



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Caractérisation d'un mutant transpositionnel de *Brucella melitensis* 16M impliqué dans l'acquisition du fer

Haine, Valerie

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.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

CARACTERISATION D'UN MUTANT TRANSPOSITIONNEL DE *BRUCELLA*
MELITENSIS IMPLIQUE DANS L'ACQUISITION DU FER

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

Valérie Haine

Juin 2000

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>

Caractérisation d'un mutant transpositionnel de *Brucella melitensis* 16M impliqué dans l'acquisition du fer

HAINÉ Valérie

Résumé

L'assimilation du fer intervient dans la virulence de différents pathogènes. Une banque transpositionnelle de *Brucella melitensis* 16M a donc été criblée sur un milieu appauvri en fer. Parmi les 836 mutants testés, 1 mutant présente une répllication intracellulaire amoindrie tandis que 3 autres mutants montrent une croissance dépendante du fer et une déficience dans la capture du sidérophore, DHBA. Ce mémoire se base sur l'étude d'un de ces trois mutants (mutant F15). Les séquences adjacentes au transposon ont été obtenues par PCR inverse (IPCR). En ce qui concerne le mutant F15, le transposon se situe dans le l'extrémité terminale du gène *pth*. Quant au gène en aval de *pth*, il code pour une probable GTP-binding protein.

Le criblage d'une banque de *B. abortus* 544 a permis d'obtenir les séquences complètes de ces deux ORFs. Etant donné que *pth* est essentiel à la survie de *E. coli*, il pourrait l'être chez *Brucella*. On soupçonne donc, un effet polaire du transposon sur le gène *BuG* (*Brucella* iron uptake-putative GTP-binding protein). Des expériences de complémentation et d'intégration ont démontré l'implication de cette GTPase dans les phénotypes mutants. Nous formulons l'hypothèse que cette GTPase possède la même fonction chez *E. coli*.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2000

Promoteur: J.J. Letesson

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Jean-Jacques Letesson de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Merci Zette pour m'avoir suivie tout au long de ce mémoire. Ton énorme patience et ta disponibilité, le tout ponctué de "hein, dis?", m'ont beaucoup aidées.

Merci Anne pour ta présence dans les moments difficiles.

Je tiens également à remercier Ayman pour ses nombreux encouragements et sa gentillesse.

Merci Etienne pour ton humour et pour le chocolat dans les moments de déprime.

Merci aussi à Stef, David, Calou, Christian, Val, Luc, Bernard, Rose-May, Garçon, Xavier et Poos pour leurs conseils et leur aide.

Comment oublier mes compagnons de recherche? Sandrine l'araignée, Chantal la puce, Amélie le dragon, Marie l'oisillon, Jacques le renard, Nadia le papillon de nuit, Cindy la fouine et Olivier le chat, merci pour tous les bons moments passés ensemble.

Merci à Christophe pour tes "bonne chance" prodigués tout au long de mes études.

Merci aussi à Mélanie, tes ronronnements chaleureux m'ont maintes fois remontés le moral.

Merci enfin à ma maman, la confiance que tu m'accordes est mon bien le plus précieux.

INTRODUCTION	1
1. Capture du fer	1
1.1. Le fer	1
1.2. Systèmes de capture du fer	2
1.2.1. Les sidérophores	2
A. Nature et synthèse	2
B. Capture	3
C. Régulation de la capture	4
D. Génétique	4
1.2.2. Utilisation des protéines de l'hôte	5
1.2.3. Réduction du Fe ³⁺ en Fe ²⁺	6
2. Implication du fer dans la virulence	7
3. <i>Brucella</i>	8
3.1. Caractéristiques	8
3.2. Acquisition du fer	9
3.3. Les facteurs de virulence	11
 BUT DU MEMOIRE	 13
 MATERIEL ET METHODES	 14
1. Matériel biologique	14
1. 1. Souches bactériennes et plasmides	14
1. 2. Milieux de culture	15
2. Test de capture du DHBA	16
3. Manipulation et analyse de l'ADN	
3. 1. Extraction d'ADN plasmidique	16
3.1.1. Minipréparation d'ADN plasmidique d'E.coli	16
3.1.2. Midipréparation d'ADN plasmidique d'E.coli	17
3. 2. Restriction de l'ADN	17
3. 3. Extraction au phénol/chloroforme	18
3. 4. Précipitation à l'éthanol	18
3. 5. Electrophorèse en gel d'agarose	18
3. 6. Réaction de ligation	19
3. 7. Transformation bactérienne	19
3. 8. Amplification d'ADN par PCR	21
3. 9. Séquençage d'ADN	22
4. Conjugaison	23
5. Southern blot	23
5. 1. Marquage de la sonde.	23
5. 2. Electrophorèse en gel d'agarose	24
5. 3. Transfert et immobilisation	24
5. 4. Hybridation	25

