dans le cadre de ce mémoire qui constitue la suite du crible de la banque, 3 fois 96 mutants ont été cultivés en plaque 96 puits pour ensuite être rassemblés en trois pool qui ont servi aux infections des souris BALB/c (2 souris ont été infectées pour chaque pool). Les ADN génomiques des *Brucella* de l'input pool ont été extraits et soumis à deux round de PCR consécutifs afin d'amplifier et de marquer en radioactivité chacune des séquences tag présentes dans ce pool. Les deux rounds de PCR utilisent les primers P2 et P4 qui collent aux bras invariants flanquant la partie variable des séquences Tag. Le premier round (PCR froide) sert spécifiquement à l'amplification des séquences Tag, alors que le deuxième round (PCR chaude) permet de marquer radio activement les Tags. Cinq jours après l'infection, les rates des souris ont été prélevées et les brucelles en ont été extraites. L'ADN génomique des *Brucella* mutantes de l'output pool a été récupéré et soumis à deux rounds de PCR afin d'amplifier et de marquer chacune des séquences Tag comme précédemment. Ensuite, les tags de l'output ont été hybridées sur une membrane sur laquelle les 96 tags avaient préalablement été blottées. Après strippage des sondes de l'output de cette membrane, les séquences tag de l'input pool ont également été hybridées sur la même membrane. Le fait de passer l'output avant l'input pool sur la membrane permet d'éviter les artéfacts dûs à une éventuelle mauvaise préparation de la membrane (une tag manquante, mauvaise déshybridation d'une tag de l'input,...).

La comparaison des output avec les input pools a permis de sélectionner 11 spots atténués de façon reproductible dans l'output des deux souris infectées (photo1).

Les 11 mutants sélectionnés vont ensuite être analysés plus amplement pour leurs caractéristiques phénotypiques et génotypiques.

3.2 Caractérisation phénotypique des 11 mutants.

3.2a Confirmation *in vivo* de l'atténuation.

Afin de quantifier et de confirmer l'atténuation des 11 mutants sélectionnés par la méthode STM, nous allons dans un premier temps valider leur atténuation *in vivo* selon la méthode d'infection compétitive (Darwin and Miller, 1999).

La souche de *B. melitensis* 16M étant la souche parentale virulente à partir de laquelle la banque de mutants transpositionnels a été réalisée, elle peut donc servir de base pour comparer l'atténuation de chaque mutant. La méthode consiste à comparer la croissance *in vivo* du mutant par rapport à la souche parentale. Pour se faire, des souris ont été infectées avec un mélange d'une suspension bactérienne contenant le mutant et la souche 16M virulente dans un ratio 1 : 1. Au terme de l'infection, il sera dès lors possible de calculer un index de compétition (IC) représentant le rapport des CFU mutant/sauvage (output ratio) obtenu après l'infection sur le rapport des CFU mutant/sauvage (input ratio) qu'il y avait dans la dose infectante.

$$IC = \text{Output ratio} / \text{Input ratio}$$

Pour chacun des mutants, 100 µl d'une suspension d'un mélange avec la souche sauvage a été injecté en IP(Intra Péritonéale) à 2 souris à la dose de 5 10^5 bactéries dans un ratio 1 : 1 (2,5. 10^5 CFU de chacun des 11 mutants ont été mélangés avec un nombre égale de la souche parentale). Des dilutions sériées des différentes doses infectantes ont ensuite été étalées sur milieu non sélectif (2YT) ainsi que sur milieu sélectif (2YT+ Kan). Les mutants au contraire de la souche sauvage possèdent sur leur transposon (Tn) le gène de résistance à la kanamycine (Kan), ils peuvent donc pousser sur le milieu sélectif. Le dénombrement des CFU sur chaque

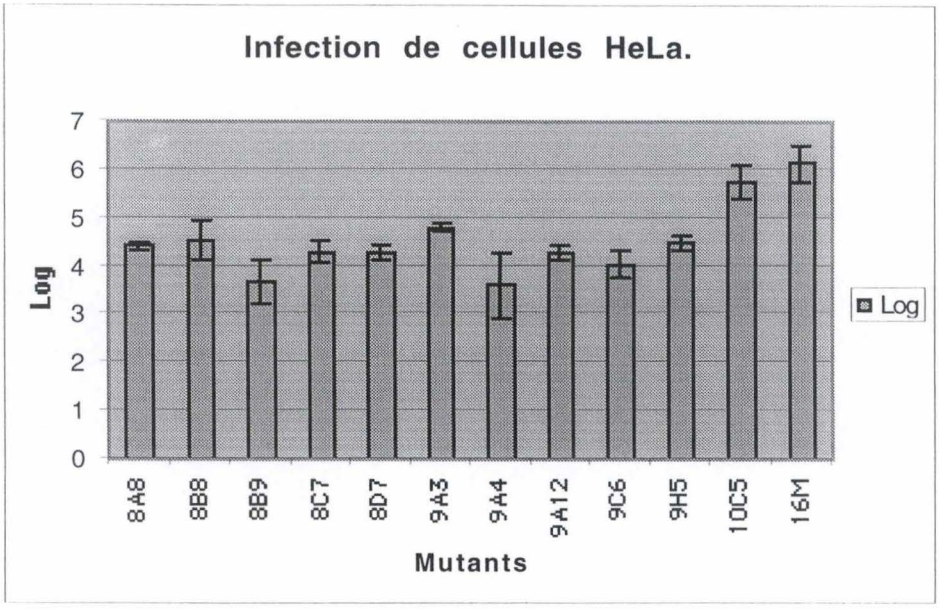
Mutant	Index de compétition
8A8	$3,3\ 10^{-2}$
8B8	$4,6\ 10^{-3}$
8B9	$2,5\ 10^{-2}$
8C7	$4,6\ 10^{-2}$
8D7	$1,7\ 10^{-2}$
9A3	$1,5\ 10^{-1}$
9A4	$1,7\ 10^{-2}$
9A12	$1,05\ 10^{-2}$
9C6	$6,6\ 10^{-2}$
9H5	$1,85\ 10^{-2}$
10C5	$1,3\ 10^{-1}$
9A5	1,6

Table 3.1 : Index de compétition calculé pour chaque mutant lors d'infections *in vivo* réalisées en compétition avec la souche virulente de *B. melitensis* 16M. Les doses infectantes ont été réalisées avec une suspension bactérienne constituée de chaque mutant et de la souche sauvage dans un ratio 1 : 1. Les infections ont été réalisées dans quatre souris pour chaque mutant selon la méthode d'infection en compétition. Après 5 jours d'incubation l'indice de compétition (IC) a put être calculerpour chaque mutant.L'IC représente le rapport des CFU mutant/WT obtenu après l'infection sur le rapport des CFU mutant/WT qu'il y avait dans la dose infectante pour ce même mutant. Le mutant non atténué 9A5 a servi de contrôle négatif.

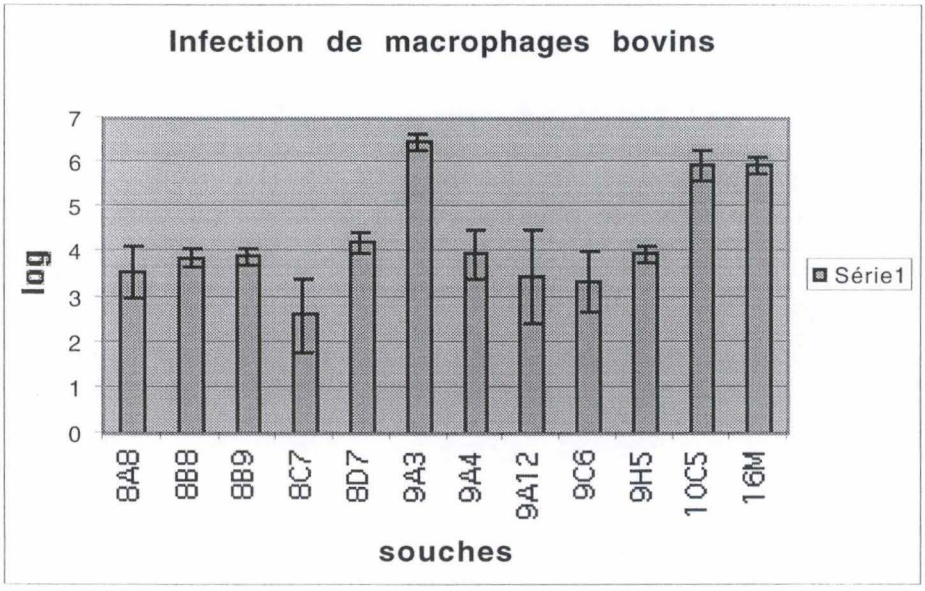
type de milieu nous a permis de vérifier le ratio « mutant : sauvage » présent dans les doses infectantes en soustrayant le nombre de CFU comptés pour un mélange X sur le milieu sélectif du nombre de CFU comptés pour ce même mélange sur le milieu non sélectif (ceci constitue l'input ratio). Cinq jours après l'infection des souris, celles-ci ont été sacrifiées, leurs rates ont été récupérées et les *Brucella* en ont été extraites et resuspendues dans 2 ml d'une solution de lyse des cellules eucaryote (PBS Triton-X100) libérant ainsi les brucelles intracellulaires. Des dilutions sériées de 10 en 10 ont été effectuées comme auparavant, et chaque dilution fut étalée sur les deux types de milieu (sélectif et non sélectif). De nouveau après 3 jours d'incubation, le nombre de CFU sur les deux types de milieu a été dénombré et a permis d'obtenir l'output ratio. Nous avons alors pu calculer l'IC pour chacun de nos mutants (table 3.1). Les résultats montrent pour tous nos mutants une atténuation variant entre 10 et 1000 fois. Cette expérimentation a été réalisée deux fois, ce qui signifie que chaque mutant a été testé dans quatre souris. Nous avons utilisé comme contrôle négatif le mutant non atténué 9A5 faisant partie des mutants STM criblés. Ces données confirment la pertinence de la sélection des mutants lors du screen STM.

3.2b Confirmation *in vitro* de l'atténuation.

La pathogénie de *Brucella* semblant principalement être basée sur sa capacité à infecter et à se multiplier dans les cellules phagocytaires professionnelles et non professionnelles, nous avons voulu déterminer si nos mutants atténués *in vivo* étaient également affectés dans leurs capacités à infecter et à survivre dans ces deux types de cellules. Pour ce faire, une lignée de macrophages bovins et des cellules épithéliales humaines (cellules HeLa) ont été infectées en triplicat avec chaque mutant. Le nombre de CFU compté pour chaque mutant a ensuite été comparé au nombre de CFU comptabilisées pour la souche sauvage. Le test a été effectué 2 fois afin de valider les résultats obtenus. Les cellules ont été infectées avec des doses infectantes de 6. 10^8 bactéries/ml, ce qui correspond à une valeur de 300 bactéries par cellule



Graphique 3.2



Graphique 3.3

Réplication intracellulaire des 11 mutants sélectionnés par la méthode STM, dans une lignée de cellules HeLa (graphique 3.2) et de macrophages bovins (graphique 3.3), après 48 heures d'infection. Les résultats représentent la moyenne du logarithme du nombre de bactéries intracellulaires vivantes (CFU), calculée sur trois puits dans deux infection indépendantes.

eucaryote. Des dilutions sériées des doses infectantes ont été étalées sur milieu 2YT non sélectif afin de déterminer le nombre exact de CFU. Quarante-huit heures après l'infection, les cellules eucaryotes ont été lysées afin de dénombrer les *Brucella* intracellulaires. De nouvelles dilutions sériées de chaque mutant ainsi que la souche 16M ont été étalées sur milieu 2YT non sélectif. Après trois jours d'incubation, le nombre de CFU pour chaque mutant a été compté et ces valeurs ont été comparées à la valeur obtenue pour la souche de *B. melitensis* 16M. Les résultats ainsi obtenus sont regroupés dans les graphiques 3.2 et 3.3, et indiquent que en macrophages, les mutants 10C5 et 9A3 ne sont pas atténués tandis que les autres mutants sont atténués avec des valeurs de 2 à 3 log. En cellules HeLa le mutant 10C5 n'est pas non plus atténué alors que les autres mutants présentent des atténuations variant entre 1 et 2 log.

3.2c Caractérisation phénotypique des 11 mutants par expérimentation *in vitro*.

Dans le but d'analyser plus précisément le phénotype de chacun de nos 11 mutants, différents tests *in vitro* ont été réalisés.

3.2c1 Test de croissance en présence d' H_2O_2.

Comme nous l'avons déjà signalé, l'étape critique lors d'une infection par *Brucella* consiste en la survie et la multiplication de la bactérie dans le phagocyte. Les premiers mécanismes induits dans le phagocyte pour tuer le pathogène sont principalement la production d'intermédiaires toxiques dérivés de l'oxygène tels que le péroxide d'hydrogène (H_2O_2) et le radical super oxyde ($O_2°$-). Pour identifier si un de nos mutants présente une sensibilité accrue au stress oxydatif nous avons testé leur croissance en présence d'H_2O_2.

Pour ce faire, une quantité égale d'une suspension bactérienne de chaque mutant ainsi que de la souche sauvage a été étalé sur milieu 2YT. Au centre de ces tapis bactériens, nous avons ensuite placé des petits carrés de papier Wattman de dimensions constantes et imbibé de 10 µl d'H2O2 30 % (Elzer *et al.*, 1994). Après 3 à 4 jours d'incubation à 37 C°, le diamètre d'inhibition de croissance pour chaque mutant a été comparé avec le diamètre obtenu pour la souche sauvage de *B. melitensis* 16M. Afin d'avoir une idée correcte des résultats du test pour

chaque mutant, l'expérience a été effectuée en double. Les résultats préliminaires de ce test nous ont permis de sélectionner deux mutants présentant une inhibition de croissance plus importante que la sauvage. Dans le but de confirmer l'inhibition observée, le même test fut refait en quadruple avec les deux mutants (8B9 et 9A4). Une analyse statistique (Anova 1 et Scheffé) indiquent que les mutants 8B9 et 9A4 présentent bel et bien une altération de leur capacité de croître en présence d'H_2O_2, avec une valeur hautement significative ($P< 0,01$) pour le mutant 8B9 et significative ($P< 0,05$)pour le mutant 9A4. Ces résultats peuvent expliquer l'atténuation plus importante observée de ces mutants en macrophages et permettent d'émettre une première hypothèse selon laquelle les gènes disruptés pour ces mutants interviennent très probablement dans la résistance de *Brucella* aux stress.

Le mutant 9A3 présentait lors des tests préliminaires une inhibition de croissance moins marquée que celle obtenue pour la souche virulente 16M.

3.2c2 Test de croissance sur milieu minimum (MM).

La vacuole de réplication étant un site pauvre en nutriments, nous avons voulu essayer de reproduire *in vitro* les conditions de manque nutritionnel présentes dans la vacuole en étalant nos mutants *Brucella* sur un milieu pauvre. Si un de nos mutants est auxotrophe, il ne devrait pas pouvoir y pousser.

Le milieu minimum réalisé pour *Brucella* contient les éléments suivant ; une source de carbone sous forme de glycérol et d'acide lactique, une source d'azote sous forme d'acide glutamique, de l'acide nicotinamique indispensable à *Brucella*, de la biotine (un cofacteur essentiel à la croissance de *Brucella*) et différents ions. La manipulation a consisté à déposer une goutte de 20 µl d'une suspension bactérienne réalisée pour chaque mutant sur MM, ainsi que sur milieu riche 2YT afin de contrôler que les suspensions bactériennes effectuées permettent une croissance normale sur milieu riche. Après une dizaine de jours d'incubation, nous avons observé la croissance de tous les mutants sur milieu riche mais également sur milieu minimum, indiquant ainsi qu'aucun mutant n'est auxotrophe. Les atténuations

Souches	pH 5	pH 5,4	pH 7
16M	-	+	+
8A8	-	+	+
8B8	-	+	+
8B9	-	-	+
8C7	-	+	+
8D7	-	+	+
9A3	+	+	+
9A4	-	-	+
9A12	-	+	+
9C6	-	+	+
9H5	-	+	+
10C5	-	+	+

Table 3.4 : Résultats obtenus lors des tests de croissance des 11 mutants aux pH 5, 5.4 et 7 (condition physiologiques). Les tests ont été effectués en duplicatt pour chaque mutant. Les résultats sont notés « + » pour croissance et «-» pour absence. Deux mutants (8B9 et 9A4) se distinguent par leur incapacité à croître à pH 5,4. Le mutant 9A3 se distingue par sa capacité à croitre à pH 5.

observées pour chaque mutant lors des différentes infections ne peuvent dès lors pas être directement explicables par un phénotype d'auxotrophie.

3.2c3 Test de croissance aux pH 5,5.4 et 7.

La cellule phagocytaire et plus spécialement la vacuole phagolysosomiale, de par l'acquisition d'une ATPase vacuolaire qui pompe les protons du cytoplasme à l'intérieur de la vacuole, constitue un environnement relativement acide pour la bactérie. La croissance de nos 11 mutants a été testée sous différentes conditions de pH, à savoir les pH 5, 5.4 et en condition normale à pH 7. Les tests ont été effectués en duplicat pour chaque mutant et les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus pour la souche virulente de *B. melitensis* 16M. Les résultats sont représentés dans le tableau 3.4. Il est surtout intéressant de constater que les résultats de ce test ressemblent fort aux résultats obtenus lors du test de croissance en présence d'H_2O_2, en effet, les mutants 8B9 et 9A4 présentent une incapacité à croître aux pH 5.4. En analysant le reste du tableau, on constate que tout comme la 16M, tous les autres mutants peuvent pousser aux pH 5.4 et 7. De même, à l'exception du mutant 9A3, ni la 16M ni aucun de nos mutants ne pousse à pH 5, ce qui semble indiquer que cette valeur de pH constitue un important facteur limitant de la survie de *Brucella*. Ici encore le mutant 9A3 a une résistance supérieure à la souche sauvage. Pour expliquer cela, on pourrait très bien imaginer que l'insertion du tagged Mini-Tn*5* dans le génome de ce mutant lui ait conféré une propriété nouvelle (en disruptant un gène ou un ensemble de gènes intervenant dans la régulation de croissance de *Brucella* en fonction de l'environnement rencontré).

3.2c4 Cristal violet (Godfroid *et al.*, 1998 ; White P. J., 1951).

Un des facteurs de virulence le mieux connu chez *Brucella* est la chaîne O du LPS. Dès lors nous avons utilisé la technique de coloration au cristal violet sur colonies pour déterminer si un ou plusieurs de nos mutants présentent un phénotype rough. Lors de ce test, on peut facilement faire la distinction entre souches smooth et rough étant donné que les souches rugueuses incorporent le colorant alors que les souches smooth au contraire, excluent le

colorant . Au terme de ce test, nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de mutants rough dans notre échantillon.

3.3 Résumé de la caractérisation phénotypique des 11 mutants.

Au terme de ces premiers essais de caractérisation, nous avons pu confirmer l'atténuation *in vivo* des 11 mutants sélectionnés via la méthode STM. Les tests *in vivo* nous ont fourni comme résultat des atténuations de 100 à 1000 fois des mutants 8A8, 8C7, 9C6, 9A12, 8B8, 8B9, 9H5, 9A4 et 8D7 par rapport à la souche virulente de *B. melitensis* 16M. Dans les mêmes conditions, des atténuations plus faibles (10 fois) ont été observées pour les mutants 9A3 et 10C5. A l'exception du mutant 10C5 qui n'est atténué dans aucun modèle in vitro et du 9A3 qui n'est altéré qu'en cellule HeLa, tous les autres mutants sont atténués dans les deux modèles cellulaires.

Lors des tests d'inhibition de croissance en présence d'H_2O_2 et de croissance à différents pH, les mutants 8B9 et 9A4 se sont révélés être moins résistants que la souche sauvage de *B. melitensis*. A l'inverse, le mutant 9A3 semble avoir une capacité de résistance plus importante aux stress que la 16M, puisqu'il pousse à pH 5 et est moins sensible à l'H_2O_2.

Ces résultats ne prendront tout leur sens qu'en connaissant le gène disrupté par le transposon, il est donc nécessaire de pouvoir caractériser génotypiquement nos mutants.

3.4 Caractérisation génotypique des 11 mutants : les différentes techniques employées en vue d'aboutir au séquençage des gènes disruptés par le tagged Mini-Tn5.

Dans le but de pouvoir attribuer une fonction ou de pouvoir caractériser génotypiquement les gènes disruptés par le tagged *Mini-Tn5* lors de la mutagenèse, nous avons employé deux techniques (la PCR inverse et la PCR arbitraire). Avant cela, nous avons voulu vérifier par southern blot l'insertion unique du transposon (Tn) dans chacun de nos mutants.

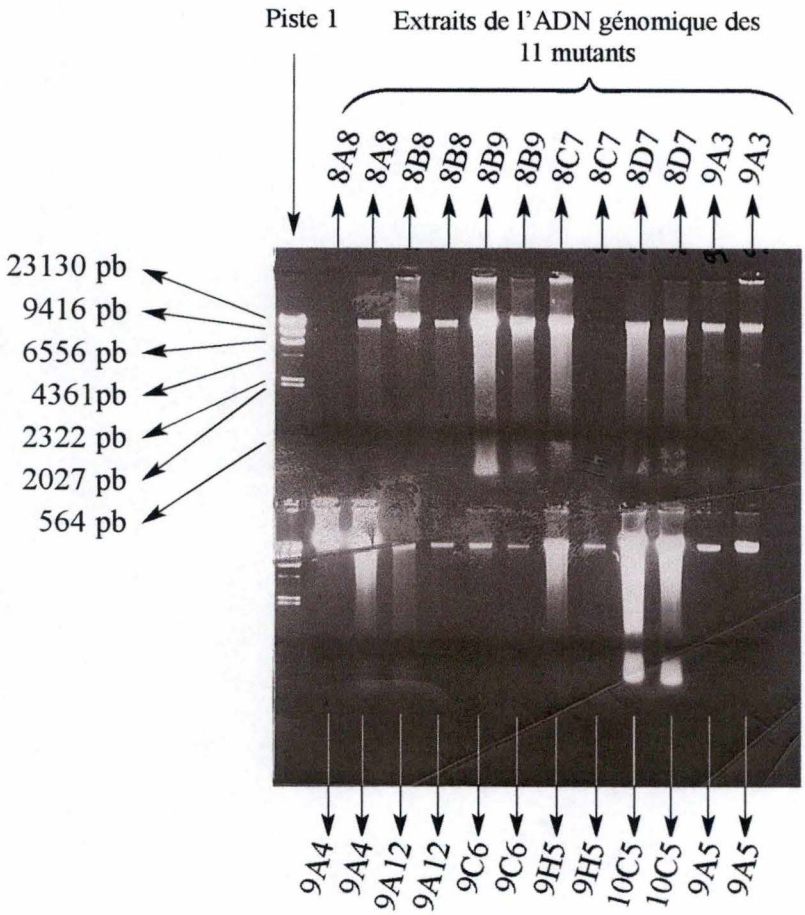


Photo 2 : Extraction d'ADN génomique des 11 mutants sélectionnés par la méthode STM.
La première piste en haut et en bas représente la migration du marqueur de taille moléculaire Lambda DNA/Hind III.
Toutes les autres pistes représentent l'ADN génomique des 11 mutants extrait via la méthode C-TAB.
Afin d'obtenir une quantité d'ADN génomique plus importante pour chaque mutant, l'extraction a été réalisée en duplicat.
Les traînées blanches représentent la dégradation de ces ADN génomique, probablement due à la présence d'une endonucléase.

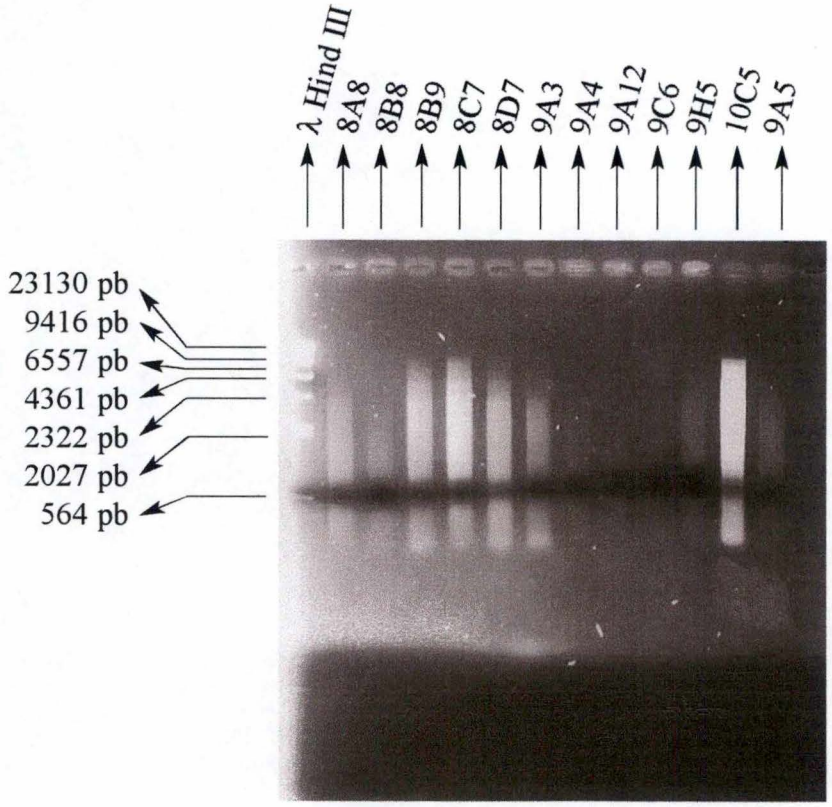


Photo 3 : Electrophorèse en gel d'agarose 0,8% des ADN génomiques des 11 mutants et du contrôle positif 9A5 (dernière piste) restreint au moyen de l'enzyme *Eco*RV.
La première piste représente le marqueur de taille moléculaire Lambda DNA/Hind III.
Les mutants 9A4, 9A12, 9C6,et 9A5 ne présentent que très peu d'ADN génomique restreint

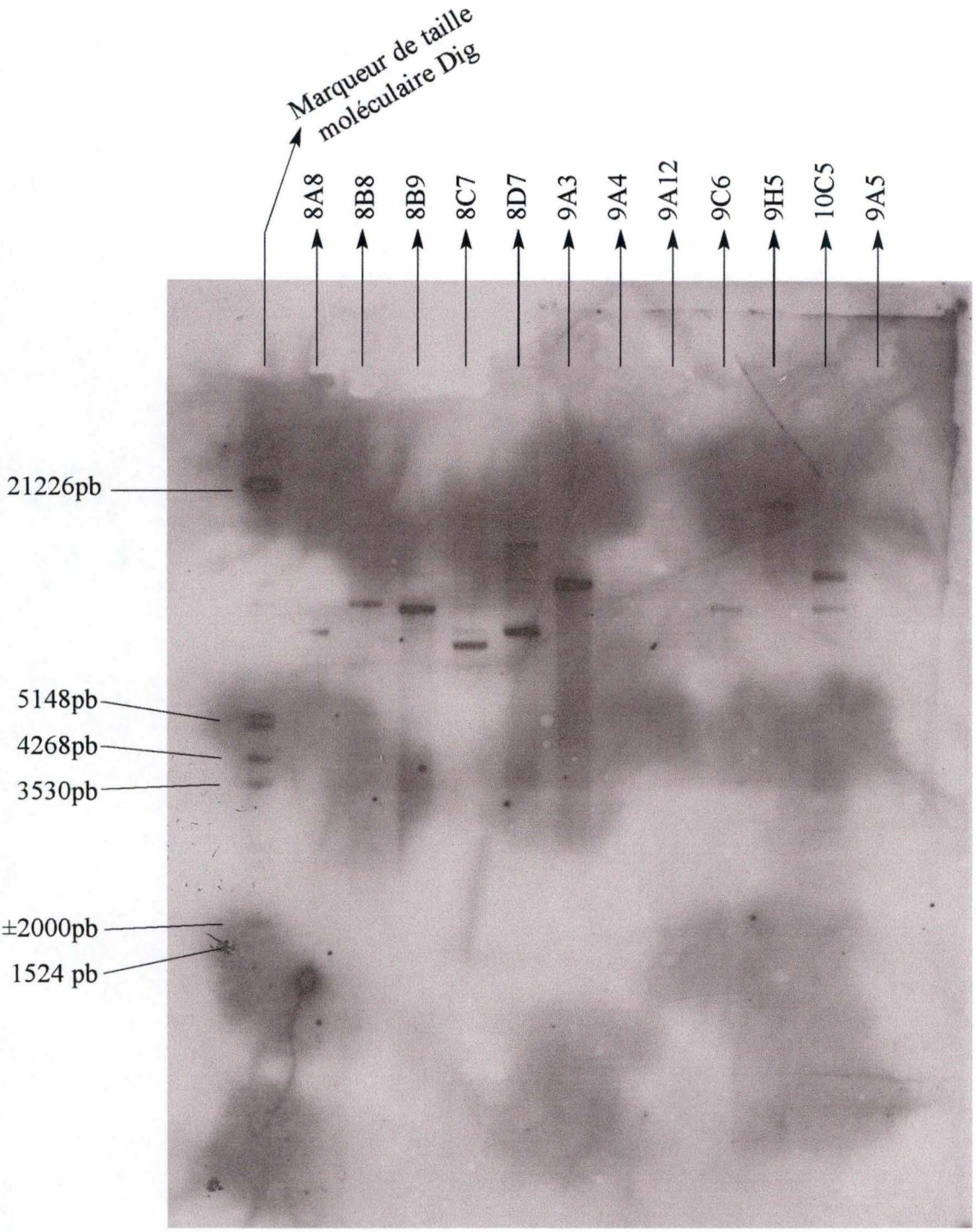


Photo 4 : Southern blot réalisé sur l'ADN génomique de nos 11 mutants restreints au moyen de l'enzyme *Eco*RV.
La première piste correspond au marqueur de taille moléculaire Dig et permet d'estimer la taille des fragments d'ADN génomique de 11 mutants contenant la tagged mini-Tn*5* entre 8 et 5 kb. (de la deuxième piste à l'avant dernière piste.
La dernière piste représente le contrôle positif qui est le mutant virulent 9A5 criblé par la méthode STM. La bande n'est pas visible sur la photo mais était néanmoins légèrement marquée sur le film.
Le fait de ne pouvoir observer des bandes pour les mutants 9A4 et 9A12 est dû à la faible quantité d'ADN génomique dont nous disposions au départ et aux pertes d'ADN lors du transfert du gel d'électrophorèse à la membrane d'hybridation.

3.4a « Matériel de base », l'obtention de l'ADN génomique des 11 mutants.

Pour pouvoir obtenir l'ADN génomique de nos mutants, chacun de ceux-ci ont été cultivés dans 5 ml de milieu liquide et leur ADN a été extrait selon la méthode C-TAB (Ausubel *et al.*, 1991). Les ADN génomiques extraits ont ensuite été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose afin d'estimer les quantité dont nous disposions (photo 2). Sur la photo du gel, on peut observer des traces de dégradation qui seraient probablement dûes à la présence d'une endonucléase qui n'aurait pas été éliminée lors du traitemant au phénol-chloroforme, ou qui serait venue contaminer la solution par après.

3.4b Distinction des 11 mutants par Southern blot.

Un southern blot sur nos 11 mutants a été réalisé afin de vérifier que ceux-ci portaient chacun une insertion unique du tagged Mini-Tn*5*.

L'ADN génomique de chacun de nos mutants a été restreint au moyen de l'enzyme *Eco*RV. Cette enzyme coupe relativement souvent dans l'ADN génomique de *Brucella* mais pas dans le tagged Mini-Tn*5*. Au terme de cette restriction un smear de bandes d'ADN a été obtenu après électrophorèse en gel d'agarose (photo 3). Les fragments ainsi obtenus ont alors été analysés par southern blot en utilisant le gène de résistance à la kanamycine comme sonde (photo 4). On remarque l'apparition de plusieurs bandes pour certains mutants dont certaines sont moins marquées, ce phénomène pourrait être expliqué par une restriction incomplète de ces ADN génomiques, ou par la dégradation observée après extraction. Cependant, les différents séquençages effectués par la suite sur les côtés I-end et O-end du transposon nous ayant toujours donné les mêmes résultats pour un mutant donné, nous indiquent qu'une seule insertion du tagged Mini-Tn*5* a bien eu lieu et ce pour chacun de nos mutants. De plus au début de ce projet, P. Lestrate a testé 20 mutants de la banque et a montré que la transposition était bien aléatoire, et que chaque mutant ne possédait qu'une seule copie du transposon. On constate également qu'aucune bande n'est visible pour les mutants 9A4 et 9A12. Ceci peut être expliqué par le fait que la quantité d'ADN génomique restreint pour ces deux mutants

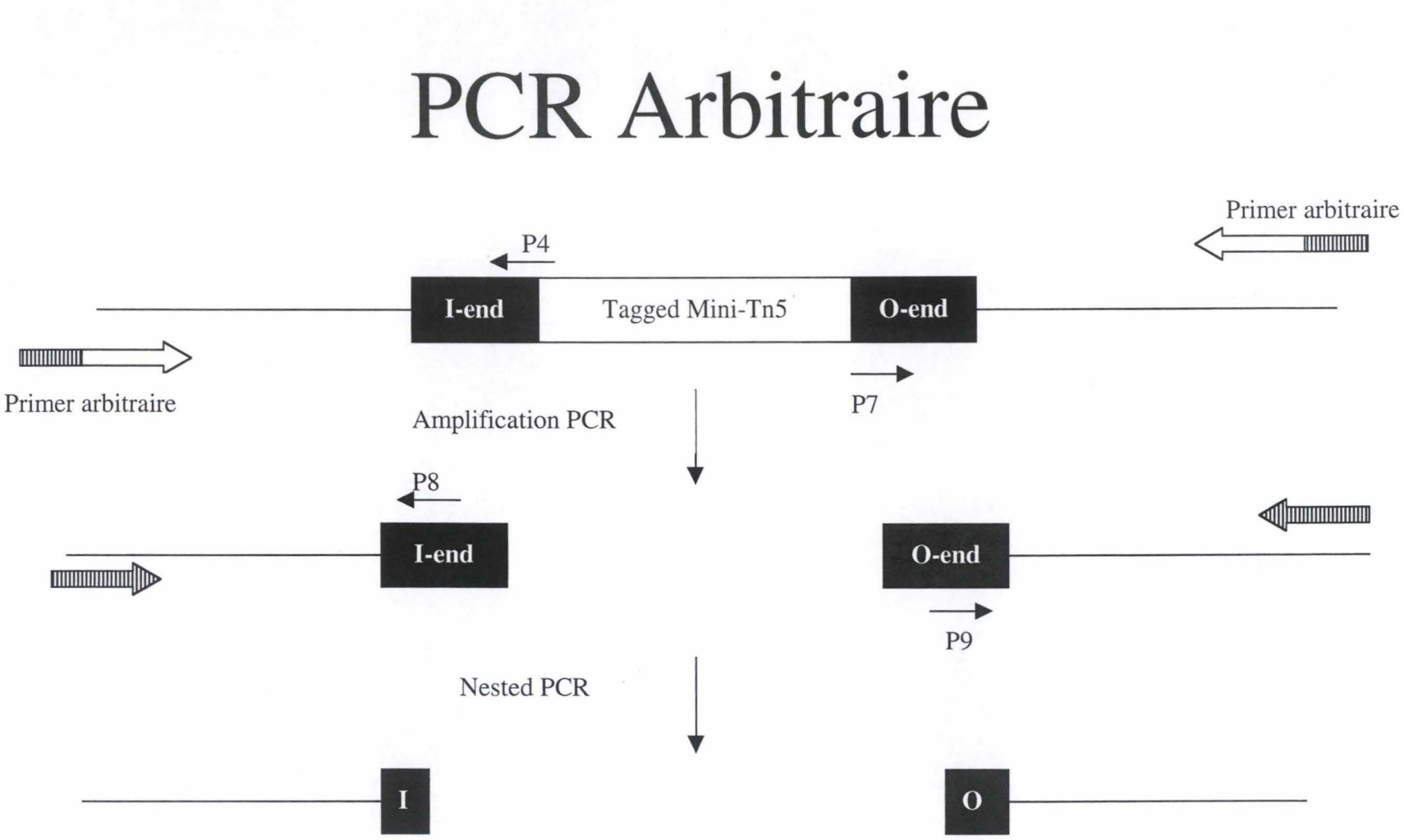


Figure 3.5 : Représentation schématique de la PCR arbitraire. L'ADN génomique bordant le transposon est amplifier lors d'un premier round à l'aide d'un primer contenant une partie constante (en hachuré) et une partie aléatoire et d'un primer s'hybridant a une partie interne d'une des deux extrémités (P4 pour l'extrémité I et P7 pour l'extrémité O). Une deuxième PCR (nested PCR) est effectuée sur les produits d'amplification à l'aide d'un primer s'hybridant à la partie constante du primer arbitraire et d'un primer s'hybridant a une région externe d'une des deux extrémités (P8 pour l'extrémité I et P9 pour l'extrémité O).

était trop faible au départ (photo 3). Les conclusions de cette analyse sont donc que chaque mutant porte dans son génome une seule insertion du tagged Mini-Tn*5*.

Pour mieux comprendre les résultats observés jusqu'à présent, nous avons essayé de cloner les fragments d'ADN bordant le transposon afin de pouvoir les séquencer. Deux techniques ont été utilisées pour obtenir ces séquences ; la PCR arbitraire et la PCR inverse (IPCR).

3.4c PCR arbitraire sur l'ADN génomique.

L'objectif de cette PCR va être d'amplifier spécifiquement les séquences d'ADN bordant le tagged Mini-Tn*5* afin d'identifier après clonage et séquençage le gène disrupté lors de la mutagenèse transpositionnelle.

Cette PCR se déroule en deux temps (fig 3.5) , lors du premier round de PCR un primer spécifique d'une extrémité du Tn est utilisé en association avec un primer arbitraire synthétisé de sorte qu'une partie de sa séquence est constante alors que le reste des nucléotides est aléatoire . Au terme de ce premier round, nous obtenons des amplifications de taille variable. Un deuxième round de PCR appelé « nested PCR » permettant d'amplifier spécifiquement les séquences bordant le tagged Mini-Tn*5* est ensuite réalisé sur les produits de la première PCR. Les amorces utilisées pour ce second round de PCR sont : un primer correspondant à une position plus externe de l'extrémité du Tn ainsi qu'un deuxième primer désigné de façon à coller à la partie constante du primer arbitraire utilisé lors du premier round de PCR (O'Toole *et al.,* 1998)

Cette technique a été employée afin d'amplifier spécifiquement les segments d'ADN génomique bordant le tagged Mini-Tn*5*. Les deux extrémités du transposon sont désignées sous les termes I-end et O-end (fig 3.5). Pour le premier round de PCR, nous avons utilisé les primers P4 et P7 chacun en association avec un mélange de primers (Arb1,Arb3, Arb4 et arb5). Le primer P7 a été synthétisé de façon à coller à l'extrémité O-end du tagged MiniTn*5*, alors que le primer P4 correspond à l'extrémité I-end. Les primers Arb1, Arb3, Arb4 et Arb5 quant à eux ont été synthétisés de façon à avoir une partie constante identique entre eux,

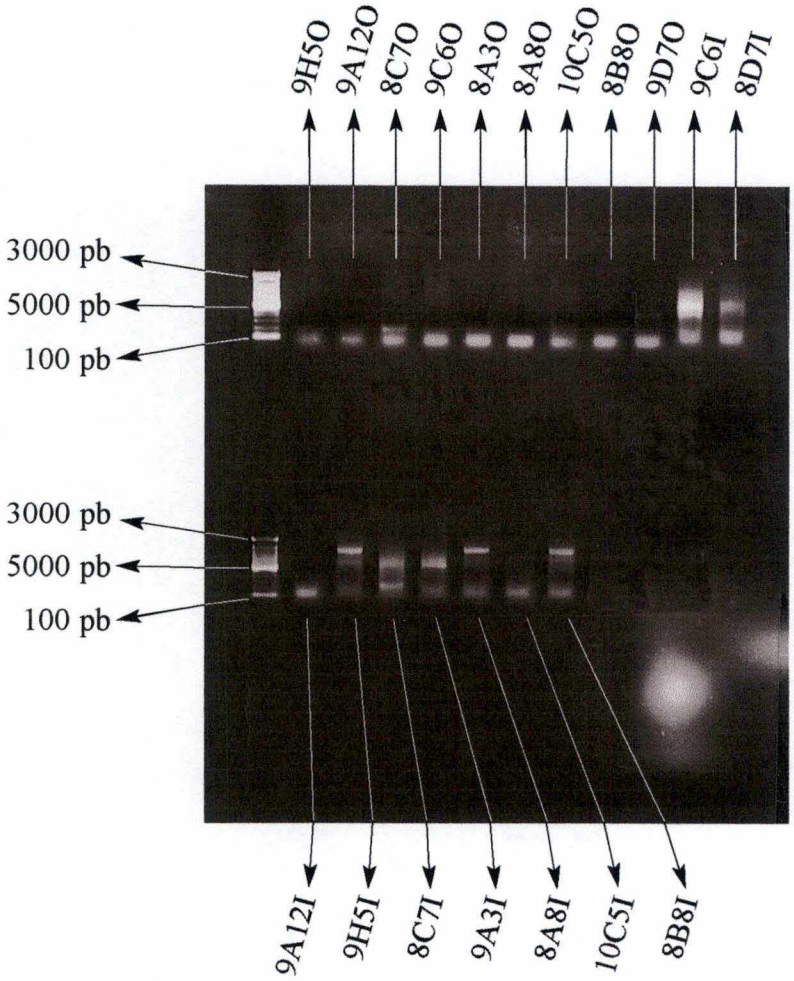


Photo 5 : Electrophorèse en gel d'agarose 0,8% des produits de PCR arbitraire obtenus pour certains de nos mutants.

La première piste en haut et en bas représente le marqueur de taille moléculaire 100 bp DNA Ladder. Les bandes d'intérêt amplifiées par la PCR arbitraire sont celles se trouvant en position supérieure après la migration. Les bandes retrouvées en position inférieure pour tous les mutants correspondent à des oligonucléotides non incorporé ou à de l'ARN.