5. 5. Détection et révélation	25
6. Criblage d'une banque de <i>B. abortus</i> 544	25
6. 1. Marquage de la sonde	25
6. 2. Colony blot	25
6. 3. Hybridation, détection et révélation	26
RESULTATS ET DISCUSSION	
27	
Données préliminaires	27
Hypothèse	28
1. Phénotype lié à la disruption de <i>pth</i>	29
2. Phénotype lié à un effet polaire	29
1. Criblage de la banque	29
2. Séquences et analyse de <i>pth</i> et <i>BuG</i>	30
3. Complémentation du mutant transpositionnel F15	31
3. 1. Clonage de l'ORF <i>BuG</i> dans le pBBR1MCS4	31
3. 2. Introduction du plasmide pBBRGTPA/B dans le mutant transpositionnel F15	32
3. 3. Tests phénotypiques	32
4. Création d'un mutant pour la GTPase de <i>B. melitensis</i> 16M	32
4. 1. Construction d'un plasmide pour la création d'intégrants chez <i>B. melitensis</i>	32
4. 2. Création d'un intégrant pour la GTPase potentielle de <i>B. melitensis</i> 16 M	33
4. 3. Tests phénotypiques	33
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	35
BIBLIOGRAPHIE	37

INTRODUCTION

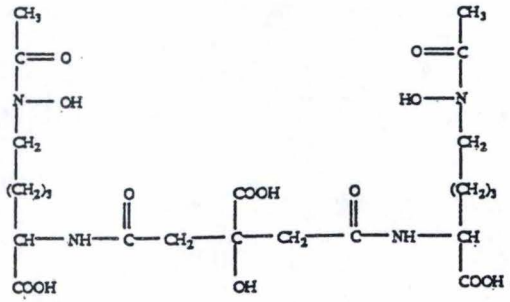
1. Capture du fer

1.1. Le fer

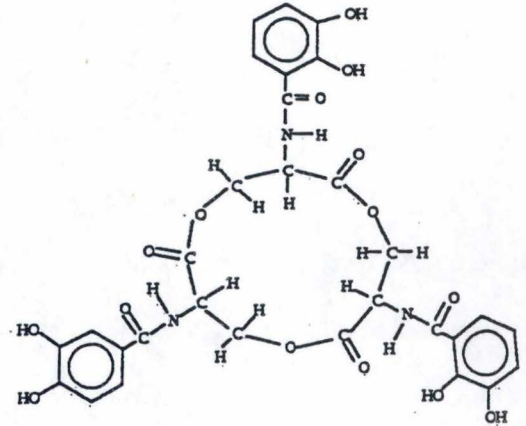
Le fer est le 4^{ème} élément le plus abondant sur terre (Lopez-Goni, Moriyon et al. 1992). Son acquisition est essentielle pour la croissance et la survie des microorganismes, à l'exception des lactobacilles qui ont remplacé l'utilisation du fer en tant que cofacteur par le manganèse ou le cobalt (Guerinot 1994) (Schubert, Fischer et al. 1999). Diverses enzymes requérant le fer ont été caractérisées: les cytochromes, la ferredoxine et la succinate déshydrogénase, par exemple, toutes trois intervenant dans le transport des électrons.

En conditions anaérobies, le fer est présent sous forme réduite (Fe^{2+}) qui est relativement soluble et de ce fait disponible (Earhart 1996). En présence d'oxygène, le fer est oxydé en fer ferrique (Fe^{3+}) qui forme des polymères plus ou moins stables et insolubles à pH neutre. La concentration en Fe^{3+} libre est donc limitée à 10^{-17}M , ce qui ne permet pas une croissance optimale des microorganismes dont le besoin est généralement compris entre 10^{-8} et 10^{-6}M (Litwin and Calderwood 1993) (Guerinot 1994).

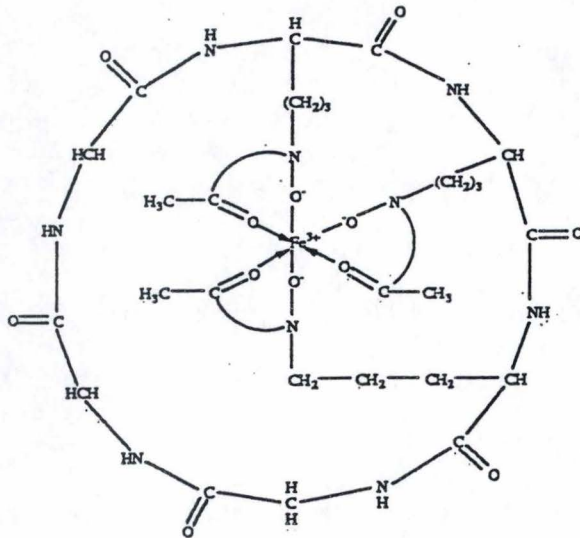
Dans l'hôte, le Fe^{3+} est lié par des glycoprotéines dont la transferrine dans le sérum et la lactoferrine dans toutes les sécrétions corporelles sauf l'urine. Le fer intracellulaire est, quant à lui, majoritairement séquestré par l'hémoglobine ou la ferritine (Guerinot 1994) (Litwin and Calderwood 1993)