Nous avons obtenus des amplifications de segments bordant l'extrémité du tagged mini-Tn*5* pour les mutants 8C7O, 8D7O (visible sur le gel), 9C6I, 8D7I, 9H5I, 8C7I, 9A3I, 8A8I et 8B8I.

I et O correspondent aux extrémités I-end et O-end du tagged mini-Tn*5*.

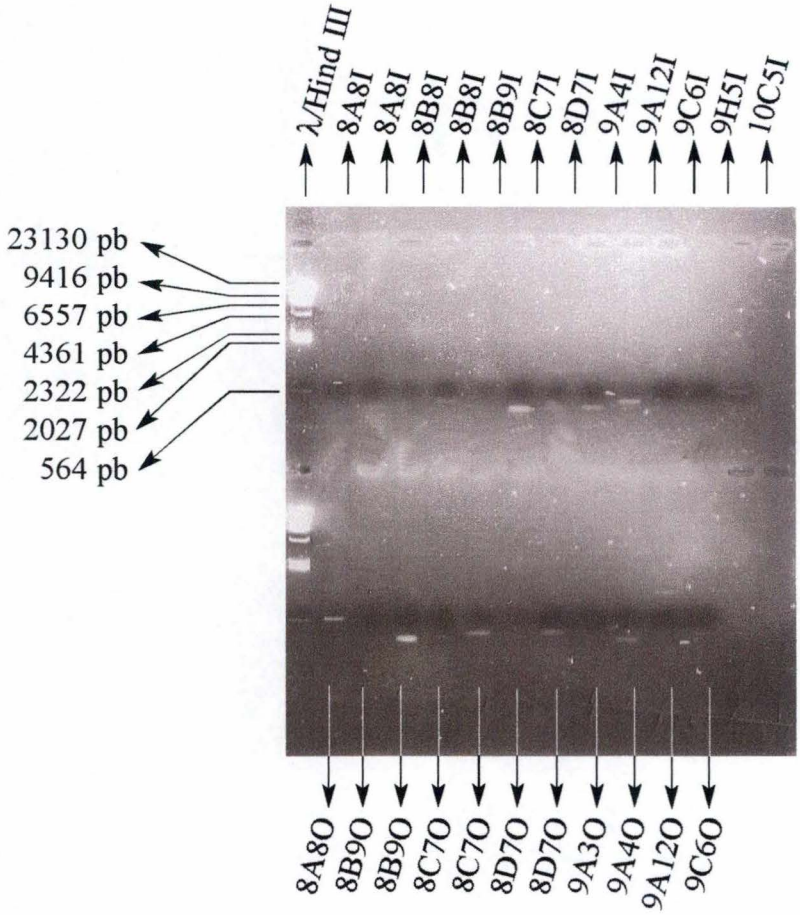


Photo 6 : purification de produits de PCR arbitraire après extraction du gel des bandes amplifiées.
La première piste en haut et en bas, correspond au marqueur de taille moléculaire Lambda DNA/Hind III. Les lettres I et O après le nom de chaque mutant correspondent aux extrémités I-end et O-end du Tn qui ont été amplifiées par PCR arbitraire.

suivie d'une séquence aléatoire et enfin chacun d'entre eux est terminé par une séquence unique de quatre nucléotides qui leur est propre. Ces primers peuvent donc aller s'hybrider n'importe où sur l'ADN génomique (l'utilisation d'un mélange de primer a permis d'augmenter les chances d'hybridation sur l'ADN génomique). Au terme du premier round de PCR, nous avons obtenu des bandes de taille variable qui en électrophorèse en gel d'agarose apparaissent sous forme d'un smear de bandes. Lors du second round de PCR, nous avons utilisé les Primers I-end et O-end chacun en association avec le primer Arb2. Les primers I-end et O-end correspondent respectivement aux extrémités I et O du transposon mais ont une position un peu plus extérieur par rapport aux primers P7 et P4 sur le tagged Mini-Tn*5* (fig 3.3). Le primer Arb2 a également été dessiné de façon à correspondre à la partie constante et commune des primers Arb1, Arb3, Arb4 et Arb5. Le second round de PCR nous a donc alors permis d'amplifier des fragments d'une taille variable bordant le tagged *Mini-Tn5*. Les produits de PCR arbitraire ainsi obtenus ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1 %, et la co-migration du marqueur de poids moléculaire 100pb a permis d'estimer la taille des fragments amplifiés (photo 5). Le contrôle d'amplification par PCR arbitraire sur l'ADN génomique de la souche sauvage ont été effectué lors de la mise au point de la technique, montrant qu'il n'y avait pas d'amplification détectable chez celle-ci. De plus, les profils obtenus étant différent pour chaque mutant, nous en avons donc déduit que les amplifications par PCR arbitraire étaient bien spécifiques des séquences bordant le tagged Mini-Tn*5*.

Les bandes d'intérêt ont été extraites du gel d'électrophorèse pour ensuite pouvoir purifier ces fragments. Une fraction de chaque produit ainsi purifié a alors été soumise à une nouvelle électrophorèse en gel d'agarose 1 % tout en faisant co-migrer le marqueur de poids moléculaire à 100 pb. Cette nouvelle migration nous a permis de vérifier que nous n'avions pas perdu les fragments d'ADN lors de l'étape de purification. (photo 6)

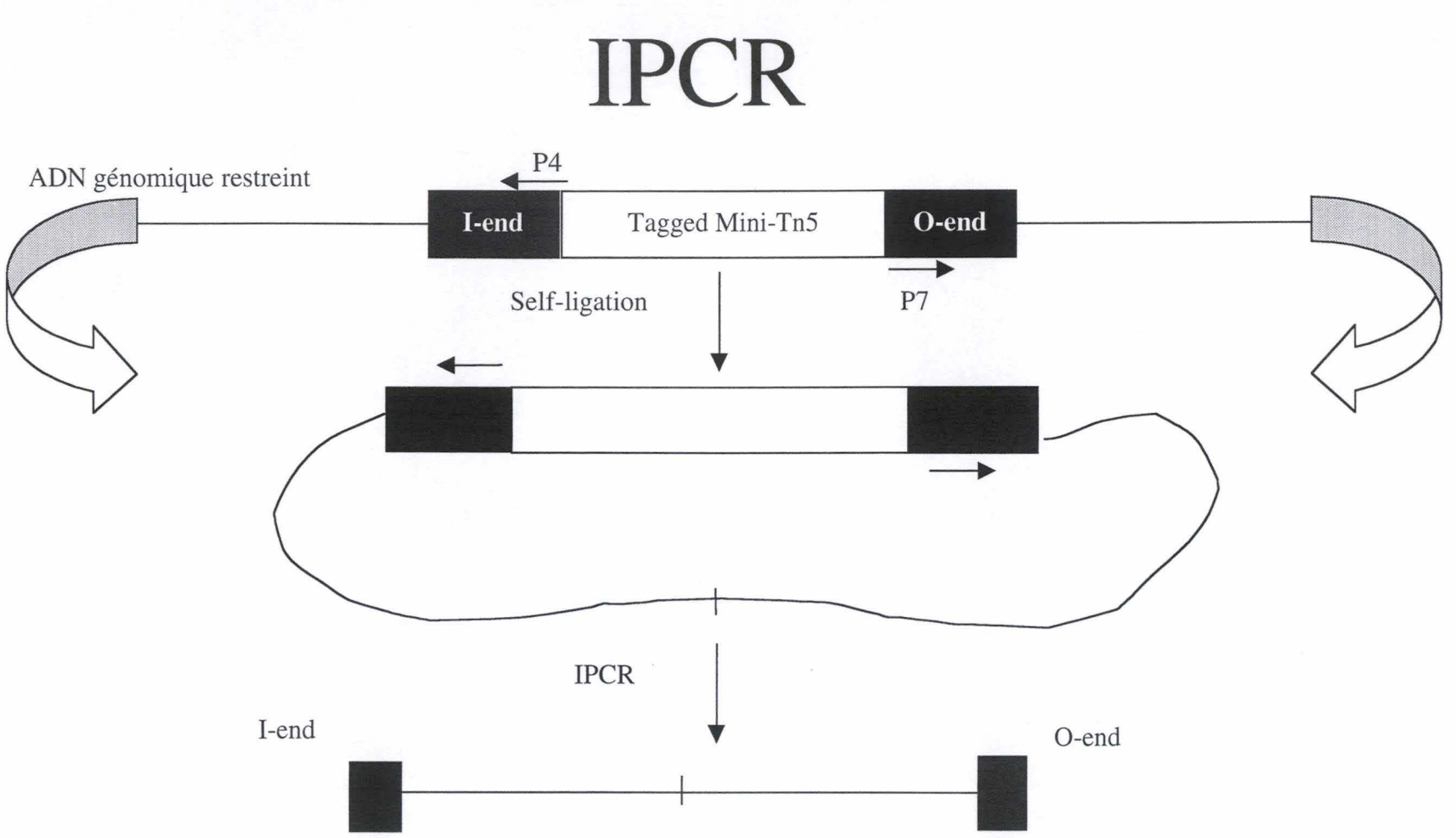


Figure 3.6 : Représentation schématique de l'inverse PCR. L'ADN génomique est resteint et ensuite religué sur lui-même. L'IPCR est ensuite effectuée sur ces fragments d'ADN recircularisés en utilisant des amorces spécifique des extrémités I-end et O-end du transposon. Cette technique va nous permettre d'amplifier spécifiquement les séquences bordant le transposon.

3.4d IPCR sur fragments d'ADN génomique restreints via l'enzyme *Eco*RV.

L'amplification par IPCR ou PCR inverse (ref :Ochman 1988) est appelée ainsi parce qu'elle s'effectue sur des molécules d'ADN circularisées en utilisant deux primers dont les extrémités 5' se font face. Cette technique a été utilisée sur les fragments d'ADN génomique de nos mutants afin d'amplifier de plus long fragments d'ADN bordant le transposon (via l'emploi de la polymérase Expand) et afin d'obtenir les séquences bordant le transposon que nous n'avions pas pu amplifier par PCR arbitraire.

L'IPCR s'effectuant sur des fragments d'ADN génomique circularisés, il est donc nécessaire dans un premier temps de restreindre l'ADN génomique pour ensuite religuer les fragments sur eux-mêmes. L'IPCR est alors effectuée sur ces ADN circularisés en utilisant des amorces spécifiques d'une séquence connue se trouvant à l'intérieur de la région à amplifier (fig 3.6).

Dans le but d'amplifier les séquences d'ADN se trouvant de part et d'autre du transposon, l'ADN génomique de nos mutants a d'abord été restreint par l'enzyme *Eco*RV (qui ne coupe pas dans le tagged Mini-Tn*5*, (photo 3) pour ensuite circulariser les fragments par ligation. Les amorces utilisées pour L'IPCR sont les primers I-end et O-end correspondant aux deux extrémités du tranposon et permettant ainsi d'amplifier les séquences adjacentes. De plus, sur base du southern et ayant estimé les longueurs des fragments à environ 8 kb, nous avons décidé d'utiliser la polymérase Expand qui permet l'amplification de longs fragments d'ADN. Cette polymérase est en fait constituée d'un mélange de deux polymérases ; la Taq polymérase qui en fin d'élongation ajoute une adénosine et la Pwo DNA polymérase qui elle ne termine pas son élongation par une adénosine. Après électrophorèse en gel d'agarose 1 % nous avons pu visualiser les fragments amplifiés (photo 7). La présence de plusieurs bandes d'ADN amplifié pour un même mutant peut être expliqué par une restriction partielle de l'ADN génomique par *Eco*RV ou encore une fois par la dégradation initiale de l'ADN génomique (les deux explications ayant pour résultat de donner des segments de taille variable de part et d'autre du transposon). Ici encore, le contrôle d'amplification par IPCR sur l'ADN génomique restreint et religué de la 16M n'a pas été effectué étant donné que des tests

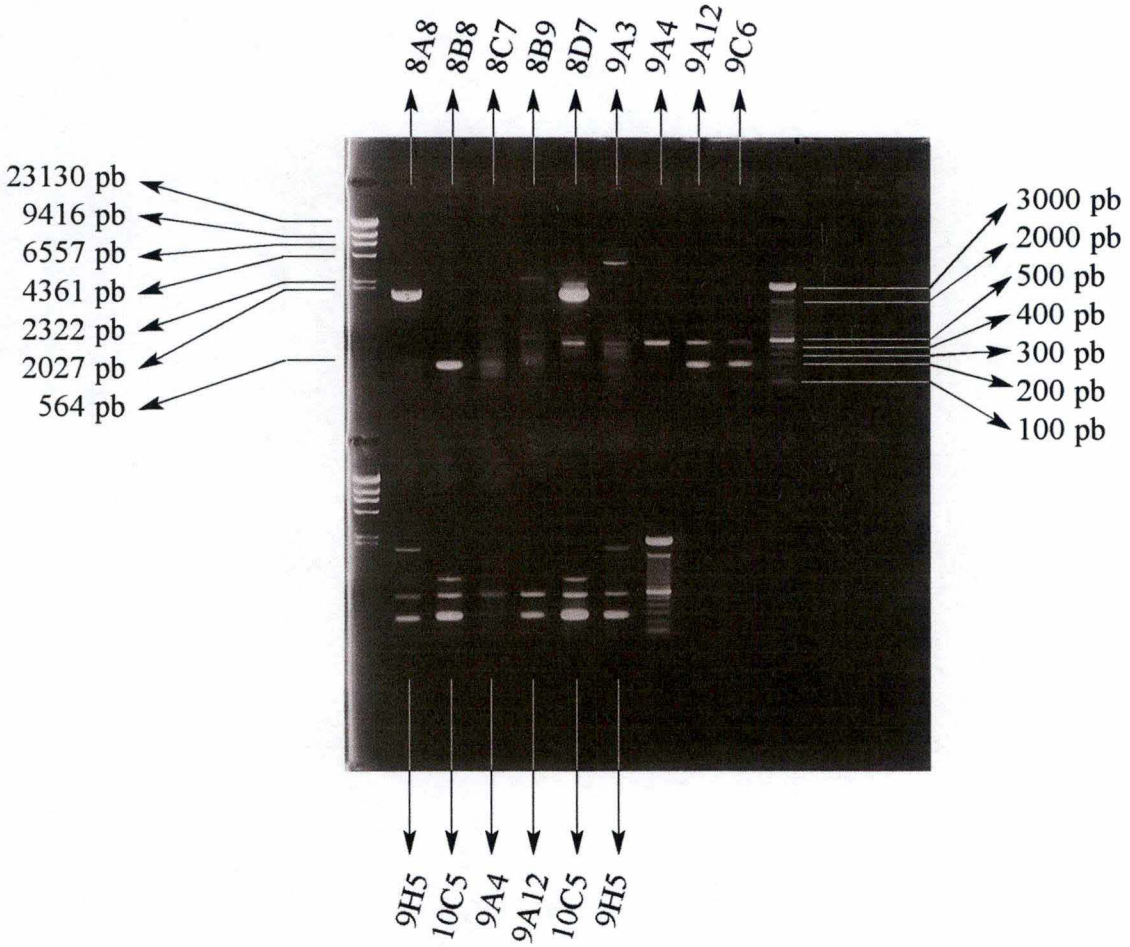


Photo 7 : électrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits de l'IPCR.
La première piste en haut et en bas, correspond au marqueur de taille moléculaire Lambda DNA/Hind III.
Les dernières pistes en haut et en bas représentent le marqueur de taille moléculaire 100 bp.
On peut observer les amplifications spécifiques obtenues pour chaque mutant. L'observation de plusieurs bandes d'ADN amplifié pour un même mutant est très probablement le résultat de la dégradation initiale de l'ADN génomique ou d'une restriction incomplète de cet ADN par l'enzyme *Eco*RV.

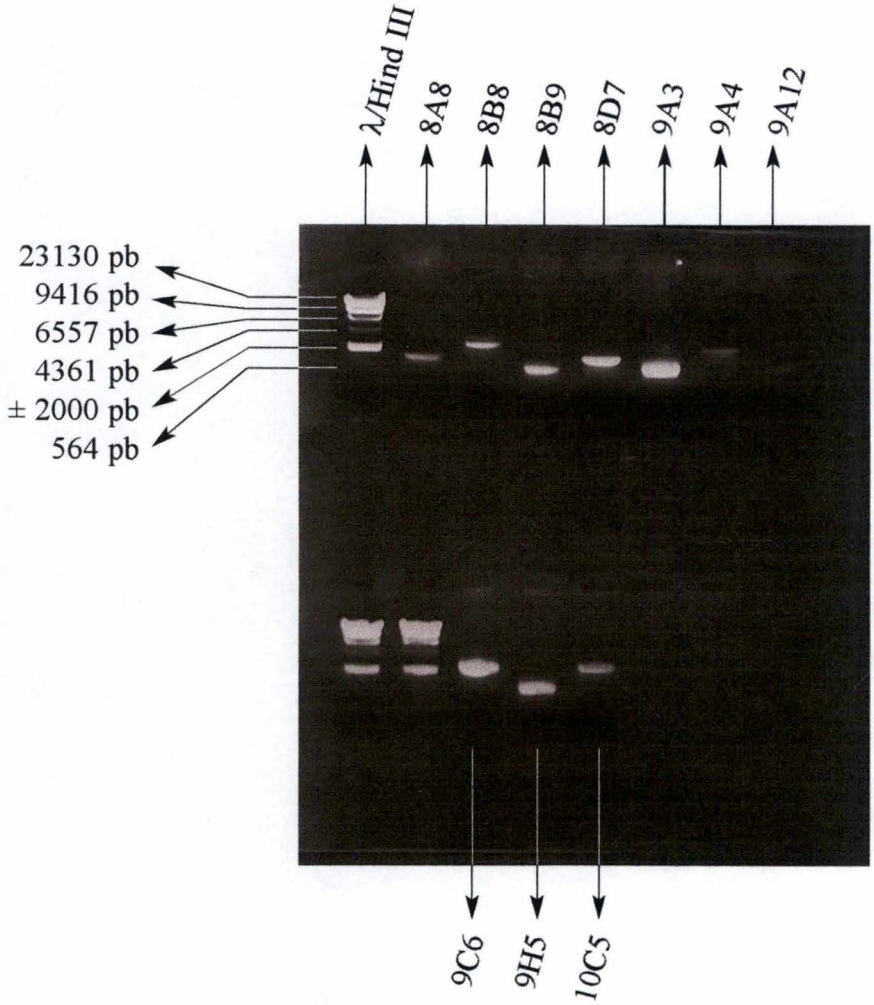


Photo 8 : purification des produits amplifiés par IPCR après extraction du gel d'électrophorèse des bandes d'intérêt.
La première piste en haut et en bas ainsi que la deuxième piste en bas représentent la migration du marqueur de taille moléculaire Lambda DNA/Hind III. Les mutants pour lesquels des produit d'IPCR ont pu être purifiés sont représentés dans les pistes suivantes.

antérieurs avaient montré qu'il n'y avait pas d'amplification pour cette souche via cette méthode. Ensuite, les bandes se trouvant en position supérieure sur le gel d'électrophorèse ont été extraites pour être purifiées. La purification des produits IPCR a été effectuée selon le protocole du kit QIA quick (Quiagen). Une fraction de chaque produit ainsi purifié a alors été soumise à une nouvelle électrophorèse en gel d'agarose 1 % tout en faisant co-migrer le marqueur de poids moléculaire à 100 pb. (photo 8).

3.4e Clonage des fragments obtenus par PCR arbitraire et IPCR dans le vecteur pGEM-T et transformation des produits de ligation en cellules $CaCl_2$ compétentes.

Le vecteur pGEM-T (Proméga) a été préparé à partir du vecteur pGEM^R-5Zf restreint avec *Eco*RV et auquel des thymines ont été ajoutées chimiquement aux deux extrémités 3'. Ces bouts protrudants 3'-T sont particulièrement intéressants pour réaliser une ligation A-T avec nos produits de PCR arbitraire et d'IPCR étant donné que la Taq polymérase présente la particularité de terminer l'étape d'élongation des brins d'ADN en ajoutant une adénine à l'extrémité terminale 5'.

Les fragments correspondant aux séquences bordant le transposon ont donc été ligués au vecteur pGEM-T.

Le plasmide vecteur pGEM-T possède deux sites de restriction pour l'enzyme *Eco*RI, le gène de résistance à l'ampicilline (gène *bla*) ainsi que les gènes *lacI* et *lacZ* permettant la selection blanc-bleu. Les produits de ligation ont ensuite été transformés dans une souche de *E. coli* DH5α ou DH10B $CaCl_2$ compétentes. Les différentes transformations ont été étalées sur milieu sélectif LB Amp (permet la sélection du plasmide), X-Gal et IPTG (pour la sélection blanc-bleu des cellules compétentes transformés par le plasmide contenant l'insert).

Pour rappel, la sélection blanc-bleu permet de visualiser facilement si un insert a été ligué dans le vecteur. En effet en cas de non insertion du fragment, le gène de la β-galactosidase se trouvant en aval du site multiple de clonage sur le vecteur est exprimé lorsque son inducteur (IPTG) est présent dans le milieu. Le produit de la β-gal peut donc cliver le X-Gal en un

chromophore bleu et galactose, les colonies apparaissent donc bleues. Si par contre il y a eu ligation d'un insert, le gène *lacZ* n'est en principe pas exprimé et les colonies sont blanches.

3.4f Mini prep et restriction *Eco*RI diagnostique.

Les colonies blanches résultant des étapes précédentes ont été mises en pré-culture dans le milieu LB Amp en vue de réaliser les minipréparations permettant d'extraire l'ADN plasmidique. Une restriction diagnostic *Eco*RI a ensuite été effectuée afin de vérifier la présence de l'insert (résultat non montré).

3.4g PCR pour séquençage.

Les PCR et réaction de séquençage ont été effectuées dans le laboratoire de physiologie humaine chez le professeur A. Goffinet (FUNDP). Par réaction, 200 à 500 ng d'ADN plasmidique additionné de 3,2 picomoles du primer universel M13 reverse ou forward dans un volume final de 12 µl (a compléter avec de l'eau stérile) ont été porté au séquençage.

3.4h Résuslats du séquençage.

Des séquences ont été obtenues pour les extrémités I-end et/ou O end de 8 mutants. Dans tous les cas, les sequences obtenues du cote I et du coté O correspondaient bien au même géne. Prouvant une fois de plus la validiter des deux méthodes de clonages utilisées.

Des recherches en blastn [1] et blastx [2] dans le serveur BLAST ont permis d'identifier certaines homologies significatives entre 8 de nos mutants et des séquences connues chez d'autres organismes. Les homologies obtenues sont reprises dans la table 6 et seront discutées individuellement dans le chapitre suivant pour chaque mutant en tenant compte des résultats des différents tests appliqués *in vivo* et *in vitro*.

1 : compare une séquence nucléotidique à une banque de séquences nucléotidique (Altschul *et al.*, 1990).
2 : compare une séquence de nucléotides traduite dans toutes les phases de lecture à une banque de séquences protéique(Gish and States, 1993).
Web site : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi

3.5 Discussion générale.

Au terme de ce travail, 11 mutants atténués ont été isolés et caractérisés. Les données obtenues amènent de nouvelles informations permettant de mieux cerner les mécanismes moléculaires de la virulence de *Brucella*. Par soucis de clarté, les mutants vont être discutés un à un ou par groupes en fonction des données dont nous disposons à leur sujet.

1) Le mutant 8A8.

Le mutant 8A8 est disrupté dans un gène homologue à *mosA* de *Sinorhizobium meliloti*. Chez *S. meliloti*, ce gène code pour une protéine intervenant dans la synthèse de la rhizopine (Rossbach *et al.*, 1995). La rhizopine (L-3-O –methyl-scyllo –inosamine), un dérivé de l'inositol (Bruijn, 1998), est un composé spécifique de la symbiose, synthétisé dans les nodules de fixation de l'azote induits par certaines souches de *S. meliloti* lors d'une relation symbiotique entre la plante et la bactérie (Tempe, 1982). Le gène *mosA* fait partie d'un opéron composé de 4 ORFs (ORF1 et *mosABC*) (Murphy *et al.*, 1993). Une étude réalisée par Murphy *et al.* en 1993, a permis de démontrer que l'ORF1 du locus mos n'est pas requise pour la synthèse de la rhizopine, alors que les ORFs *mosA*, *mosB* et *mosC* sont elles nécessaires. Finalement, la fonction de la protéine MosA semble être d'ajouter un groupement méthyl à la scyllo-inosamine lors de la production de la rhizopine (Murphy *et al.*, 1993).

Chez *S. meliloti*, le locus *moc* intervient dans le catabolisme de la rhizopine (Rossbach *et al.*, 1995). Il a été proposé que la capacité de pouvoir utiliser la rhizopine comme source de carbone et d'azote, pourrait donner un avantage compétitif à ces souches de *S. meliloti* dans la rhizosphère (Rossbach, 2000 ; Rossbach *et al.*, 1995).

Sinorhizobium meliloti et *Brucella spp* font toutes deux partie de la sous-classe $\alpha 2$ des protéobactériacées et présentent des similitudes tant dans leur cycle infectieux qu'au niveau de leur génome (LeVier, *et al.*, 2000; Inon de Iannino, et *al.*, 1998)

La découverte du gène *mosA* chez *Brucella*, bien que devant être investigué plus amplement permet de supposer une possibilité pour la bactérie de synthétiser une rhizopine lui permettant

ainsi d'obtenir une source de carbone alternative dans certaines conditions. Les rhizopines pourraient également jouer un rôle signalétique entre *Brucella* et/ou entre *Brucella* et les cellules eucaryotes.

Le pourcentage d'identité nucléotidiques de notre séquence avec le gène *mosA* de *S. meliloti* étant élevé (89 %), on peut se demander si tout l'opéron est conservé chez *Brucella*. Un criblage d'une banque d'ADN génomique de *Brucella* avec le fragment que nous avons obtenu comme sonde, nous permettrait après séquençage, de savoir si le reste de l'opéron *mos* est présent. De même il serait intéressant de déterminer si ce locus est présent dans les differentes souches de *Brucella*.

La rhizopine étant un dérivé inositol (Loewus, 1990), et sachant que MocA et MocC ont ensemble une activité *myo*-inositol déshydrogénase (Galbraith *et al.*, 1998), il serait intéressant de réaliser un dosage de la *myo*-inositol déshydrogénase (Poole, 1994) chez *Brucella* afin de mettre en évidence la présence du locus *moc*.

Une autre possibilité serait de placer la souche sauvage de *B. melitensis* ainsi que notre mutant sur milieu minimum avec pour seule source de carbone le *myo*-inositol. Si la souche sauvage de *Brucella* parvenait à pousser dans ces conditions et le mutant pas, cela signifierait non seulement qu'elle est capable de synthétiser la rhizopine à partir du *myo*-inositol mais aussi qu'elle peut la dégrader.

1) Le mutant 8C7.

Chez le mutant 8C7, le gène disrupté par le transposon présente une homologie avec le gène codant pour la Cobyrinic acid A,C-diamide synthase de *Pseudomonas denitrificans*.

Chez *Pseudomonas*, cette enzyme intervient dans l'amidation de groupes carboxyliques lors de la voie de biosynthèse de la cobalamine. La cobalamine où vitamine B12 est un cofacteur intervenant dans de nombreuses voies métaboliques dont la biosynthèse des purines et/ou des thymines. Ce mutant présente une nette atténuation en macrophage. Le milieu intracellulaire

Résultats du blasting des séquences Homologie trouvée.	E-value	Mutants.	Index de compétition.	Infection des macrophages SV40. Atténuation	Ecart-type	Infection des cellules HeLa. Atténuation	Ecart-type	H2O2	pH 5	pH 5,4	pH 7	MM.	LPS.
mosA *Sinorhizobium meliloti* (n° d'accès : Q07607	2e-20	8A8	$3,3\ 10^{-2}$	2,4 log	0,5807	1,7 log	0,0689	+	-	+	+	+	Smooth
cobB *Pseudomonas denitrificans* (n° d'accès :P21632	7e-14	8C7	$4,6\ 10^{-2}$	3,3 log (n= 5)	0,8165	1,8 log	0,2048	+	-	+	+	+	Smooth
M-ring *(fliF)* *Brucella abortus* (n° d'accès : AF019251)	4e-27	9C6	$6,6\ 10^{-2}$	2,6 log (n = 5)	0,6896	2 log	0,2866	+	-	+	+	+	Smooth
rpoA *Agrobacterium tumefaciens* (n° d'accès : 052761)	5e-07	9A3	$1,5\ 10^{-1}$	- 0,5 log	0,1706	1,3 log	0,0646	+	+	+	+	+	Smooth
Putatif transporteur de sucre de type ABC *Pseudomonas putida* (n° d'accès :AAC98811)	3e-09	9A12	$1,05\ 10^{-2}$	2,86 log	1,0477	1,8 log	0,1488	+	-	+	+	+	Smooth
Protéine hypothétique *Campylobacter jejuni* (n° d'accès : CAB75103)	9e-10	8B8	$4,65\ 10^{-3}$	2 log	0,2178	1,6 log	0,3991	+	-	+	+	+	Smooth
Protéine hypothétique *Streptomyces coelicolor* A3(2) (n° d'accès :CAB61311)	2e-10	8B9	$2,5\ 10^{-2}$	2 log	0,1741	2,5 log	0,4598	-	-	-	+	+	Smooth
Pas de résultat		10C5	$1,3\ 10^{-1}$	0,006 log	0,3456	0,4 log	0,3455	+	-	+	+	+	Smooth
Pas de résultat		9H5	$1,85\ 10^{-2}$	1,98 log	0,1801	1,7 log	0,1603	+	-	+	+	+	Smooth
Pas de résultat		9A4	$1,7\ 10^{-2}$	1,99 log	0,5447	2,5 log	0,6719	-	-	-	+	+	Smooth
Pas de résultat		8D7	$1,7\ 10^{-2}$	1,7 log	0,2111	1,9 log	0,1564	+	-	+	+	+	Smooth
		16M	1	0	0,1972	0	0,3783	+	-	+	+	+	Smooth

Table 6 : résultats des caractérisations génotypiques et phénotypique des 11 mutants sélectionnés par la méthode STM. Les trois premières colonnes reprennent les résultats du blasting des séquences bordant le tagged *Mini-Tn5* pour chaque mutant, l'organisme chez lequel l'homologie apparaît, ainsi que la E-value pour chaque homologie trouvée. Les séquences ont été obtenues via les techniques de PCR arbitraire et/ou d'IPCR (Inverse PCR). Les trois colonnes suivantes représentent les atténuations et écarts-type de chaque mutant pour des infections *in vivo* en compétition avec la souche virulente de *B. melitensis* 16M et des infections *in vitro* en macrophages bovins et en cellules HeLa. Ces résultats sont à comparer avec ceux obtenus pour la 16M. Les résultats des tests d'inhibition de croissance en présence d'H_2O_2, de croissance à différents pH et sur milieu minimum (MM) sont représentés sous forme de « + » pour les souches qui poussent et sous forme de « - » pour les souches qui ne poussent pas. Ces résultats sont également à comparer avec ceux de la 16M. Enfin, la colonne LPS indique le phénotype obtenu pour chaque mutant et la 16M suite au test de coloration au cristal violet.

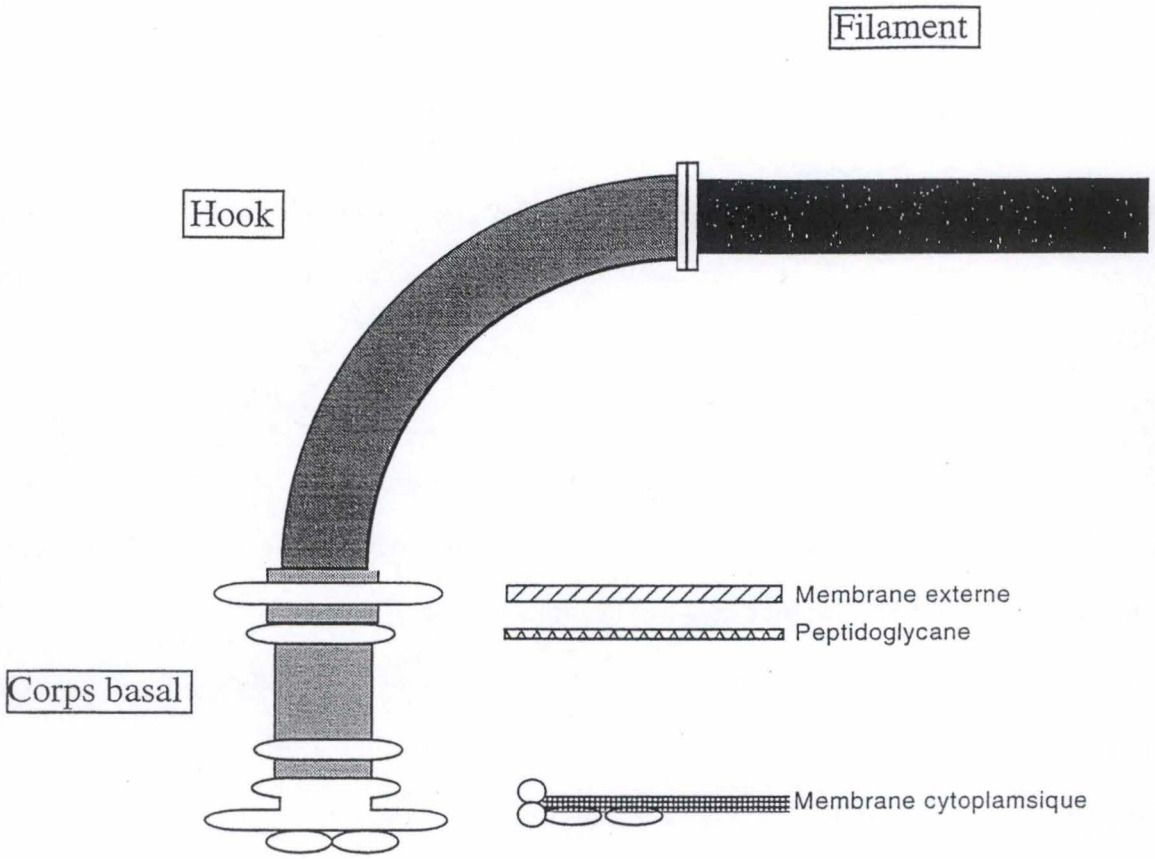


Fig 3.7 : représentation schématique de la structure du système flagellaire chez *E. coli* et structure supposée chez *B. abortus*.

du macrophage est pauvre en vitamine B12 étant donné que le macrophage infecté produit une protéine liant la vitamine B12 (Joiner *et al.*, 1989) on peut donc comprendre que notre mutant ait des difficultés à survivre et à se multiplier en macrophage. R-M Delrue (en cours de thèse) a pu mettre en évidence l'atténuation en cellules HeLa d'un mutant pour un récepteur de la vitamine B12. Ces deux résultats semblent paradoxaux, on peut en effet se demander pourquoi *Brucella* qui semble capable de synthétiser la vitamine B12 aurait en plus besoin en cellule HeLa d'un récepteur pour cette molécule. Cependant il n'y pas d'évidence expérimentale que cette protéine soit effectivement un récepteur à la vitamine B12. En conclusion, ces résultats suggèrent que la vitamine B12 est un composé essentiel à la survie intracellulaire de *B. melitensis* 16M et que sa niche de réplication en est dépourvue.

3) Le mutant 9C6.

Le mutant 9C6 est disrupté dans le gène *fliF*. Chez *E. coli,* le gène *fliF* ainsi que d'autres gènes, intervient dans l'édification du système flagellaire. L'ultrastructure du flagelle chez *E. coli* est composée de trois parties; le corps basal ancré dans les enveloppes et dont fait partie le MS-ring (codé par *fliF*), le coude (codé par *flgE*) et le filament composé d'un polymère de flagelline (codé par *fliC*) (fig 3.7).

Brucella avait jusqu'à présent toujours été décrite comme immobile, mais la découverte récente de gènes de systèmes flagellaires chez *B. abortus* remet en cause cette observation (Halling, 1998). Chez *Brucella*, 16 gènes homologues à des gènes de système flagellaire sont actuellement connus.

D. Fretin (en cours de thèse), a d'ores et déja pu mettre en évidence la transcription du gène *fliC in vitro*. Le fait qu'un de nos mutants soit atténué de façon significative dans les trois modèles d'infection et que le gène disrupté soit le gène du MS-ring de *Brucella* renforce l'hypothèse selon laquelle ce facteur est important pour la virulence de *Brucella*. Etant donné que les sous-unités permettant l'assemblage du corps basal du flagelle présentent un haut degré d'homologie avec les sous-unités qui constituent la partie trans-membranaire du

Table 1. Recognition of heterologous secretion substrates by type III machines[a,b]

Secretion substrate	Type III machine			
	Yersinia spp.	*Salmonella typhimurium*	*Erwinia chrysanthemi*	*Xanthomonas campestris*
Yersinia spp. YopE	+	+[c]	+	+
Yersinia spp. YopQ	+	ND	+	ND
Shigella flexneri IpaB	+[c]	ND	ND	ND
Pseudomonas aeruginosa PopB	+	ND	ND	ND
P. aeruginosa PopD	+	ND	ND	ND
P. aeruginosa ExoS	+	ND	ND	ND
Pseudomonas syringae AvrB	+	ND	+	ND
P. syringae AvrPto	+	ND	+	ND
Ralstonia solanacearum PopA	ND	ND	ND	+

[a]Abbreviation: ND, not determined.
[b]Expressed proteins are secreted into the extracellular medium.
[c]Chaperone dependent.

Table 7 : Exemple de sécrétion hétérologue de différentes toxiques par des appareils de sécrétions de type III de diverses familles bactériennes (Cheng et Scneewind,, 2000).

système de sécrétion de type III (Macnab, 1996), on pourrait émettre l'hypothèse que le gène *fliF* soit impliqué dans la formation d'un appareil de sécrétion.

Chez *Yersinia*, il a été démontré que le système flagellaire pouvait aussi servir à la sécrétion d'une phospholipase intervenant dans la virulence de la bactérie (Young *et al.*, 1999). Ces informations étant connues, il serait intéressant de savoir si ce que nous avons identifié chez *Brucella* comme étant un gène de système flagellaire ne serait pas plutôt un gène codant pour la structure basale d'un système de sécrétion.

Par exemple le système de sécrétion de type III de *Yersinia* permet, entre autres, la sécrétion de l'effecteur YopE ayant un effet cytotoxique sur les cellules eucaryotes. La protéine YopE de *Yersinia* peut également être sécrétée par des systèmes de sécrétion de type III hétérologues, c'est-à-dire par d'autres espèces bactériennes (*S. typhimurium, E. chrysanthemis* et *X. campestris*) (Rossier *et al.*, 1999) (table 7).

Afin de savoir si FliF ne ferait pas partie d'un système de sécrétion de type III, il serait relativement aisé de transformer la souche de *Brucella* mutante pour FliF ainsi que la souche sauvage avec un plasmide portant l'effecteur YopE et sa chaperonne SycE. YopE étant cytotoxique, il serait alors aisé de voir si *Brucella* est capable de sécréter cette protéine lorsqu'elle est en intracellulaire. Une incapacité du mutant FliF a sécréter YopE constituerait une évidence claire du rôle de FliF dans un système de sécrétion.

4) Le mutant 9A3.

Chez le mutant 9A3 les résultats de séquençage ont donné une homologie avec la partie 3'terminale du gène *rpoA* de *Agrobacterium tumefaciens* et ce avec un pourcentage d'identité au niveau des acides nucléiques de 86 %.