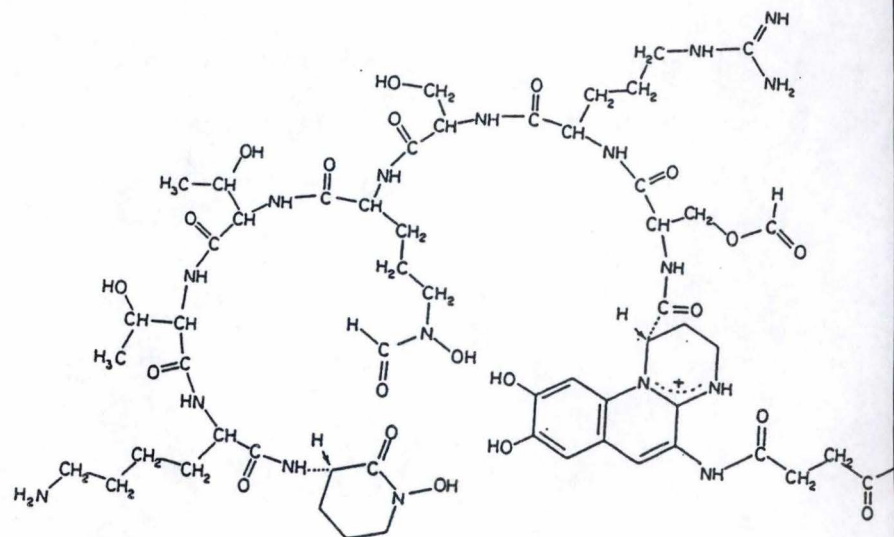
Aërobactine



Entërobactine



Ferrichrome



Pyoverdine

Figure 1 Structure de divers sidërophores (Griffiths, 1987). L'aërobactine et l'entërobactine sont produites entre autres par *E. coli*, la pyoverdine par *Pseudomonas aeruginosa* et le ferrichrome par certains champignons.

1.2. Systèmes de capture du fer

Etant donnée la faible disponibilité du Fe^{3+} , les microorganismes ont développé divers mécanismes pour acquérir cet ion:

-la production et l'utilisation de chélateurs du fer ferrique, les sidérophores.

-la capture directe des protéines de l'hôte liant le fer ou l'hème.

La capture du Fe^{2+} est probablement plus aisée et est parfois associée à une réduction active du Fe^{3+} (Guerinot 1994).

1.2.1. Les sidérophores

A. Nature et synthèse

Les sidérophores sont des composés de faible masse moléculaire (généralement entre 0,5 et 1 kDa) ayant une forte affinité pour le fer ferrique (Weinberg 1995). A l'heure actuelle, environ 100 sidérophores structurallement différents ont été décrits (fig. 1). Malgré cette grande variété, les sidérophores peuvent être classés en trois groupes : les catéchols, les hydroxamates ou les composés peptidiques (Earhart 1996).

-l'entérobactine, le prototype du catéchol, est un trimère cyclique de 2,3-dihydroxybenzoylsérine. Ce sidérophore est produit par toutes les souches d'*E. coli* et de *Salmonella enterica*.

-l'exemple type de l'hydroxamate, l'aérobactine, est constituée de 2 molécules de lysine hydroxylée et acétylée, reliées par une molécule de citrate (Earhart 1996).

-la pyoverdine est, quant à elle, un sidérophore peptidique produit par *Pseudomonas aeruginosa* (Bullen and Griffiths 1987).

La plupart des bactéries utilisent plusieurs sidérophores dont des sidérophores synthétisés par d'autres espèces, par exemple *Neisseria* utilise l'aérobactine et l'entérobactine produites par *E. coli* (Neilands 1994) et *E. coli* assimile le ferrichrome de champignon (Guerinot 1994). La majorité des gènes encodant les enzymes de la voie de biosynthèse des sidérophores sont connus (Earhart 1996). Par contre, on ne sait rien de leur sécrétion.