Le gène *rpoA* code pour un la sous-unité α de l'ARN polymérase. L'ARN polymérase est une holoenzyme dont le cœur est constitué de 4 polypeptides: 2 sous-unités α, une sous-unité β et une sous-unité β' (pour review voir Chuen et Busby, 1998). A ces sous-unités s'ajoute le facteur σ permettant la reconnaissance spécifique des promoteurs des gènes à transcrire. Il

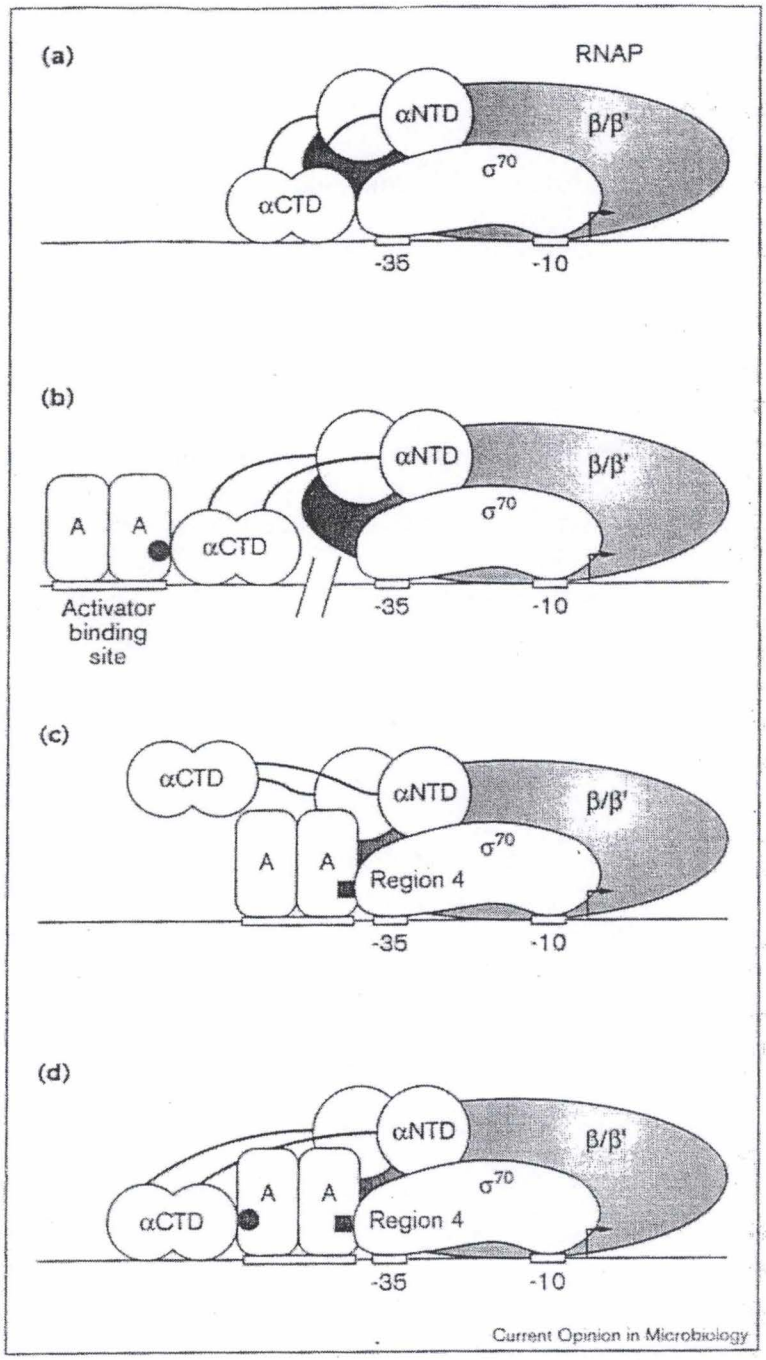


Figure 6 : Représentation des différents mode d'interaction de la sous-unité α avec les éléments cis et trans. En a) la sous-unité n'interagit qu'avec les éléments cis. En B et en D, la sous-unité interagit avec des éléments cis et trans. En C la sous-unité n'intervient pas dans la régulation de la transcription. Le modèle proposé pour la transcription de l'opéron *vir* chez *Agrobacterium* est de type B ou D (Rhodius et Busby, 1998).

existe divers facteurs σ reconnaissant divers promoteurs. De toute évidence, le facteur α est essentiel à la formation d'une holoenzyme fonctionnelle. Une analyse détaillée du site d'intégration du transposon montre que celui-ci se serait intégré à l'extrémité 3' terminale du gène *rpoA*, suggérant que la protéine RpoA pourrait être présente sous une forme tronquée de sa partie C-terminale. On sait que chez *E. coli,* la partie C-terminale de la sous-unité α est dispensable, alors que la partie N-terminale est elle indispensable a l'assemblage de l'ARN polymérase. La partie C-terminale est impliquée dans la reconnaissance des promoteurs via une interaction avec l'ADN (séquence Upstream) ou via l'interaction avec des régulateurs transcriptionels (fig. 6). Ceci suggère que le contrôle transcriptionel du mutant 9A3 pourrait être dérégulé. Il est intéressant de noter que chez *A. tumefaciens*, la sous-unité α de la RNA polymérase joue un rôle essentiel dans l'activation de la transcription de l'opéron *Vir* (encodant le système de sécrétion de type IV) via une interaction avec le régulateur transcriptionel VirG (Lohrke *et al.*, 1999). Il a aussi été suggéré que la sous-unité α reconnaît également des séquences amonts (Upstram element) riche en A-T. Le système de type IV de *Brucella* est fortement homologue à celui de *A. tumefaciens*. Une analyse du promoteur de l'opéron *Vir* chez *Brucella* montre un taux de A-T anormalement plus élévé (67%) que le taux d'A-T du reste du génome (42%). Ceci ainsi que le phénotype observé pour ce mutant pourrait suggérer un rôle de la sous-unité α dans la régulation de l'activation de la transcription de l'opéron *Vir*.

Cependant, de nombreux régulateurs transcriptionels sont connus pour interagir avec RpoA et donc le phénotype observé pourrait être du à une dérégulation globale du mutant 9A3.

Afin de montrer que la sous-unité α est aussi impliquée dans la régulation de l'opéron *Vir* chez *Brucella*, une première approche serait de vérifier l'expression de cet opéron chez notre mutant par Northern blot. Une fusion transcriptionelle entre l'opéron *Vir* et un gène rapporteur pourrait également permettre d'investiguer le rôle de RpoA dans le contrôle transcriptionnel de cet opéron. Enfin , le clonage du gène *rpoA* pourrait permettre de trouver

des interacteurs (c'est-à-dire des régulateurs transcriptionels) via un criblage double-hybride, par exemple.

5) Le mutant 9A12.

Chez le mutant 9A12 le gène disrupté par le transposon présente une homologie avec un transporteur de type ABC de *Pseudomonas putida*.

Les transports à travers la membrane interne est une étape importante pour la nutrition bactérienne. Chez *Agrobacterium tumefasciens* qui comme *Brucella* fait partie de la sous-classe $\alpha 2$ des protéobactériacées, un transporteur de sucre de type ABC a également été décrit comme étant important pour la virulence et l'adhérence de la bactérie lors de son cycle infectieux (Kemner *et al.*, 1997 ; Matthysse *et al.*, 1996). De même, chez *S. meliloti*, un système de transport phosphate de type ABC est requis pour l'invasion du nodule et la fixation du nitrogène (Bardin *et al.*, 1996). Parmis 20 mutants sélectionnés par STM, P. Lestrate a également identifié deux mutants de *B. melitensis* présentant des homologies avec des gènes codant pour des protéines ABC transporter-like. La vacuole phagolysosomial étant pauvre en nutriment on comprend aisément que des mutants dans ce type de protéine aient du mal à s'y répliquer.

6) Le mutant 8B8 et 8B9 et 9A4.

Chez les mutants 8B8 et 8B9 les gènes disruptés par le transposon présentent des homologies avec des protéines hypothétiques et de fonctions inconnues chez *Campylobacter jejuni* et *Streptomyces coelicolor* A2(2) respectivement. Le rôle exact de ces protéines reste donc à investiguer.

Les mutants 8B9 et 9A4 présentent une sensibilité accrue aux stress oxydatifs et acides. Ces résultats suggèrent qu'ils seraient affectés dans un système général de résistance aux stress.

7) Le mutant 10C5.

Ce mutant pourrait être un faux positif détecté lors de la sélection via la méthode STM étant donné qu'il ne présente qu'une faible atténuation *in vivo* et pas d'atténuation *in vitro*. Cependant, il se pourrait que le gène disrupté par le transposon encode un produit intervenant dans la résistance aux facteurs sériques. Ce qui expliquerait donc l'atténuation observée uniquement *in vivo*.

4. Conclusions et Perspectives.

Le crible effectué via la méthode STM sur trois pools de 96 mutants nous a permis de sélectionner 11 mutants semblant être atténués *in vivo*. L'atténuation *in vivo* de ces 11 mutants a ensuite été confirmée et quantifiée. *Brucella* se distinguant par sa capacité à survivre et à se multiplier dans les cellules phagocytaires professionnelles et non professionnelles, nous avons testé *in vitro* les atténuations de chaque mutant dans ces deux types de cellules. Au terme de ces infections, seul le mutant 10C5 ne présentait aucune atténuation dans les deux types cellulaire. Le mutant 9A3 quant à lui n'était pas atténué en macrophage. Tous les autres mutants présentaient des atténuations variables selon le type de cellule avec des valeurs variant de 1 à 3 log et avec des atténuations généralement plus marquées en macrophage qu'en cellule HeLa (table 6). Ces résultats démontrent une fois de plus que la survie intra-cellulaire est une composante clef de la pathogénie de *Brucella*. La résistance de nos mutants aux stress oxydatifs et acides a également été analysée. Ces conditions des tests ont été crées afin de mimer l'environement rencontré par *Brucella* lors de son entrée en cellule phagocytaire. Ces tests nous ont permis de sélectionner trois mutants présentant de nettes différences par rapport à la souche sauvage de *B. melitensis* 16M, les mutants 8B9 et 9A4 présentaient une réduction de leurs capacités de résistance à ces conditions de stress tandis que le mutant 9A3 présentait une capacité accrue de résistance à ces conditions. Tous nos mutants poussaient sur milieu minimum indiquant ainsi qu'ils ne sont pas auxotrophes, La coloration au cristal violet nous a permis de mettre évidence le caractère lisse de tous nos mutants.

Afin d'identifier les gènes disruptés par le transposon de nos mutants, nous avons utilisé deux techniques (PCR arbitraire et IPCR) nous permettant d'amplifier spécifiquement les fragments d'ADN adjacents aux tagged mini-Tn*5*. L'analyse des séquences nous a permis sur base d'homologie de distinguer 4 classes de gènes.

Les gènes semblant être des facteurs de « virulence au sens strict », tels que le gène *mosA* de *S. meliloti* et le gène *fliF* de *B. abortus.*

Des gènes intervenant dans le métabolisme de *Brucella* tels qu'une synthétase nécessaire à la voie de biosynthèse de la cobalamine et un transporteur putatif de sucre de type ABC.

Un gène intervenant dans la régulation transcriptionnelle.

Des protéines de fonction inconnue intervenant très probablement dans la résistance de *Brucella* aux stress oxydatifs et acides.

Les gènes identifiés lors de ce crible n'avaient à ce jour jamais été identifiés chez *Brucella.* Aucun facteur de virulence déjà connu chez *Brucella* tel que l'opéron Vir ou la chaîne O du LPS n'a été retrouvé dans cette étude, ni dans celle de P. Lestrate. De même, nous n'avons jamais retrouvé deux fois le même mutant (pas de Hot Spot de transposition), ces informations indiquent que le crible n'est pas saturant. Cependant, on peut aussi penser que les conditions du crible (injection en IP et 5 jours d'incubation) puissent ne pas être adéquat pour retrouver les gènes de virulence déjà décrit dans la littérature. Enfin, on notera que la méthode a permis l'identification de mutants peu atténués prouvant ainsi la grande sensibilité de la méthode.

En conclusion, l'approche STM en conjonction avec les divers tests *in vitro*, nous a fourni des informations concernant le métabolisme de *Brucella* en fonction de son environement cellulaire. La découverte des gènes *mosA* et *fliF* chez *Brucella* ouvre également de nouvelles perspectives quant à la compréhension des mécanismes de virulence de ce pathogène.

Quelles peuvent être les suites de ce travail ?

Tout d'abord, il serait intéressant de continuer et terminer le crible de la banque de mutants transpositionnels. Ceci afin d'identifier de nouveaux gènes ayant un rôle à jouer dans la virulence et ainsi de peut-être pouvoir faire des liens avec les gènes déjà identifiés.

Les infections pour le crible par STM ont toujours été réalisées par voie d'infection en intra péritonéale, il pourrait se révéler très intéressant de refaire ces cribles en infectant les animaux

soit par voie gastrique ou soit par voie muquosale. Ceci permettrait d'identifier des mutants atténués dans leur capacité à effectuer les premières étapes de leur cycle infectieux, à savoir l'adhérence et la pénétration des muqueuses.

Les mutants déjà identifiés devraient être caractérisés plus en profondeur afin de s'assurer que ce qui a été observé comme étant l'effet de la disruption du gène n'est pas plutôt un effet polaire dû au transposon. Pour cela la construction de mutants propres et des expériences de complémentation seraient nécessaires.

Finalement, il serait également très instructif d'analyser et de comparer la virulence résiduelle de nos mutants par rapport à la virulence résiduelle des souches vaccinales existantes. Si ces analyses se révélaient être concluantes (c'est-à-dire si la virulence résiduelle du mutant était inférieure ou égale à la valeur observée pour la souche vaccinale), on pourrait alors étudier la protection conférée par ce mutant dans un modèle souris et peut-être par la suite élargir le champ d'investigation du mutant candidat à la vaccination chez d'autres espèces animal cible d'une infection par *Brucella*.

5.Matériel et méthodes.

5.1Types de milieu utilisés pour la culture bactérienne.

Milieu 2YT :-NaCl 0,5 g/100 ml
-Yeast extract (GIBCO BRL) 1 g/100 ml
-Hydrolysat de caséine (Peptone GIBCO BRL) 1 g/100 ml
-Agar 2 g/100 ml si l'on désire du 2YT solide.
Le milieu est autoclavé 20 minutes à 120 c°.

Milieu LB :-NaCl 0,5 g/100 ml
-Yeast extract 0,5g/100 ml
-Hydrolysat de caséine (peptone) 1 g/100 ml
-Agar 2 g/100 ml si l'on désire du LB solide.
Le milieu est autoclavé 20 minutes à 120 c°.

Milieu minimum pour Brucella :-Chloride de Sodium 7,5 g
-Dipotassium phosphate 10 g
-Thiosulfate de Sodium 0,1 g
-Glycérol 80 g
-Acide lactique 5 g
-Acide L-glutamique 1,5 g
- composé 1 (Métaux) 1 ml
-Composé 2 (vitamines) 1 ml
-Composé 3 (Biotine) 1 ml
Ajuster le pH à 6,8-7,0 et stériliser le milieu par filtration

Composé 1 :-$MgCl_2.6H_2O$ 8,330 g
-$FeSO_4.7H_2O$ 0,050 g
-$MnCl_2.4H_2O$ 0,040 g
-Ca pantothenate 0,004 g

Composé 2 :-Thiamine HCl 20 mg
-Acide nicotinamique 20 mg

Composé 3 :-Biotine 0,01 mg

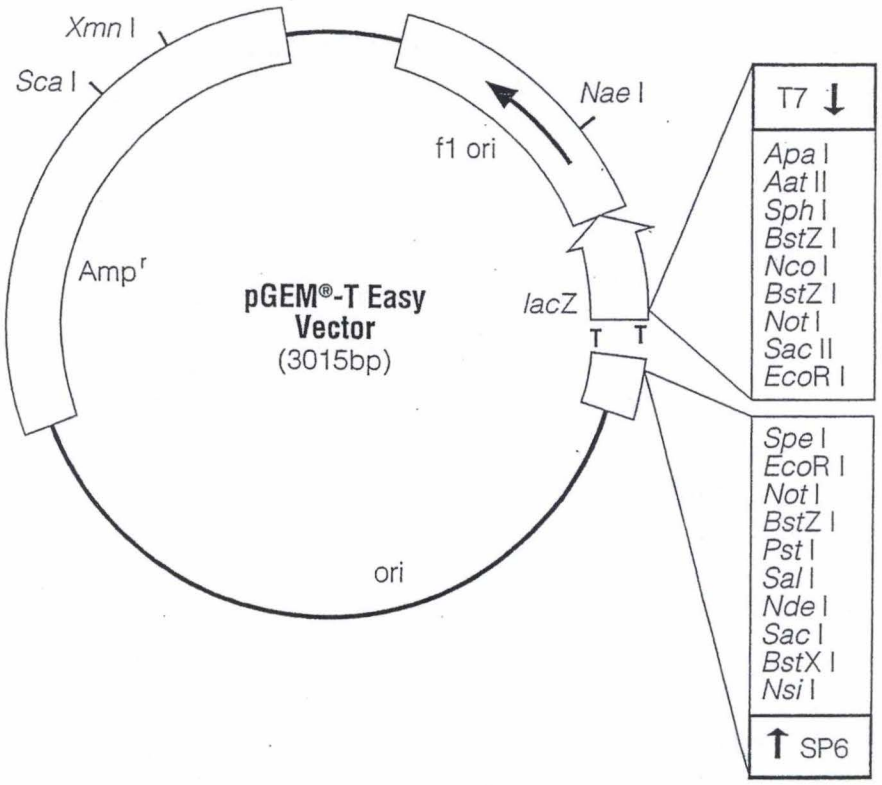


Figure 5.**1** : Le vecteur p-GEM-T Easy (Promega)

Faire 100 ml de chacune de ces solutions et les congeler à – 80 C° par aliquots de 1 ml

Antibiotiques :-Kanamycine (Kan) 0,1 g/1 ml d'eau bidistillée

-Ampicilline (Amp) 0,1 g/1 ml d'eau bidistillée

-Gentamycine (Gent) 0,1 g/1 ml d'eau bidistillée

Les antibiotiques sont stérilisés par filtration et dilués 1000X dans les milieux de culture à partir de ces solutions stock.

Additifs :- 5-bromo,4-chloro,3indolyl-b-D-galactopironomide (X-gal) 20 ng/ml

- Isopropyl-b-D-thiogalactoside (IPTG) 0,2 g/ml

Les additifs sont dilués 1000X dans les milieux de culture à partir de ces solution stok.

5.2 Souches bactériennes et plasmides.

Souches bactériennes :

g) *E.coli* DH10B.

Cette souche présente le génotype suivant : F⁻*mcrA* Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC)ϕ 80d*lacZ*ΔM15 Δ*lac*X74 *deo*R recA1 *end*A1 *ara*D139 d(*ara, leu*)7697 *gal*U *gal*K λ⁻ *rps*L *nup*G

η) *E.coli* DH5α.

Cette souche présente le génotype suivant : F⁻ ϕ80d*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169 *deo*R *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17(r_k^-, m_k^-) *pho*A *sup*E44 λ- *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1

i) Souche de *Brucella melitensis* 16M Nal^R (Verger *et al.*, 1993)

j) La banque transpositionelle Tagged mini-Tn*5* de *Brucella melitensis* 16M (Lestrate *et al.*, 2000)

Plasmide :-pGEMT-easy

Le plasmide pGEM-T eazy (promega) (figure5.1) est un vecteur linéarisé dérivé du plasmide pGEM-5Zf(+) et présente les caractéristiques suivants :

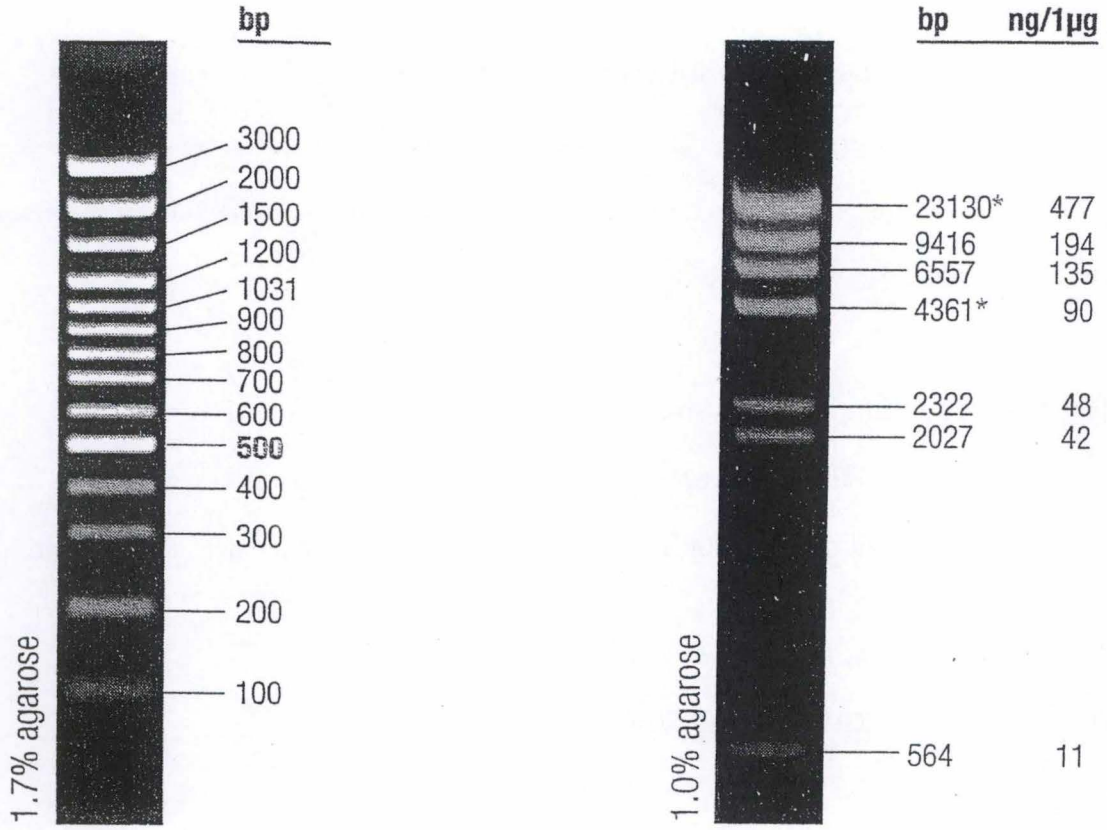


Figure 5.2 : Les marqueurs de poids moléculaire λ/*Hind*III (à droite) et 100 pb (à gauche)

-Il possède une origine de réplication phagique, f1 ori, permettant le maintien de ce plasmide dans *E. coli.*
-Il possède le gène de résistance à l'ampicilline (*bla*), ce qui permet la sélection des bactéries contenant ce plasmide.
-Il porte un site multiple de clonage (MCS) comprenant des sites de restriction uniques pour le clonage. La particularité de ce plasmide est que le MCS est ouvert et que chaque extrémité 3' possède une thymine protrudante (Fig 5.1).
-Une Thymine a été ajoutée chimiquement a chaque extrémité 3'-OH

5.3 Les manipulations en biomoléculaire

5.3a Electrophorèse en gel d'agarose.

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser sera donc inversément proportionnel à la taille des fragments à séparer.

La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Nous avons utilisé comme marqueurs de taille: l'ADN du phage coupé par *Hin*d III ainsi que le marqueur 100 pb (figure 5.2) .
Les fragments sont alors visualisés au moyen du bromure d'éthidium (BrEth) . Celui-ci se lie à l'ADN bicaténaire en s'intercalant entre les bases de la double hélice. Le BrEth est fluorescent, il marque l'ADN qui devient visible sous illumination UV. Il faut cependant noter que la fluorescence est proportionnelle à la taille du fragment, mais aussi à la quantité d'ADN présente. Ainsi, en connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de taille, on peut estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison de l'intensité de la fluorescence.