Sidérophore albomycine vitamine B12 T1, T5, $\Phi 80$

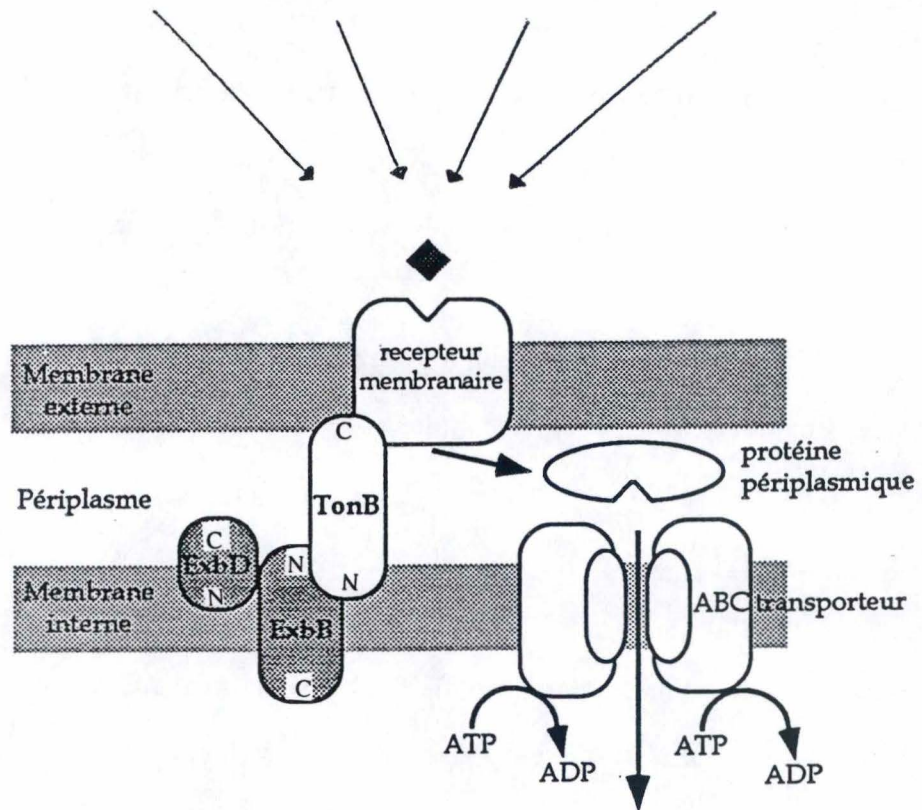


Figure 2 Représentation schématique du système Ton.

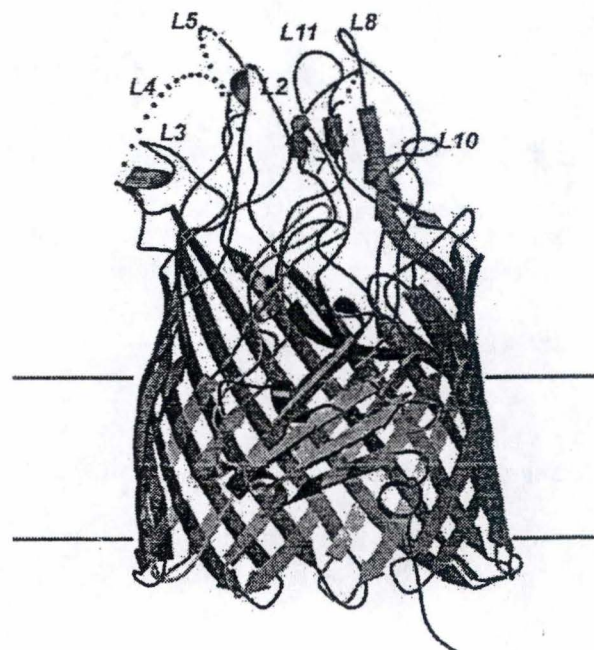


Figure 3 Structure du récepteur FepA spécifique de l'entérobactine similaire à celle de FhuA, récepteur du ferrichrome (Buchanan *et al.* 1999).

B. Capture

La capture d'un sidérophore chargé en fer nécessite trois partenaires : un récepteur spécifique, le système Ton constitué des protéines TonB, ExbB et ExbD et un ABC transporteur associé à une protéine périplasmique (fig. 2). Le sidérophore est tout d'abord reconnu par un récepteur spécifique localisé dans la membrane externe de la bactérie. Ce récepteur est un large tonneau β (22 brins) fermé par la partie N-terminale globulaire de la protéine (Guerinot 1994) (fig. 3). Suite à ce contact, le récepteur change de conformation et cela, indépendamment de TonB (Moeck and Coulton 1998). TonB, dont la majeure partie se situe dans le périplasma, est ancrée en membrane interne. Suite à un changement de conformation, elle interagit physiquement et de façon directe par son extrémité C-terminale avec le récepteur au niveau du tonneau β et d'une région pentapeptidique appelée la TonB-box. Cela entraînerait le retrait de la partie globulaire, permettant au sidérophore d'entrer dans l'espace périplasmique. L'énergie requise pour l'activité de TonB provient de la force protonmotrice. TonB reviendrait ensuite en membrane cytoplasmique probablement avec l'aide des protéines ExbB et ExbD (Moeck and Coulton 1998) (Braun, Killmann et al. 1999) (Letain and Postle 1997). La fonction de ces deux dernières protéines n'est pas entièrement déterminée mais leur présence est requise au fonctionnement de TonB. ExbB protège ExbD de la dégradation protéolytique et stabilise TonB (Ahmer, Thomas et al. 1995) (Bitter, Tommassen et al. 1993). Dans le périplasma, le sidérophore se lie souvent à une protéine périplasmique spécifique qui est associée à un complexe situé en membrane cytoplasmique. Ce complexe utilisant l'ATP porte le nom d'ABC (ATP-binding cassette) transporteur. L'ABC transporteur est constitué de quatre protéines dont deux contiennent un motif fortement conservé utilisant l'ATP et dont les deux autres sont chacune formées de six segments hydrophobes pour l'ancrage en membrane (Earhart 1996). Enfin, dans le cytoplasme, le fer serait libéré du sidérophore soit par l'action d'une réductase qui réduit le Fe^{3+} en Fe^{2+} permettant le recyclage du sidérophore soit, dans le cas de l'enterobactine, par

une estérase qui clive le sidérophore. L'estérase Fes est la seule protéine connue qui est essentielle pour la libération du fer lié à l'enterobactine.¹