Solutions, tampons et fournitures :
-Solution de bromure d'éthidium: 2 mg/ml.
-Solution d'alourdisseur:
sucrose 50%
EDTA 100 mM
SDS 1%
Bleu de bromophénol 0.1%
-Tampon TAE (50 fois concentré)
Tris-HCl, pH 8.0, 40 mM
EDTA 2 mM
Acide acétique glacial 0,1M

Protocole

-Porter à ébulition un volume approprié de tampon TAE additionné d'agarose, jusqu'à obtention d'une solution limpide.

-Quand la solution est refroidie (aux environs de 50°), ajouter 2 µl de BrEth (2 mg/ml), et la couler sur le support *ad hoc* muni d'un peigne.

-Immerger le gel dans une cuve d'électrophorèse remplie de TAE, auquel on a ajouté quelques µl d'une solution de bromure d'éthidium.

-Déposer les échantillons dans les puits et effectuer la migration au voltage désiré.

-Visualiser le gel sous UV (transilluminateur longueur d'onde à 302 nm).

5.3b Purification de bandes d'ADN extraites d'un gel d'agarose.

Les extractions d'ADN à partir de gel d'agarose ont été effectué à l'aide du « Gel extraction kit »(Quiagen).

-Après migration, placer le gel d'agarose sur le banc UV

- Au moyen d'une lame de scalpel extraire la bande d'intérêt et le mettre dans un éppendorf propre préalablement pesé

- Peser le morceau de gel et ajouter 3 volumes de tampon QG

- Faire fondre la préparation 10 min. à 50 C°, vortexer et vérifier que la solution est au bon pH.

- Ajouter un volume d'isopropanol et mélanger en inversant 10 X

- Placer une colonne du kit sur un tube collecteur de 2 ml

- Verser la solution sur la colonne et centrifuger 1 min.

- Eliminer le liquide et replacer la colonne sur le même tube

-Laver la colonne avec 750 µl de tampon PE et centrifuger 1 min.

-Placer la colonne sur un éppendorf propre

-Eluer l'ADN avec 30 µl d'H_2O bi-distillée et centrifuger 1 min. à vitesse maximum

- Vérification par running sur gel d'agarose 1%, charger 10 µl

5.3c Extraction d'ADN génomique.

Tampon de lyse cellulaire:

-Tris EDTA	567 µl
-Protéinase K (20 ng/ml)	3 µl
-SDS 10 %	30 µl

Protocole :

-A partir d'un isolement, lancer une pré-culture des mutants *Brucella* dans 5 ml de 2YT liquide.
-Laisser pousser 48 heures.
-Prélever 1 ml de la préculture dans un eppendorf et centrifuger 10 minutes à 4000 rpm, éliminer le surnageant.

Lyse des cellules :
-Resuspendre le culot dans 600 µl du tampon de lyse et laisser l'échantillon sous agitation 1 heure à 37 c°.
-Ajouter 80 µl de C-TAB (bromure de cétyltriméthylammonium) préalablement chauffé à 80 c° (pour capter les LPS bactériens) ainsi que 100 µl de NaCl 5M qui précipite l'ADN. Le tout sera chauffé 10 minutes à 80 c°.
-Laver 2 fois avec un volume de chloroforme, centrifuger 7 min. à 10000 rpm et récupérer le surnageant.
-Laver 2 fois avec 1 volume de Phénol-chloroforme, vortexer, centrifuger 15 minutes à 14000 rpm et récupérer la phase du haut.
-Précipitation de l'ADN à l'isopropanol : ajouter un volume d'isopropanol et mélanger doucement, centrifuger 15 minutes à 14000 rpm et éliminer le surnageant.
-Laver le culot à l'éthanol froid 70%. Vider le surnageant au moyen d'une pipette en prenant soin de ne pas éliminer le culot.
-Sécher le culot 2 à 3 minutes sous une cloche à vide et resuspendre dans 100 ou 200 µl d'eau bidistillée + 1 µl de RNAse à la concentration de 100 µg/ml.
-Vérification : running sur gel d'agar 0,8% , charger 10 µl de l'échantillon additionnés de 1 µl de bleu de bromophénol, charger le marqueur de poids moléculaire Lambda/HindIII.

5. 3d Restrictions.

Le clivage de l'ADN bicaténaire en des sites précis s'effectue via l'emploi d'endonucléases de restriction qui reconnaissent de courtes séquences d'ADN. En pratique, la réaction se fait par incubation de l'ADN avec l'enzyme de restriction choisie en fonction des résultats souhaités.
Par restriction (*Eco*RI et *Eco*RV), il faut :

-Une quantité *ad hoc* d'ADN à restreindre en suspension dans de l'eau distillée.
-Le tampon de restriction 10X concentré propre à l'enzyme utilisée, dans une quantité correspondant à un dixième du volume final (tampon commercial fourni avec l'enzyme).
-L'enzyme de restriction : au maximum un dixième du volume final, et entre 2 à 10 unités d'enzyme par µg d'ADN (en fonction de la pureté de l'ADN et du nombre de sites presents dans l'ADN cible).
-Eau distillée stérile pour atteindre le volume final.
-Incuber le mélange de restriction une heure à la température de requise (peut varier d'une enzyme à l'autre).

Note : pour l'ADN génomique restreint au moyen de l'enzyme *Eco*RV concentrée, l'enzyme est à une concentration de 40 unités. On utilise en général 40 unités par µg d'ADN génomique à restreindre.

5.3e Ligations avec la ligase T4.

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

Protocole:
-Dans un eppendorf, placer un mélange des deux fragments à liguer dans un rapport de 3 à 5 insert par vecteur.
-Ajouter 1 µl d'ADN ligase T4 (8U/µl, Roche).
-Ajouter 1/10 du volume total de tampon de ligation (10x, Roche).
-Compléter avec de l'eau distillée stérile.
-Incuber à 14-16°C pendant 10 à 14 heures si la coupure est blunt et à 4 C° dans la cas de coupures protrudantes.
-Conserver le mélange de ligation à -20°C.

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 par là-même incapables de transformer les *E. coli* compétentes. Les colonies apparues sur milieu sélectif après transformation s'explique par la présence de vecteur non-restreint; ce témoin permet d'évaluer la proportion des transformants dus aux vecteurs non restreints.
-Un vecteur restreint soumis à l'action de la ligase, il permet de vérifier l'efficacité de la ligase.

5. 3f Cellules CaCl2 compétentes.

La transformation de bactéries compétentes consiste à faire entrer de l'ADN exogène (plasmide) dans le microorganisme. A cette fin, la paroi et la membrane bactérienne doivent être perméables à l'ADN: la bactérie est alors dite compétente.

Des bactéries gram-négatives *E. coli* en début de phase exponentielle de croissance sont rendues artificiellement compétentes par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium. Celui-ci déstabilise la paroi de la bactérie, qui gonfle alors en prenant l'aspect d'un sphéroplaste. L'ADN plasmidique ajouté forme avec le calcium un complexe résistant aux désoxyribonucléases. Ce complexe est supposé adhérer à la bactérie. Les bactéries sont soumises à un choc thermique qui permet au complexe de rentrer dans la cellule.

Un temps d'incubation en milieu riche non sélectif permet aux bactéries de régénérer une paroi normale et aux gènes de résistance introduits de s'exprimer. Les transformants sont isolés par culture sur boîtes de milieu sélectif contenant l'antibiotique dont le gène de résistance est apporté par le plasmide.

Préparation de cellules *E. coli* DH5a RbCl compétentes

Solution :

TFB I :

Acetate de K : 30 mM

RbCl : 100 mM

$CaCl_2$: 10 mM

$MnCl_2$: 50 mM

Glycerol : 15%

Ajuster à pH 5,8 avec de l'acide acetique 0,2M.

Stériliser par filtration

TFB II :

MES (acide morpholino ethanosulfonique): 10 mM

RbCl : 10 mM

$CaCl_2$: 75 mM

Glycerol : 15%

Ajuster à pH 6,5 avec du KOH 1 M.

Stériliser par filtration.

Protocole :

-Cultiver de la souche d'*E. coli* DH5a à 37°C sur milieu solide LB

-A partir d'une de ces colonies, ensemencer 5 ml de LB. Agiter fortement la préculture à 37°C pendant la nuit.

-Ensemencer 50 ml de LB. Incuber à 37°C sous agitation jusqu'à une absorbance entre 0,4 et 0,6 à 550 nm (début de phase de croissance exponentielle).

-Arrêter la croissance dans la glace pendant 10 minutes et ransférer la culture dans un falcon froid.
-Centrifuger la culture 10 minutes à 4200 rpm à 4°C (JOUAN). Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 20 ml de TFB1 froid
-Repos 5 min. sur glace et centrifuger 10 min. à 4200 rpm.
-Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 2 ml de TFB2 froid.
-Aliquoter la suspension en eppendorfs et stocker à -80°C.

5. 3g Transformation des cellules compétentes

-A 100 µl de cellules compétentes, ajouter 10 µl de mélange de ligation ou 10 à 100 ng d'ADN plasmidique.
-Déposer 30 minutes sur glace.
-Choc thermique : 45 sec. à 37C°.
-45 sec. sur glace
-Ajouter 250 µl de LB liquide.
-Incuber 30 min. à 1 heure à 37°C.
-Etaler sur boîtes de milieu sélectif et incuber une nuit à 37°C.

Témoins de transformation:
-Transformer des bactéries avec un vecteur non-restreint afin de vérifier la compétence des cellules.
-Cellules compétentes subissant les conditions de transformation mais sans ADN, étalées sur:
-Milieu riche non sélectif comme contrôle de viabilité des cellules compétentes.
-Milieu sélectif pour tester la validité de ce milieu et évaluer la proportion de mutants spontanés résistants à l'antibiotique.

5. 3h Minipréparation d'ADN plasmidique

Tampon P1:
-Tris 50 mM
-EDTA 10 mM
-pH 8 et concerver à 4 C°

Tampon P2:
-NaOH 200 mM
-SDS 1 %
-Concerver à température ambiante.

Tampon P3:

-Kac 3M

-pH 4 et concerver à 4 C°.

Protocole :

-Stérilement, lancer une préculture du clone transformant dans 5 ml de LB (+ antibiotique si nécessaire) et laisser pousser overnight sous agitation à 37 c°.

-Prélever 1,5 ml de la préculture dans un eppendorf propre et centrifuger 5 minutes à 14000 rpm.Vider le surnageant.

-Resuspendre le culot dans 300µl du tampon P1.

-Ajouter 300 µl du tampon P2, mélanger en inversant 10 x et repos 5 minutes sur table à température ambiante.

-Ajouter 300 µl du tampon P3 et repos 5 minutes sur glace.

-Centrifuger 15 minutes à 14000rpm et récupérer le surnageant.

-Laver une fois au Phénol-chloroforme.

-Précipitation avec 640 µl d'isopropanol, vortexer et repos 20 minutes sur table.

-Centrifuger 15 minutes à 14000 rpm et à 4 c°, éliminer le surnageant.

-Laver le culot à l'ethanol froid 70 %.

-Sècher 2 à 3 minutes sous une cloche à vide.

-Resuspendre le culot dans 30 µl d'eau bidistillée + 1 µl de RNAse (100 mg/ml).

-30 minutes à 37 c°.

-Restriction diagnostique et dépôt sur gel d'agar 0,8%.

5. 3i Southern blot

Le "Southern blotting" est une technique très performante utilisée pour détecter la présence d'une séquence particulière d'ADN. Cette technique possède de multiples applications mais a été utilisée dans le cadre de ce travail pour détecter la présence du mini Tn5 Km Kan dans le génome des clones potentiellement avirulents.

Cet outil d'analyse repose sur huit étapes: l'extraction de l'ADN génômique des clones d'intérêt, restriction et migration de l'ADN génomique sur gel d'agarose, transfert de l'ADN sur une membrane de nylon, ajout et hybridation à la membrane de nylon d'une sonde d'ADN spécifique pour le gène *kan*, réaction de détection de la sonde hybridée et révélation par autoradiographie.

Marquage de la sonde

Le fragment d'ADN utilisé comme sonde est dénaturé et mis en présence d'hexanucléotides aléatoires.Une synthése d'ADN est initié par la polymérase Klenow, en incorporant des nucléotides dont un est lié à DIG (digoxigenine)
La sonde est réalisée en utilisant le Dig high Prime labeling reaction (Roche).

-Environ 1 µg d'ADN est porté à un volume finale de 16 µl avec de l'eau stérile.
-Faire bouillir pendant 10 min. et ensuite conserver sur glace.
-Ajouter 4 µl du mélange DIG High Prime, mélanger et centrifuger birèvement.
-Incuber de 1 à 20 heures à 37 °C.
-Stopper la réaction par addition de 2 µl EDTA 0,2 M pH 8 et/ou en chauffant 10 min. à 65°c.

Electrophorèse en gel d'agarose

La séparation des fragments d'ADN restreint se fait en gel d'agarose de 0,8 %. Un marqueur de taille marqué avec la molécule DIG (Roche) a été utilisé.

Transfert et immobilisation

Après avoir séparé les fragments d'ADN sur gel d'agarose, on transfère les acides nucléiques sur une membrane de nylon chargée positivement (Hybond N+, Amersham).

Méthode

-Après l'électrophorèse, placer le gel d'agarose sous UV (302 nm) pendant 3 à 5 minutes. Les UV clivent l'ADN et facilitent ainsi le transfert.

-Immerger le gel dans la solution de dénaturation pendant 5 minutes.

-Immerger le gel dans la solution de neutralisation pendant 2x15 minutes.

-Découper un morceau de membrane de nylon Tropilon-Plus chargée positivement (TROPIX) de taille un peu supérieure à celle du gel et un morceau de papier Whatman.

-Par un système de transfert sous vide, l'ADN est transféré sur la membrane en présence de SSC 10X pendant 1 heure. Suivre le schéma ci-contre utilisant le système de transfert Hybrid vacuum blotter.

-Après le transfert, sécher la membrane entre deux feuilles de papier Whatman 3 MM.

-Immobiliser l'ADN sur la membrane, en l'exposant aux UV pendant 5 secondes.

Hybridation

Après avoir fixé l'ADN transféré sur la membrane et marqué la sonde, il faut hybrider la sonde aux fragments d'ADN de la membrane. Le protocole qui a été utilisé est le suivant:

- Préhybrider la membrane pendant 30min. à 65°c. dans la solution DIG Easy Hyb (Roche).

-Dénaturer la sonde en la plaçant dans de l'eau bouillante pendant 5 minutes.

-Centrifuger et la placer dans de la glace.

-Ajouter la sonde à la solution de préhybridation de l'hybritube et mélanger en inversant l'hybritube.

- Incuber à 68°C pendant une nuit.

Détection et révélation

La détection comprend une étape de saturation, une incubation avec l'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alkaline et une réaction finale de chémoluminescence. Le CSDP-Ready-to-use (Roche) est transformé en un produit responsable de l'émission locale de lumière qui peut impressionner un film RX.

Méthode

-Récupérer la solution de préhybridation contenant la sonde et la stocker à –20°C.
-Laver la membrane à température ambiante, 2x 5 min. dans une solution SSC 2X, SDS 0,1%.
-Immerger la membrane à 65°c, 2 x 15 min. dans une solution SSC 0,1X, SDS 0,1%

-Rincer la membrane dans la solution de lavage, pendant 1 à 5 minutes
-Saturer la membrane dans la solution de Blocking (Roche) pendant 30 min.
-Incuber pendant au moins 30min., avec l'anticorps anti-DIG, dilué 1: 10 000 dans la solution de Blocking
-Laver la membrane 2x25 min. dans la solution de lavage.
-Equilibrer en immergeant la membrane de 2 à 5 min. dans le detection-buffer (Roche).

- Placer la membrane dans un sac en plastique et ajouter la solution de CSPD-ready-to-use (Roche).
- Exposer la membrane à un film d'autoradiographie (toujours sous plastic) pendant 30sec. à 5 min. (ou plus). Pour accentuer la le signal, incuber à 37°c.

-Immerger le film pendant 1 min. dans le révélateur.
-Rincer le flm à l'eau et l'immerger pendant 1 min. dans le fixateur, le rincer.

Solutions

Solution de lavage: Acide maléique 0,1M
Nacl 0,15M
Ajuster à pH 7,5 avec du NaoH solide.
A jouter, 0,3% de Tween 20

5.3j Polymerase Chain Reaction (PCR).

La PCR permet l'amplification spécifique de portions d'ADN.

L'ADN doit être dénaturé. Des amorces oligonucléotidiques d'environ 20 pb, complémentaires des séquences se trouvant de chaque côté de la région cible, s'hybrident l'une au brin "sens" l'autre au brin "anti-sens". La longueur de la séquence-cible est déterminée par la distance entre les 2 amorces.

Une ADN polymérase thermostable (la Taq polymérase) (Dynazyme) est alors utilisée pour synthétiser à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque amorce un brin d'ADN. Un cycle consiste en 3 étapes: dénaturation, hybridation des amorces et élongation. En répétant ce cycle, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies de la cible.

La température d'hybridation utilisée est inférieure à la température de melting Tm des amorces. Ce Tm se calcule de la façon suivante: Tm=4(G+C) + 2(A+T). Il est préferable de ne pas dépasser la taille de 24 nucléotides dans le choix des amorces. De plus, les amorces devront contenir environ le même pourcentage de bases GRAM -C que l'ADN cible, dont peu de bases GRAM -C du côté 3'-OH afin que la polymérase puisse agir au mieux. Les PCR ont été effectuées sur un PTC-150 Minicycler (MJ Research). Les différentes amorces utilisées dans ce travail sont représentées dans le tableau ci-dessous.

Liste des amorces utilisées lors des différentes PCR.

Amorces	Sequence	References

P2	5'-TACCTACAACCTCAAGCT-3'	Hensel *et al.*, 1995
P3	5'-CATGGTACCCATTCTAAC-3'	Hensel *et al.*, 1995
P4	5'-TACCCATTCTAACCAAGC-3'	Hensel *et al.*, 1995
P5	5'-CTAGGTACCTACAACCTC-3'	Hensel *et al.*, 1995
P6	5'-CCTAGGCGGCCAGATCTGAT-3'	Hensel *et al.*, 1995
P7	5'-GCACTTGTGTATAAGAGTCAGRAM -3'	Hensel *et al.*, 1995
I-end	5'-CGCAGGGCTTTATTGATTC-3'	Lestrate *et al.*, 2000
O-end	5'-CGGCCGCACTTGTGTATAAGRAM -3'	Lestrate *et al.*, 2000
ARB1	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNGATAT-3'	O'Tool et al., 1998
ARB2	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'	O'Tool et al., 1998
ARB3	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNCAGTC-3'	Lestrate *et al.*, 2000
ARB4	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNTACGT-3'	Lestrate *et al.*, 2000
ARB5	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNGTTAC-3'	Lestrate *et al.*, 2000

Dans ce tableau sont repris les différentes amorces qui ont été utlisées lors des diverses PCR effectuées dans le cadre de ce mémoire. Ces amorces ont été synthétisée par la firme Gibco-BRL.

5.5k La PCR arbitraire.

Cette technique va permettre l'amplification spécifique des fragments d'ADN génomique se trouvant de part et d'autre du transposon. Cette PCR s'effectue en deux round, lors du premier round nous allons amplifier les séquences bordant le transposon via l'utilisation de primers allant s'hybrider sur une extrémité du transposon en association avec un primer arbitraire (Arb 1) pouvant aller s'hybrider n'importe où sur l'ADN génomique et dont une partie est connue. Ensuite lors du second round de PCR s'effectuant sur les produits amplifiés du premier round, nous allons amplifier spécifiquement des séquences d'une certaine taille bordant le transposon. Les primers utilisés pour ce second round sont synthétisés de façon a correspondre aux deux extrémités du transposon mais en position légèrement plus extérieur par rapport aux premiers primers utilisés. Ces primers vont chacun agir en association avec un primer synthétisé de façon à correspondre à la partie connue du primer arbitraire utilisé lors du premier round de PCR.

Round 1

Par réaction, il faut :

-Amorces P4/P7 et Arb1 (100mM)	0,5 µl
-DNTP (20 mM)	2 µl
-Taq polymérase	1 unité
-Tampon (10X)	5 µl
-ADN cible	500ng

Le volume est ajusté à 50 µl avec de l'eau bi-distillée stérile.

Le cycle se compose de :
-5 min. à 95C°
-6 cycles de : -30 sec. à 99C°
-30 sec. à 30C°
-1 min. 30 sec. à 72C°
-9 cycles de : -30 sec. à 95C°
-30 sec. à 45C°
-1 min. 30 sec. à 72C°

Round 2

Par réaction, il faut :

-Primers I-end/O-end et Arb2,3,4,5 (100mM)		0,5 µl
-DNTP(20 mM)	2 µl	
-Taq polymérase	1 unité	
-Tampon (10X)	5 µl	
-ADN cible	5 µl	
-H2O	36 µl	

Le cycle de la PCR se compose de :
-4 min. à 95C°
-30 cycles de :-30 sec. à 95C°
-30 sec. à 50C°
-2 min. à 72C°

5.5l L'inverse PCR

L'amplification par IPCR de fragment d'ADN génomique de *Brucella* sp. se fait sur des molécules d'ADN circularisées. L'ADN génomique des souches transposantes de *B. melitensis* a donc été restreint par l'enzyme de restriction *EcoR*V et les fragments de restriction ont été religués. Les amorces utilisées sont spécifiques du gène des extrémités O-end et I-end du transposon.