C. Régulation de la capture

Concernant la régulation de la capture du Fe^{3+} via cette voie, il a été montré chez *E. coli* que tous les gènes impliqués dans la biosynthèse et le transport des sidérophores sont régulés négativement par la protéine Fur (Fe uptake regulation). Cette protéine de 17 kDa se lie au promoteur en présence de Fe^{2+} (Wooldridge and Williams 1993). Un site de liaison de 19 paires de base est présent dans la région promotrice de tous les gènes régulés négativement par le fer par exemple, en amont de *exbB* ou du récepteur membranaire (Braun and Hantke 1991).

D. Génétique

Du point de vue de la situation génomique de tous ces gènes encodant la capture d'un sidérophore, on remarque que la succession des ORF's encodant les protéines ExbB, ExbD et TonB est différente selon les espèces: chez *Vibrio cholerae* et *Neisseria gonorrhoeae*, l'ordre est *tonB exbB exbD* (Occhino, Wyckoff et al. 1998) (Biswas, Anderson et al. 1997) tandis qu'il est *exbB exbD tonB* chez *Pseudomonas putida* (Bitter, Tommassen et al. 1993) et *Brucella melitensis* (communication personnelle, I. Danese). Mais les particularités génétiques ne s'arrêtent pas là: *Vibrio cholerae* possède deux groupes de gènes encodant les protéines TonB, ExbB et ExbD et quant à *Pseudomonas aeruginosa*, il possède deux gènes *tonB* dont un est spécifique de la capture de l'hème (Occhino, Wyckoff et al. 1998) (Zhao and Poole 2000). Chez *E. coli*, seuls *exbB* et *exbD* sont en opéron (Ahmer, Thomas et al. 1995). Les gènes encodant les protéines de l'ABC transporteur sont la plupart du temps organisés en

¹ Il est intéressant de noter que le système Ton est essentiel non seulement pour la capture du Fe^{3+} mais aussi pour l'acquisition de la vitamine B12 qui intervient en tant que coenzyme entre autre dans la synthèse de la méthionine chez *S. enterica* (Braun 1995) (Earhart 1996). De plus, ce système est parasité par des colicines, des toxines produites par les bactéries à l'encontre de leurs voisines mais aussi par des phages (notamment, le phage T1) et des antibiotiques tel que l'albomycine (Lazdunski, Bouveret et al. 1998).

Utilisation du fer:

via des sidérophores	<i>Corynebacterium diptheriae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Mycobacterium sp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Shigella flexeneri</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>
lié à l'hème	<i>Escherichia coli</i> <i>Haemophilus ducreyi</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>
lié à la lactoferrine ou à la transferrine	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
en intracellulaire	<i>Legionella pneumophila</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Mycobacterium sp.</i>

Tableau 1 Mécanismes développés par les microorganismes pour acquérir le fer.

opéron. De plus, pour les systèmes de capture du citrate et du ferrichrome, le gène encodant le récepteur membranaire est localisé juste en amont des gènes encodant l'ABC transporteur. Quant au gène *fes* d'*E. coli* encodant la réductase de l'entérobactine, il est voisin des gènes de biosynthèse de l'entérobactine (Earhart 1996).

1.2.2. Utilisation des protéines de l'hôte

Les protéines de l'hôte liées au fer comme la transferrine, la lactoferrine et les protéines intracellulaires (comme la ferritine) mais aussi l'hème sont utilisées directement par certains pathogènes bactériens. Le système de capture du fer via ces protéines-fer ou hème liées semble parfois similaire au système de capture des sidérophores. Par exemple, l'opéron de capture de l'hème de *Yersinia enterocolitica* encode entre autre une protéine réceptrice localisée dans la membrane externe, HemR, qui possède un pourcentage d'homologie de 23% avec le récepteur de la vitamine B12 chez *E. coli*. En fait, l'utilisation de l'hème par cette bactérie requière la présence de TonB et la synthèse de HemR est régulée par Fur. La plupart des bactéries utilisant l'hème synthétisent aussi un ou des sidérophores, comme les souches de *Vibrio* et de *Yersinia* (Guerinot 1994) (Weinberg 1995).

A l'heure actuelle, on connaît au moins une quinzaine d'espèces de bactéries pathogènes qui utilisent directement le fer lié à la transferrine ou à la lactoferrine, parfois les deux. L'utilisation de ces protéines semble nécessiter un contact direct avec la bactérie mais le mécanisme exact de la libération du fer de ces protéines et de son transport à travers les membranes cellulaires reste à élucider (Guerinot 1994). Cependant, les récepteurs à la transferrine et de la lactoferrine sont spécifiques de la protéine utilisée et de la nature de l'hôte et sont dépendants ou non de TonB (Schryvers and Morris 1988). Ainsi, le récepteur à l'hémoglobine chez *Haemophilus ducreyi* dépend de TonB (Elkins, Totten et al. 1998). Chez *Neisseria gonorrhoeae* les récepteurs permettant l'utilisation du fer à partir de la lactoferrine, la transferrine ou l'hémoglobine sont dépendants de TonB alors que l'acquisition du citrate et de l'hémine est indépendante de TonB mais nécessite probablement un complexe qu'il reste à identifier (Biswas, Anderson et al. 1997). Chez les

Neisseriaceae et les Pasteurellaceae, nous avons un exemple plus connu de capture du fer liée à la lactoferrine, via un récepteur TonB-dépendant: l'ion ferrique traverse la membrane externe via le canal hydrophile du récepteur TbpA et est transféré à une protéine périplasmique FbpA. L'interaction spécifique entre FbpA et la perméase FbpB située en membrane cytoplasmique permet le transport du fer dans le cytoplasme par l'activité ATPase d'une autre protéine cytoplasmique, FbpC (Williams and Griffiths 1992).

1.2.3. Réduction du Fe³⁺ en Fe²⁺

Peu de choses sont connues au sujet de l'utilisation du Fe²⁺. Certains microorganismes comme *Legionella pneumophila* utilisent exclusivement le Fe²⁺ comme source de fer. *Listeria* quant à elle, tout comme *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, peut réduire le Fe³⁺ suite à la sécrétion de réductases, avant de le transporter (Guerinot 1994) (Vartivarian and Cowart 1999).

Deux gènes, *feoA* et *feoB*, encodant des protéines du système de capture du Fe²⁺ (*feo* system, pour ferrous uptake) chez *E. coli* ont été séquencés. Cet opéron *feoAB* code pour une petite protéine FeoA de 75 acides aminés et pour une protéine de membrane FeoB de 773 acides aminés montrant des homologies avec les ATPases, suggérant ainsi que l'énergie requise au transport du Fe²⁺ proviendrait de l'ATP (Earhart 1996) (Bellaire, Elzer et al. 1999). Le Fe²⁺ est soluble et peut donc probablement entrer dans l'espace périplasmique par simple diffusion au travers de porines (Tsolis, Baumler et al. 1996).

L'opéron *feoAB* est régulé par la protéine Fur et par un activateur transcriptionnel des gènes intervenant dans la respiration anaérobie, Fnr (Fumarate and nitrate reduction) (Earhart 1996).

2. Implication du fer dans la virulence

Chez l'hôte, un excès de fer augmente l'incidence des infections bactériennes et fongiques (Payne 1993). En conditions normales, les faibles concentrations en fer libre dans l'hôte jouent le rôle de signal environnemental pour induire l'expression de certains facteurs de virulence. L'exemple le plus connu de facteur de virulence régulé par le fer est la toxine diphtérique. L'ajout de fer inhibe au niveau transcriptionnel la production de cette toxine par *Corynebacterium diphtheriae*. Cette inhibition est due à la protéine Dtxr qui partage 39% d'identité au niveau nucléotidique avec Fur (Payne 1993) (Litwin and Calderwood 1993). En ce qui concerne l'implication des différents systèmes de capture du fer dans la virulence, le système Feo chez *S. enterica* est dispensable dans le sérum et en conditions intracellulaires mais par contre, il est nécessaire *in vivo* dans un environnement anaérobie tel que l'intestin (Tsolis, Baumler et al. 1996). Un mutant *tonB* chez *Haemophilus influenza* et *S. enterica* est incapable d'engendrer une maladie invasive chez les rats et les souris, respectivement. Donc, la protéine TonB est nécessaire à la virulence de ces pathogènes dans ces modèles animaux (Jarosik, Sanders et al. 1994). De plus, un mutant de *Haemophilus ducreyi* pour le récepteur TonB-dépendant de l'hémoglobine est atténué chez l'humain (Al-Tawfiq, Fortney et al. 2000). De même, un mutant de *Neisseria gonorrhoeae* incapable de se lier à la transferrine et à l'hémoglobine est atténué en souris (Genco, Chen et al. 1991). Parallèlement, plusieurs évidences indiquent que l'expression du récepteur à la transferrine est induit lors de l'infection (Williams and Griffiths 1992). Ces résultats indiquent que ces protéines de l'hôte sont une source critique de fer lors de l'infection par *H. ducreyi* et *N. gonorrhoeae*.

Parmi les conditions rencontrées par les pathogènes intracellulaires, les macrophages et les cellules polymorphonucléaires possèdent des mécanismes antimicrobiens dont certains impliquent le fer. Dans les neutrophiles, les granules secondaires libèrent de la lactoferrine diminuant ainsi le taux intracellulaire de fer libre (Litwin and Calderwood 1993). De même, un des mécanismes de défense des macrophages est d'amoindrir la quantité de fer grâce à la diminution du nombre de récepteurs membranaires à la transferrine (Jiang and Baldwin 1993).