Self-ligation

Par ligation, il faut :

-ADN restreint	10 µl
-Ligase T4-DNA	1 µl
-Tampon	5 µl
-H_2O	34 µl (volume final de 50 µl)

Laisser la réaction se faire une nuit à 4 C°.

IPCR

Par réaction, il faut :

-Primers I-end et O-end (100mM) 1 µl
-Produit de self-ligation 10 µl
-DNTP(20mM) 4 µl
-Taq Expand (Roche) 1 unité
-Tampon (B1) 5 µl
-H2O 28 µl

Le cycle de la PCR se compose de :

-5 min. à 94 C°
-35 cycle de : 1 min. à 94 C°
45 sec. à 50 C°
3 min. à 68 C°
-12 min. à 68 C°

5.3m Signature Tagged Mutagenesis (STM).

Préparation des membranes

Solutions :

Solution de dénaturation :

NaOH : 0,5M
NaCl : 1,5M

Solution de neutralisation :

Tris 0,5M pH 7,2
NaCl 1,5M
EDTA 1mM

SSC 20X :

Citrate de Na : 0,3M pH7 (mettre à pH avec du HCl 1M)
NaCl :3 M

Les tags ont été amplifiées individuellements sur les transposons sélectionnés par P. Lestrate. L'amplification PCR des tags est faite à l'aide des amorces P3 et P5. Les conditions de la PCR etaient les suivantes.

ADN cible : 100 ng
Amorces (100mM) : 1 µl
dNTP (5mM) : 2µl
Taq polymerase : 1 unité
Tampon PCR 10X : 10 µl
Le volume est monté a 100µl avec de l'eau bi-distillée stérile.

Les cycles PCR étaient les suivants :
-30 cycles de : -95 C° 5 min.
- 95 C° 45 sec.
-50 C° 45 sec.

Les produits PCR sont dilués 10X dans de l'eau bi-distillée stérile et blottés sur une membrane chargée positivement (Hybond-N+, Amersham) à l'aide d'un appareil à DotBlot (Bio Rad).
Ensuite les membranes sont traitée comme suit :
-Incuber 5 min. sur papier buvard imbibé de solution de dénaturation
-Incuber 5 min. sur papier buvard imbibé de solution de neutralisation
-Incuber 5 min. sur papier buvard imbibé de SSC 2X
-Sécher 10 min. à 80 C° (dans le four à hybridation)
Fixer aux UV 5 min.

Récupération de l'ADN génomique des input et output pool.

Les ADN genomique des input et output pool sont récupérés via la méthode CTAB à partir de culture en milieu solide.

Amplification et marquage des tags
Les tags sont amplifiée par PCR à l'aide des primers P2 et P4. Les conditions d'amplification sont les suivantes :
-Primers (100mM) 0,5 µl
-Taq polymérase 1 unité
-Tampon (10X) 5 µl
-dNTP (20mM) 2 µl
-ADN template 200 ng
Le volume est monté à 50 µl avec de l'eau bi-distillée stérile.
Le marquage des tags s'effectue via l'incorporation d'un nucléotide radioactif lors d'une reaction PCR.
Les conditions de PCR sont les suivantes :
-Primers (100mM) 0,5 µl
-Taq polimérase 1 unité
-Tampon (10X) 2 µl
-dATP (20mM) 1 µl
-dGTP (20mM) 1 µl
-dTTP (20mM) 1 µl
-[α-P 32]-dCTP 1 µCurie

-ADN template 3 µl
Le volume est monté à 20 µl avec de l'eau bi-distillée stérile.

Restriction des sondes et hybridation.
Afin de se débarrasser des bras invariants des tags, ceux-ci sont éliminer via une restriction *HindIII*. Après restriction, les sondes sont dénaturées et hybridées sur les membranes en conditions stringeantes (42°c, 50% formamide). La révélation s'effectue par autoradiographie. Les membranes sont ensuite strippées au SDS 2% bouillant.

5.4 Les manipulations en microbiologie.

5.4a Confirmation in vivo de l'atténuation par méthode d'infection compétitives.

5.4a1 Matériel.

- Souris BALBc agées de 5 semaines.
-NaCl 0,9 % (9 gr de NaCl dans un litre d'eau bidistillée), autoclaver la solution.
-PBS Triton-X 100 (500 ml):- 50 ml de PBS
-0,5 gr de triton
-450 ml d'eau bidistillée (Autoclaver la solution)

5.4a2 Isolement et précultures.

-Au moyen d'une pipette pasteur boutonnée et stérilisée à la flamme, isoler sur milieu 2YT solide une culture stock liquide de *Brucella*. Laisser pousser 3 à 4 jours à 37 C°.
-De cet isolement sur milieu solide prélever une boulette de bactéries au moyen d'une pipette pasteur boutonnée et stérilisée à la flamme.
-Resuspendre cette boulette dans 5 ml de 2YT et laisser pousser 24 heures sous agitation à 37 C°.

5.4a3 Préparation des doses infectantes.

-Centrifuger les précultures 10 min. à 4000 rpm.
-Eliminer le surnageant et resuspendre les culots dans 2 ml de NaCl 0,9 %.
-Prendre les D.O. à 600 nm et effectuer les dilutions nécessaires de façon à obtenir 2,5. 10^6 bactéries/ml (DO=1 correspond à 210^9 bactéries).
-Effectuer les mélanges mutant-sauvage dans un ratio 1: 1 (200µl du mutant + 200µl de la Sauvage par exemple).

5.4a4 Infection de souris et dilutions sériées.

-Infecter les souris en injectant 100 µl de la dose infectante en intra péritonéale (IP). La période d'incubation est de 5 jours.
-Effectuer des dilutions sériées de 10 en 10 de la dose infectantejusqu'à une valeur de 10^{-5} à partir des doses infectantes.
-Etaler 20 µl de chacune de ces dilutions sur milieu sélectif 2YT Kan ainsi que sur milieu non sélectif 2YT.
(Rem: l'étalement se fait au moyen d'une multichanel en déposant les 20 µl sur la boite de milieu penchée à 45°)
-Laisser pousser les colonies sur milieu 3 jours et ensuite dénombrer les CFU pour chaque mutant.

5.4a5 Récupération des bactéries.

-Après 5 jours d'incubation, tuer les souris en les tenant par la nuque et en tirant un coup sec sur la queue (on évite ainsi les projections de sang contaminé par *Brucella*).
-Disséquer les souris et récupérer la rate que l'on dépose dans un petit sachet plastique stérile prévu à cet effet.
-Au moyen d'un objet ayant une face plane (un marqueur par exemple) écraser la rate dans le sachet de façon a broyer les tissus.
-Ajouter 2 ml d'une solution de PBS Triton-X 100 et homogénéiser la solution tissus broyé + solution de lyse.
-Récupérer le maximum de surnageant et le placer dans un tube stérile.
-Effectuer des dilutions de 10 en 10 jusqu'à une valeur de 10^{-5} dans la solution de PBS Triton-X 100.
-Etaler comme précédemment 20 µl de chacune de ces dilutions sur milieu non sélectif 2YT et milieu sélectif 2YT Kan.
-Laisser pousser 3 jours à 37 C° et dénombrer les CFU pour chaque mutant sur les deux types de milieu.

5.4b Infection de cellules HeLa et de macrophages.

5.4b1 Préparation des cellules HeLa et macrophages.

-Travailler sous hotte à flux laminaire et désinfectée à l'éthanol.

-Eliminer le milieu RPMI+ FCS 10% de la flasque contenant les cellules préalablement mises en culture.
-Ajouter 1 ml de trypsine pure et replacer la flasque à 37 C° 1 à 2 min. afin que les cellules puissent se décoller

-Après vérification au binoculaire que les cellules se sont bien décollées du fond de la flasque, ajouter 10 ml de RPMI+ FCS 10% et agiter la solution au moyen de la pipette afin d'éviter l'agrégation des cellules

-Prélever 10 µl de cette solution et les placer sur la cellule de Thomas, compter les cellules et effectuer les dilutions nécessaires dans du RPMI + FCS 10 % de façon à obtenir $2.10^{(}$ cellules par ml.

-Déposer 100 µl de suspension cellulaire par puit.

5.4b2 Préparation des doses infectantes.

-La veille, lancer une préculture des mutants + la souche 16M dans 5 ml de 2YT liquide.

-Prélever 1,5 ml de préculture et centrifuger 10 min. à 4000 rpm.

-Resuspendre les culots dans 5 ml de RPMI+ FCS 10%.

-Prendre les D.O. et faire les dilutions dans RPMI+ FCS 10% nécessaire de façon à obtenir 6. 10^6 bactéries/100 µl

-Faire des dilution de 10 en 10 jusque 10^{-5} des doses infectantes

-Etaler 20 µl de chaque dilution sur milieu 2YT

-Après 3 jours d'incubation à 37C°, compter le nombre de CFU pour chaque dilution et chaque mutant.

5.4b3 Infection

-Réduire la quantité de milieu RPMI + FCS 10 % dans les plaques multipuits à 45 µl par puits.

-Ajouter 100 µl de la dilution de *Brucella* à concentration 6.10^6/100µl. (300 bactéries par cellules).

-Infecter une heure à 37°C.

-Laver trois fois. (retirer doucement le milieu et remettre 100 µl de RPMI + FCS 10 % avec précaution).

-Après le dernier lavage, ajouter 100 µl de RPMI + FCS 10 %.

-Laisser incuber 48 h.

5.4b4 Lyse des cellules

-Faire 3 rinçages avec 100 µl de RPMI + FCS 10%.

-Ajouter 100µl de PBS Triton X100.

-Laisser les cellules incuber 10 à 20 min. à 37 C° jusqu'à l'obtention de la lyse cellulaire.

-Effectuer des dilutions croissantes du surnageant de la lyse d'une dilution 10^{-1} jusqu'à une dilution 10^{-5}

-Déposer une goutte de 20 µl de chaque dilution sur une boîte de pétri inclinée de sorte que la goutte coule et forme une bande sur le milieu 2YT agar.

-Incuber trois jours à 37°C.

-Compter le nombre de CFU et calculer, en fonction de la dilution, le nombre de *Brucella* internalisées par les macrophages ou cellules HeLa en 48 heures.

5.4c Test H_2O_2.

-La veille, lancer les pré-cultures de mutants dans 5 ml de 2YT liquide.
-Quand les pré-cultures ont poussé, prendre les D.O. et effectuer les dilution nécessaires dans du 2YT liquide de façon à obtenir 4.10^8 bactéries par ml.
-Etaler 100 µl sur milieu 2YT solide (boîtes de pétri de 9 cm de diamètre) de façon à obtenir un tapis homogène de cellules.
-Placer au centre de la boîte de pétri un petit carré de papier Wattman de 1 cm^2 préalablement autoclavé.
-A la pipette, verser 10 µl d' H_2O_2 30 % sur le papier Wattman.
-Incuber 3 à 4 jours à 37 C°, et mesurer ensuite le diamètre du cercle d'inhibition de croissance (à comparer avec la souche bactérienne contrôle).

5.4d Test sur milieu minimum (MM).

-Râcler une boulette d'une culture solide de bactérie et la resuspendre dans 1 ml de NaCl 0,9%.
-Centrifuger 4 min. à 4000 rpm.
-Eliminer le surnageant, laver avec 1 ml de NaCl 0,9% et recentrifuger 4 min. à 4000 rpm.
-Eliminer le surnageant et resuspendre dans 1 ml de NaCl 0,9%.
-Déposer une goutte de 20 µl sur milieu minimum solide ainsi que sur milieu 2YT solide (pour avoir un contrôle).
-Incuber 5 à 10 jours à 37 C°.

5.4e Cristal violet

Cette technique rapide permet de différencier visuellement les colonies lisses des rugeuses. Elle a été décrite par White en 1951.
Les bactéries lisses se différençies des rugeuses par un anneau incolore bordant la colonie.

6 Bibliographie

Brucellosis: an overview.(1997) Em. Infect. Dis., **3**, *213-221.*

Allen, C.A., Adams, L.G. and Ficht, T.A. (1998) Transposon-derived Brucella abortus rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. Infec.t Immun., **66**, *1008-1016.*

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. J. Mo.l Biol., **215**, *403-410.*

Andersson, S.G., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U.C., Podowski, R.M., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H. and Kurland, C.G. (1998) The genome sequence of Rickettsia prowazekii and the origin of mitochondria. Nature, ***396***, *133-140.*

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.E., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1991) *Current Protocols in Molecular Biology*. Green Publishing Associates, New York.

Bardin, S., Dan, S., Osteras, M. and Finan, T.M. (1996) A phosphate transport system is required for symbiotic nitrogen fixation by Rhizobium meliloti. J. Bacteriol., **178**, *4540-4547.*

Behr, M.A., Wilson, M.A., Gill, W.P., Salamon, H., Schoolnik, G.K., Rane, S. and Small, P.M. (1999) Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA. Science, **284**, *1520-1523.*

Bell, J.C., R. S. Palmer, and J.M. Payne. (1988) The zoonose: infection transmitted from animals to man. British library cataloguing in publication data, London.

Blum, G., Ott, M., Lischewski, A., Ritter, A., Imrich, H., Tschape, H. and Hacker, J. (1994) Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an Escherichia coli wild-type pathogen. Infect. Immun., **62**, *606-614.*

Boland, A., Sory, M.P., Iriarte, M., Kerbourch, C., Wattiau, P. and Cornelis, G.R. (1996) Status of YopM and YopN in the Yersinia Yop virulon: YopM of Y.enterocolitica is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus. EMBO, **15**, *5191-5201.*

Boyd, E.F. and Waldor, M.K. (1999) Alternative mechanism of cholera toxin acquisition by Vibrio cholerae: generalized transduction of CTXPhi by bacteriophage CP-T1. Infect. Immun., ***67****, 5898-5905.*

Bruijn, M.G.B.a.F.J.d. (1998) Detection and Isolation of a Novel Rhizopine-Catabolizing Bacteriéa from the Environment. Applied and Environmental Microbiol., ***64****, 4944-4949.*

Camilli, A., Beattie, D.T. and Mekalanos, J.J. (1994) Use of genetic recombination as a reporter of gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, ***91****, 2634-2638.*

Casadevall, A. and Pirofski, L.A. (1999) Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. Infect. Immun., ***67****, 3703-3713.*

Cheng, L.W. and Schneewind, O. (2000) Type III machines of Gram-negative bacteria: delivering the goods. Trends in Microbiol., ***8*** *(5), 214-220*

Chiang, S.L., Mekalanos, J.J. and Holden, D.W. (1999) In vivo genetic analysis of bacterial virulence. Annu. Rev. Microbiol., ***53****, 129-154.*

Chiang, S.L., and Mekalanos, J.J. (1998) Use of Signature-tagged transposonmutagenesis to identifyVibrio cholerae genes critical for colonisation. Mol. Microbiol., ***27****, 797-805.*

Corbel, M.J., and Brinley-Morgan, W.J. (1984) Bergey's Manual of Systematic Bacterioly. Williams & Wiulkins, Baltimore.

Corbel, M.J., Cockrem, D.S. and Brewer, R.A. (1984) The interaction of Brucella cell surface components with plant agglutinins. Dev. Biol. Stand., ***56****, 169-175.*

Cornelis, G.R. (1998) The Yersinia deadly kiss. J. Bacteriol., ***180****, 5495-5504.*

Cossart, P. (1997) Host/pathogen interactions. Subversion of the mammalian cell cytoskeleton by invasive bacteria. J. Clin. Invest., ***99****, 2307-2311.*

Coulter, S.N., Schwan, W.R., Ng, E.Y., Langhorne, M.H., Ritchie, H.D., Westbrock-Wadman, S., Hufnagle, W.O., Folger, K.R., Bayer, A.S. and Stover, C.K. (1998) Staphylococcus aureus genetic loci impacting growth and survival in multiple infection environments. Mol. Microbiol., ***30****, 393-404.*

Covacci, A. and Rappuoli, R. (1998) Helicobacter pylori: molecular evolution of a bacterial quasi-species. Curr. Opin. Microbiol., ***1****, 96-102.*

Covacci, A., Telford, J.L., Del Giudice, G., Parsonnet, J. and Rappuoli, R. (1999) Helicobacter pylori virulence and genetic geography. Science, ***284****, 1328-1333.*

Cox, J.S., Chen, B., McNeil, M. and Jacobs, W.R., Jr. (1999) Complex lipid determines tissue-specific replication of Mycobacterium tuberculosis in mice. Nature, ***402****, 79-83.*

Crawford, R.M., Van De Verg, L., Yuan, L., Hadfield, T.L., Warren, R.L., Drazek, E.S., Houng, H.H., Hammack, C., Sasala, K., Polsinelli, T., Thompson, J. and Hoover, D.L. (1996) Deletion of purE attenuates Brucella melitensis infection in mice. Infect. Immun., ***64****, 2188-2192.*

Darwin, A.J. and Miller, V.L. (1999) Identification of Yersinia enterocolitica genes affecting survival in an animal host using signature-tagged transposon mutagenesis. Mol. Microbiol., ***32****, 51-62.*

de Chastellier, C. and Berche, P. (1994) Fate of Listeria monocytogenes in murine macrophages: evidence for simultaneous killing and survival of intracellular bacteria. Infect. Immun., ***62****, 543-553.*

de Lorenzo, V., Herrero,M., Jakubzik, U. and Timmis, K.N. (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis. promoter. J. Bacteriol., ***172****, 6568-6572.*

Detilleux, P.G., Deyoe, B.L. and Cheville, N.F. (1990a) Entry and intracellular localization of Brucella spp. in Vero cells: fluorescence and electron microscopy. Vet. Pathol., ***27****, 317-328.*

Detilleux, P.G., Deyoe, B.L. and Cheville, N.F. (1990b) Penetration and intracellular growth of Brucella abortus in nonphagocytic cells in vitro. Infect. Immun., ***58****, 2320-2328.*

*DeVinney, R., Gauthier, A., Abe, A. and Finlay, B.B. (1999) Enteropathogenic Escherichia coli: a pathogen that inserts its own receptor into host cells. Cell. Mol. Life Sci., **55**, 961-976.*

*Dunn, W.A. (1994) Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. Trends Cell Biol., **4**, 139-143.*

Edelstein, P.H., Edelstein, M.A., Higa, F. and Falkow, S. (1999) Discovery of virulence genes of *Legionella pneumophila* by using signature tagged mutagenesis in a guinea pig pneumonia model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A,* **96**, 8190-8195.

*Elzer, P.H., Phillips, R.W., Kovach, M.E., Peterson, K.M. and Roop, R.M., 2nd. (1994) Characterization and genetic complementation of a Brucella abortus high- temperature-requirement A (htrA) deletion mutant. Infect. Immun., **62**, 4135-4139.*

*Falkow, S. What is a pathogen? ASM News, **63**, 359-365.*

Falkow, S. (1999) Cellular microbiology is launched. Cell. microbiol., **1**, 3-6.

*Falzano, L., Fiorentini, C., Boquet, P. and Donelli, G. (1993) Interaction of Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1) with cultured cells. Cytotechnology, **11**, S56-58.*

*Fearon, D.T. (1978) Regulation by membrane sialic acid of beta1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, **75**, 1971-1975.*

*Finlay, B.B. and Falkow, S. (1989) Common themes in microbial pathogenicity. Microbiol. Rev., **53**, 210-230.*

*Finlay, B.B. and Falkow, S. (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev., **61**, 136-169.*

*Foulongne, V., Bourg, G., Cazevieille, C., Michaux-Charachon, S. and O'Callaghan, D. (2000) Identification of Brucella suis genes affecting intracellular survival in an in vitro human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. Infect. Immun., **68**, 1297-1303.*

*Francis, C.L., Starnbach, M.N. and Falkow, S. (1992) Morphological and cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with Salmonella typhimurium grown under low-oxygen conditions. Mol. Microbiol., **6**, 3077-3087.*

Galan, J.E. and Curtiss, R.d. (1989) Cloning and molecular characterization of genes whose products allow Salmonella typhimurium to penetrate tissue culture cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, ***86****, 6383-6387*

Galan, J.E. and Collmer, A. (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. Science, ***284****, 1322-1328.*

Galbraith, M. P., Feng, S.F., Borneman, J., Triplett, E.W., de Bruijn, F.J. and Rossbach, S. (1998) A functional myo-inositol catabolism pathway is essential for rhizopine utilization by Sinorhizobium meliloti. Microbiology, **144**, 2915-2924.

Gish, W. and States, D.J. (1993) Identification of protein coding regions by database similarity search. Nat. Genet., ***3****, 266-272.*

Godfroid, F., Taminiau, B., Danese, I., Denoel, P., Tibor, A., Weynants, V., Cloeckaert, A., Godfroid, J. and Letesson, J.J. (1998) Identification of the perosamine synthetase gene of Brucella melitensis 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in Brucella survival in mice and in macrophages. Infect. Immun., ***66****, 5485-5493.*

Gulig, P.A. and Doyle, T.J. (1993) The Salmonella typhimurium virulence plasmid increases the growth rate of salmonellae in mice. Infect. Immun., ***61****, 504-511.*

Gunn, J.S. and Miller, S.I. (1996) PhoP-PhoQ activates transcription of pmrAB, encoding a two-component regulatory system involved in Salmonella typhimurium antimicrobial peptide resistance. J. Bacteriol., ***178****, 6857-6864.*

Guo, L., Lim, K.B., Gunn, J.S., Bainbridge, B., Darveau, R.P., Hackett, M. and Miller, S.I. (1997) Regulation of lipid A modifications by Salmonella typhimurium virulence genes phoP-phoQ. Science, ***276****, 250-253.*

Halling, S.M. (1998) On the presence and organization of open reading frames of the non motile pathogen Brucella abortus similar to class I, II and III flagellar genes and to Lcrd superfamily. Micfrobiol. and comparive genomics, ***3****, 21-29.*

Hathaway, L.J. and Kraehenbuhl, J.P. (2000) The role of M cells in mucosal immunity. Cell Mol. Life Sci., ***57****, 323-332.*

Hedges, S.R., Mayo, M.S., Kallman, L., Mestecky, J., Hook, E.W., 3rd and Russell, M.W. (1998) Evaluation of immunoglobulin A1 (IgA1) protease and IgA1 protease-inhibitory activity in human female genital infection with Neisseria gonorrhoeae. Infect. Immun., ***66****, 5826-5832.*

Heithoff, D.M., Conner, C.P., Hanna, P.C., Julio, S.M., Hentschel, U. and Mahan, M.J. (1997a) Bacterial infection as assessed by in vivo gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, ***94****, 934-939.*

Heithoff, D.M., Conner, C.P. and Mahan, M.J. (1997b) Dissecting the biology of a pathogen during infection. Trends Microbiol., ***5****, 509-513.*

Henderson B., W.M., McNab R., Lax A. J. (1999b) Bacterial survival and growth subsequent to invasion. In Offices, O.W.E. (ed.) Bacteria-Host Interaction in Healt and Disease, New York, p. 261.

Henderson B., W.M., McNab R., Lax A. J. (1999a) Bacterial survival and growth subsequent to invasion. In Offices, O.W.E. (ed.) Bacteria-Host Interaction in Healt and Disease, New York, pp. 3-22.

Henderson B., W.M., McNab R., Lax A. J. (1999e) Bacterial survival and growth subsequent to invasion. In Offices, O.W.E. (ed.) Bacteria-Host Interaction in Healt and Disease, New York, pp. 53-74.

Henderson B., W.M., McNab R., Lax A. J. (1999d) Bacterial survival and growth subsequent to invasion. In Offices, O.W.E. (ed.) Bacteria-Host Interaction in Healt and Disease, New York, pp. 334-340.

Henderson B., W.M., McNab R., Lax A. J. (1999c) Bacterial survival and growth subsequent to invasion. In Offices, O.W.E. (ed.) Bacteria-Host Interaction in Healt and Disease, New York, pp. 428-431.

Hensel, M. and Holden, D.W. (1996) Molecular genetic approaches for the study of virulence in both pathogenic bacteria and fungi. Microbiology, ***142****, 1049-1058.*

Hensel, M., Shea, J.E., Gleeson, C., Jones, M.D., Dalton, E. and Holden, D.W. (1995) Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. Science, ***269****, 400-403.*

Hensel, M. (1998) Whole genome scan for habitat-specific genes by signature-tagged mutagenesis. Electrophoresis, 19, 608-612.

Horstmann, R.D. (1992) Target recognition failure by the nonspecific defense system: surface constituents of pathogens interfere with the alternative pathway of complement activation. Infect. Immun., 60, 721-727.

Hueck. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol. Mol. Biol., 379-433.

Isberg, R.R. (1991) Discrimination between intracellular uptake and surface adhesion of bacterial pathogens. Science, ***252****, 934-938.*

Joiner, K.A., Ganz, T., Albert, J. and Rotrosen, D. (1989) The opsonizing ligand on Salmonella typhimurium influences incorporation of specific, but not azurophil, granule constituents into neutrophil phagosomes. J. Cell. Biol., ***109****, 2771-2782.*

Jones, S.M. and Winter, A.J. (1992) Survival of virulent and attenuated strains of Brucella abortus in normal and gamma interferon-activated murine peritoneal macrophages. Infect. Immun., ***60****, 3011-3014.*

Jumas-Bilak, E., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., O'Callaghan, D. and Ramuz, M. (1998) Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus Brucella. Mol. Microbiol., ***27****, 99-106.*

Kaper J.B., H. (1999) Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements . ASM Press, Washington, D.C.

Kemner, J.M., Liang, X. and Nester, E.W. (1997) The Agrobacterium tumefaciens virulence gene chvE is part of a putative ABC-type sugar transport operon. J Bacteriol, ***179****, 2452-2458.*

Kilian M, M.J., Russel mw. (1988) Defense Mechanisms Involving Fc-Dependant Function of Immunoglobulin A and their Subversion by Bacterial Immunoglobulin A proteases. Microbiological reviews, ***52****, 296-303.*

Kohler, S., Teyssier, J., Cloeckaert, A., Rouot, B. and Liautard, J.P. (1996) Participation of the molecular chaperone DnaK in intracellular growth of Brucella suis within U937-derived phagocytes. Mol. Microbiol., ***20****, 701-712.*

Kreutzer, D.L., Dreyfus, L.A. and Robertson, D.C. (1979) Interaction of polymorphonuclear leukocytes with smooth and rough strains of Brucella abortus. Infect. Immun., ***23****, 737-742.*

Lee, C.A. (1997) Type III secretion systems: machine to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells. Trends in microbiology, ***5****, 148-155.*

Lee, V.T. and Schneewind, O. (1999) Type III secretion machines and the pathogenesis of enteric infections caused by Yersinia and Salmonella spp. Immunol Rev, ***168****, 241-255.*

LeVier, K., Phillips, R.W., Grippe, V.K., Roop, R.M., 2nd and Walker, G.C. (2000) Similar requirements of a plant symbiont and a mammalian pathogen for prolonged intracellular survival. Science, ***287****, 2492-2493.*

Liou, W., Geuze, H.J., Geelen, M.J. and Slot, J.W. (1997) The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. J. Cell. Biol., ***136****, 61-70.*

Lipsitch, M. and Moxon, E.R. (1997) Virulence and transmissibility of pathogens: what is the relationship? Trends Microbiol, ***5****, 31-37.*

Loewus, F.A. (1990) Structure and occurence of inositols in plants. In D.J. Morre, W.F.B.a.F.A.L. (ed.) In Inositol Metabobism in plant, New York, pp. 1-11.

Lohrke, S.M., Nechaev, S., Yang, H., Severinov, K. and Jin, S.J. (1999) Transcriptional activation of Agrobacterium tumefaciens virulence gene promoters in Escherichia coli requires the A. tumefaciens RpoA gene, encoding the alpha subunit of RNA polymerase. J. Bacteriol., ***181****, 4533-4539.*

Mahan, M.J., Slauch, J.M. and Mekalanos, J.J. (1993) Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. Science, ***259****, 686-688.*

Mahan, M.J., Tobias, J.W., Slauch, J.M., Hanna, P.C., Collier, R.J. and Mekalanos, J.J. (1995) Antibiotic-based selection for bacterial genes that are specifically induced during infection of a host. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, ***92****, 669-673.*

Martinez de Tejada, G., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. and Moriyon, I. (1995) The outer membranes of Brucella spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. Infect. Immun., ***63****, 3054-3061.*

Matthysse, A.G., Yarnall, H.A. and Young, N. (1996) Requirement for genes with homology to ABC transport systems for attachment and virulence of Agrobacterium tumefaciens. J. Bacteriol., ***178****, 5302-5308.*

Mehr, I.J. and Seifert, H.S. (1998) Differential roles of homologous recombination pathways in Neisseria gonorrhoeae pilin antigenic variation, DNA transformation and DNA repair. Mol. Microbiol., ***30****, 697-710.*

Mei, J.M., Nourbakhsh, F., Ford, C.W. and Holden, D.W. (1997) Identification of Staphylococcus aureus virulence genes in a murine model of bacteraemia using signature-tagged mutagenesis. Mol. Microbiol., ***26****, 399-407.*

Michaux, S., Paillisson, J., Carles-Nurit, M.J., Bourg, G., Allardet-Servent, A. and Ramuz, M. (1993) Presence of two independent chromosomes in the Brucella melitensis 16M genome. J. Bacteriol., ***175****, 701-705.*

Michiels, T., Wattiau, P., Brasseur, R., Ruysschaert, J.M. and Cornelis, G. (1990) Secretion of Yop proteins by Yersiniae. Infect. Immun., ***58****, 2840-2849.*

Mills, S.D., Boland, A., Sory, M.P., van der Smissen, P., Kerbourch, C., Finlay, B.B. and Cornelis, G.R. (1997) Yersinia enterocolitica induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, ***94****, 12638-12643.*

Monack, D.M., Mecsas, J., Ghori, N. and Falkow, S. (1997) Yersinia signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, ***94****, 10385-10390.*

Moors, M.A. and Portnoy, D.A. (1995) Identification of bacterial genes that contribute to survival and growth in an intracellular environment. *Trends Microbiol*, **3**, 83-85.
Wilson. (1999) *Bacteria-Host Interaction in Health and Disease.*

Moulder, J.W. (1985) Comparative biology of intracellular parasitism. Microbiol Rev, ***49****, 298-337.*

Muffler, A., Traulsen, D.D., Fischer, D., Lange, R. and Hengge-Aronis, R. (1997) The RNA-binding protein HF-I plays a global regulatory role which is largely, but not exclusively, due to its role in expression of the sigmaS subunit of RNA polymerase in Escherichia coli. J. Bacteriol., ***179****, 297-300.*

Muller, K.M. and Schmitz, I. (1997) Chronic bronchitis--alterations of the bronchial mucosa . Wiad Lek, ***50****, 252-266.*

Murphy, P.J., Trenz, S.P., Grzemski, W., De Bruijn, F.J. and Schell, J. (1993) The Rhizobium meliloti rhizopine mos locus is a mosaic structure facilitating its symbiotic regulation. J. Bacteriol., ***175****, 5193-5204.*

O'Callaghan, D., Cazevieille, C., Allardet-Servent, A., Boschiroli, M.L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y. and Ramuz, M. (1999) A homologue of the Agrobacterium tumefaciens VirB and Bordetella pertussis Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of Brucella suis. Mol. Microbiol., ***33****, 1210-1220.*

O'Toole, G.A. and Kolter, R. (1998) Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol. Microbiol., ***28****, 449-461.*

Ochman. (1997) How Salmonella became a pathogen. Trends in microbiology, ***5****, 343-349.*

Parsot, C. (1994) Shigella flexneri: genetics of entry and intercellular dissemination in epithelial cells. Curr. Top. Microbiol. Immunol., ***192****, 217-241.*

Perry, R.D. (1999) Signature-tagged mutagenesis and the hunt for virulence factors. Trends in Microbiol., 7 (10), 385-388

Phillips, R.W., Elzer, P.H. and Roop, R.M., II. (1995) A Brucella melitensis high temperature requirement A (htrA) deletion mutant demonstrates a stress response defective phenotype in vitro and transient attenuation in the BALB/c mouse model. Microb. Pathog., ***19****, 227-284.*

Pizarro-Cerda, J., Meresse, S., Parton, R.G., van der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goni, I., Moreno, E. and Gorvel, J.P. (1998) Brucella abortus transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. Infect. Immun., ***66****, 5711-5724.*

Pizarro-Cerda J., Moreno, E., and J.P. Gorvel. (1999) Brucella abortus invasion and survival within professional and nonprofessional phagocytes. Advances in Cell and Molecular Biology of Menbranes and Organelles, ***6****, 201-232.*

Pizza, M., Scarlato, V., Masignani, V., Giuliani, M.M., Arico, B., Comanducci, M., Jennings, G.T., Baldi, L., Bartolini, E., Capecchi, B., Galeotti, C.L., Luzzi, E., Manetti, R., Marchetti, E., Mora, M., Nuti, S., Ratti, G., Santini, L., Savino, S., Scarselli, M., Storni, E., Zuo, P., Broeker, M., Hundt, E., Knapp, B., Blair, E., Mason, T., Tettelin, H., Hood, D.W., Jeffries, A.C., Saunders, N.J., Granoff, D.M., Venter, J.C., Moxon, E.R., Grandi, G. and Rappuoli, R. (2000) Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. Science, ***287****, 1816-1820.*

Polissi, A., Pontiggia, A., Feger, G., Altieri, M., Mottl, H., Ferrari, L. and Simon, D. (1998) Large-scale identification of virulence genes from Streptococcus pneumoniae. Infect. Immun., ***66****, 5620-5629.*

Poole, P.S., Blyth, A., Reid, C.J., and Walters K. (1994) Myo-inositol catabolism and catabolite regulation in Rhizobium leguminarum. bv. viciae. Microbiology, ***140****, 2787-2795.*

Portnoy, D.A. and Jones, S. (1994) The cell biology of Listeria monocytogenes infection. Ann. N. Y. Acad. Sci., 730, 15-25.

Portnoy, D.A., Moseley, S.L. and Falkow, S. (1981) Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of Yersinia enterocolitica pathogenesis. Infect. Immun., ***31****, 775-782.*

Pugsley. (1993) Microbiology review, ***57****, 50-108.*

Rafie-Kolpin, M., Essenberg, R.C. and Wyckoff, J.H., 3rd. (1996) Identification and comparison of macrophage-induced proteins and proteins induced under various stress conditions in Brucella abortus [published erratum appears in Infect Immun 1997 Mar;65(3):1137]. Infect. Immun., ***64****, 5274-5283.*

Rasool, O., Freer, E., Moreno, E. and Jarstrand, C. (1992) Effect of Brucella abortus lipopolysaccharide on oxidative metabolism and lysozyme release by human neutrophils. Infect. Immun., ***60****, 1699-1702.*

Reidl, J. (1999) Methods and Strategies for the Detection of Bacterial Virulence Factor Associated with Pathogenicity Island, Plasmids and Bacteriophages. In Hacker, J.B.K.a.J. (ed.) Pathogenicity Island and Other Mobile Virulence Element. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 13-32.

Rhodius, V. A. and Busby, S. (1998) Positive activation of gene expression. Curr. Opin. Microbiol., ***1****, 152-159*

Robertson, G.T. and Roop, R. (1999) The Brucella abortus host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice. Mol. Microbiol., ***34****, 690-700.*

Rosqvist, R., Forsberg, A. and Wolf-Watz, H. (1991) Intracellular targeting of the Yersinia YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. Infect. Immun., ***59****, 4562-4569.*

Rosqvist, R., Persson, C., Hakansson, S., Nordfeldt, R. and Wolf-Watz, H. (1995) Translocation of the Yersinia YopE and YopH virulence proteins into target cells is mediated by YopB and YopD. Contrib. Microbiol. Immunol., ***13****, 230-234.*

Rossbach, S., MacSpadden, B., Ganoff, M., and F. J. de Bruijn. (2000) Rhizobium meliloti rhizopine catabolism genes: distribution, role in competition and potential as marker gene to track microbes. http://nbiap.biochem.vt.edu/brarg/brasym95/rossbach95.htm.

Rossbach, S., Rasul, G., Schneider, M., Eardly, B. and de Bruijn, F.J. (1995) Structural and functional conservation of the rhizopine catabolism (moc) locus is limited to selected

Rhizobium meliloti strains and unrelated to their geographical origin. Mol. Plant. Microbe. Interact, ***8****, 549-559.*

Rossier, O., Wengelnik, K., Hahn, K. and Bonas, U. (1999) The Xanthomonas Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, ***96****, 9368-9373.*

Ruckdeschel, K., Roggenkamp, A., Lafont, V., Mangeat, P., Heesemann, J. and Rouot, B. (1997) Interaction of Yersinia enterocolitica with macrophages leads to macrophage cell death through apoptosis. Infect. Immun., ***65****, 4813-4821.*

Russel, M. (1994) Phage assembly: a paradigm for bacterial virulence factor export? Science, ***265****, 612-614.*

Sangari, F.J. and Aguero, J. (1996) Molecular basis of Brucella pathogenicity: an update. Microbiologia, ***12****, 207-218.*

Sansonetti, P.J., Kopecko, D.J. and Formal, S.B. (1982) Involvement of a plasmid in the invasive ability of Shigella flexneri. Infect. Immun., ***35****, 852-860.*

Schurig, G.G., Roop, R.M.d., Bagchi, T., Boyle, S., Buhrman, D. and Sriranganathan, N. (1991) Biological properties of RB51; a stable rough strain of Brucella abortus. Vet. Microbiol., ***28****, 171-188.*

Seifert, H.S. (1992) Molecular mechanisms of antigenic variation in Neisseria gonorrhoeae. Mol. Cell. Biol. Hum. Dis. Ser., ***1****, 1-22.*

Shea, J.E., Hensel, M., Gleeson, C. and Holden, D.W. (1996) Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in Salmonella typhimurium. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, ***93****, 2593-2597.*

Segal,G. and ShumanH.A. (1998) How is the intracellular fate of the Legionella pneumophila phagosome determined?, Trends in microbiology, ***6*** *(7), 253-255.*

Siebers, A. and Finlay, B.B. (1996) M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. Trends Microbiol., ***4****, 22-29.*

Simonet, M., Richard, S. and Berche, P. (1990) Electron microscopic evidence for in vivo extracellular localization of Yersinia pseudotuberculosis harboring the pYV plasmid. Infect. Immun., ***58****, 841-845.*

Sola-Landa, A., Pizarro-Cerda, J., Grillo, M.J., Moreno, E., Moriyon, I., Blasco, J.M., Gorvel, J.P. and Lopez-Goni, I. (1998) A two-component regulatory system playing a critical

role in plant pathogens and endosymbionts is present in Brucella abortus and controls cell invasion and virulence. Mol. Microbiol., **29**, *125-138.*

Smith. (1995) Virulence mechanisms of bacterial pathogen. ASM Press.

Smith, H. (1998) What happens to bacterial pathogens in vivo? Trends Microbiol., **6**, *239-243.*

Sola-Landa, A., Pizarro-Cerda, J., Grillo, M.J., Moreno, E., Moriyon, I., Blasco, J.M., Gorvel, J.P. and Lopez-Goni, I. (1998) A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in Brucella abortus and controls cell invasion and virulence. Mol. Microbiol., **29**, *125-138.*

Tatum, F.M., Morfitt, D.C. and Halling, S.M. (1993) Construction of a Brucella abortus RecA mutant and its survival in mice. Microb. Pathog., **14**, *177-185.*

Tempe, J., Petit, A., and Bannerot, H. (1982) Présence de substances semblables à des opines dans des nodosites de Luzerne. C. R. Acad. Sc., ***Série III***, *413-416.*

Trujillo, I.Z., Zavala, A.N., Caceres, J.G. and Miranda, C.Q. (1994) Brucellosis [published erratum appears in Infect Dis Clin North Am 1994 Sep;8(3):following table of contents]. Infect. Dis. Clin. North. Am., **8**, *225-241.*

Tsolis, R.M., Adams, L.G., Ficht, T.A. and Baumler, A.J. (1999) Contribution of Salmonella typhimurium virulence factors to diarrheal disease in calves. Infect. Immun., **67**, *4879-4885*

Tsui, H.C., Leung, H.C. and Winkler, M.E. (1994) Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an hfq insertion mutation in Escherichia coli K-12. Mol. Microbiol., **13**, *35-49.*

Verger, J.M., Grayon, M., Chaslus-Dancla, E., Meurisse, M. and Lafont, J.P. (1993) Conjugative transfer and in vitro/in vivo stability of the broad-host-range incP R751 plasmid in *Brucella spp. Plasmid*, **29**, 142-146.

Vogel, J.P., Andrews, H.L., Wong, S.K. and Isberg, R.R. (1998) Conjugative transfer by the virulence system of Legionella pneumophila. Science, **279**, *873-876.*

Wandersman. (1996) Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology, volume1, 955-966.

Weingart, C.L. and Weiss, A.A. (2000) Bordetella pertussis virulence factors affect phagocytosis by human neutrophils. Infect. Immun., **68**, *1735-1739.*

White P. J. (1951) Differenciation of smooth and non smooth colonies of Brucellae. J. Bacteriol., ***61****, 239-240.*

Wilkins, T.D. and Lyerly, D.M. (1996) Clostridium difficile toxins attack Rho. Trends Microbiol, ***4****, 49-51.*

Wilson. (1999) Bacteria-Host Interaction in Health and Disease.

Winans, S.C., Burns, D.L. and Christie, P.J. (1996) Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules. Trends Microbiol., ***4****, 64-68.*

Young, E.J. (1995) An overview of human brucellosis. Clin. Infect. Dis., ***21****, 283-289; quiz 290.*

Young, G.M., Schmiel, D.H. and Miller, V.L. (1999) A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, ***96****, 6456-6461.*