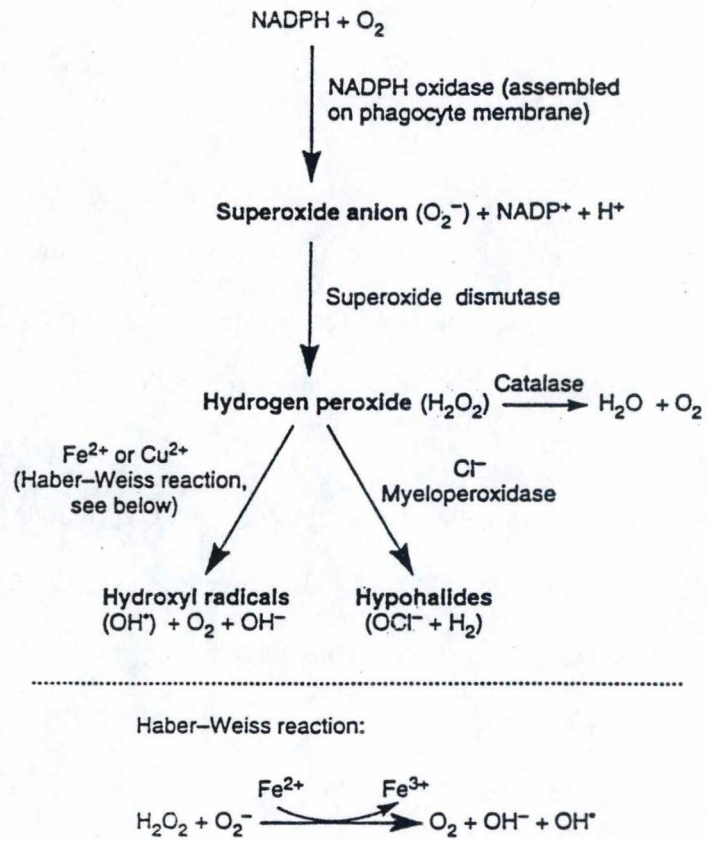


Figure 4 Réactions de l'explosion respiratoire (Baldwin *et al.*, 1993)

Lors de la phagocytose, le macrophage activé provoque l'explosion respiratoire, donnant lieu à une réduction monovalente de l'oxygène. Ces réactions sont responsables de la formation d'intermédiaires très réactionnels qui peuvent réagir avec la plupart des molécules biologiques. Parmi ces réactions, la réaction de Haber-Weiss est catalysée par le fer (Wooldridge and Williams 1993) (Wood 1993) (fig. 4). Les sidérophores auraient deux rôles potentiels dans la survie bactérienne intracellulaire: la séquestration du fer nécessaire à la réaction de Haber-Weiss et la protection de la bactérie contre les radicaux libres en les fixant, comme le fait le catéchol produit par *Azotobacter vinelandii* (Cornish and Page 1998). Malgré ces conditions, ni *S. enterica*, ni *Shigella flexneri* ni *Mycobacterium sp.* n'ont besoin de sidérophore pour leur croissance intracellulaire (Lawlor, Daskaleros et al. 1987) (Nassif, Mazert et al. 1987) (Lambrecht and Collins 1993).

3. Brucella

3.1. Caractéristiques

Les bactéries du genre *Brucella* sont de petits coccobacilles Gram négatifs qui sont aérobies strictes. Le genre contient trois espèces principales, chacune ayant un hôte préférentiel: *B. melitensis* (la chèvre et le mouton), *B. suis* (le porc pour le biovar 1) et *B. abortus* (le bovin) (Michaux-Charachon, Bourg et al. 1997). Ces espèces sont dangereuses pour l'homme. Ces bactéries sont des parasites intracellulaires facultatifs provoquant dans la plupart des cas, des infections chroniques chez les animaux et les humains. La brucellose bovine, la plus étudiée, se manifeste par un tropisme de la bactérie entre autres pour les organes reproducteurs et les glandes mammaires, provoquant l'avortement ou la naissance d'un veau peu viable ainsi que la présence de *Brucella* dans le lait. Chez le mâle, la stérilité est fréquente (Pizzaro-Cerda, Moreno et al. 1999) (Godfroid, Boelaert et al. 1995). L'homme est le plus souvent infecté suite à un contact direct avec l'animal malade ou à la consommation de produits laitiers non pasteurisés, ce qui peut déclencher des fièvres,

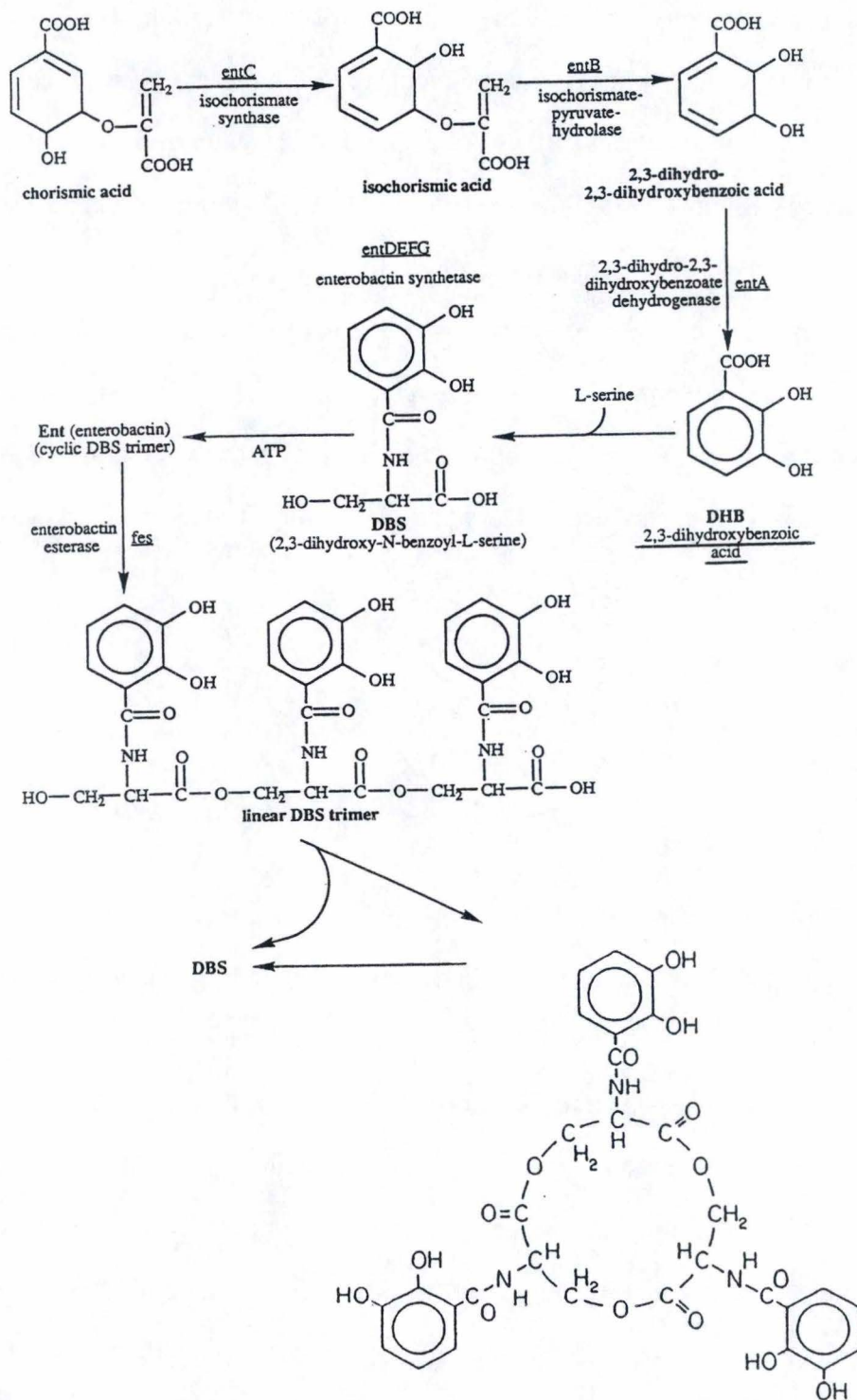


Figure 5 Biosynthèse de l'entérobactine(Griffiths, 1987)

frissons, sueurs, fatigue, assez asymptomatiques ainsi que des complications articulaires et neurologiques (Liautard, Gross et al. 1996).

On ignore les mécanismes par lesquels *Brucella* adhère aux muqueuses et pénètre l'épithélium. Les *Brucella* ayant échappé à la réaction inflammatoire, à savoir l'infiltration des neutrophiles et des monocytes dans la sous muqueuse, se déplacent vers les ganglions locaux par la voie lymphatique. Si la bactérie n'est pas éliminée, elle peut se propager via le sang le plus souvent sous forme intracellulaire dans des neutrophiles et des macrophages, se dirigeant ainsi vers différents tissus tels que les tissus lymphoïdes, les glandes mammaires, les organes reproducteurs mais aussi, moins fréquemment, les yeux ou les articulations. Au cours de son cycle infectieux, *Brucella* se réplique aussi bien dans les phagocytes professionnels que dans les phagocytes non professionnels tels que les trophoblastes, qui sont des cellules placentaires (Tibor 1999).

3.2. Acquisition du fer

Jusqu'à ce jour, le seul sidérophore détecté chez les espèces de *Brucella* est l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque (DHBA) (Lopez-Goni, Moriyon et al. 1992) (Lopez-Goni and Moriyon 1995). Le DHBA, qui est le précurseur de l'enterobactine, est également produit par d'autres bactéries, notamment par *E. coli* et *Bacillus subtilis* (Rowland, Grossman et al. 1996) (Hantke 1990). La biosynthèse de l'enterobactine est divisée en deux parties (fig. 5):

- la transformation du chorismate en DHBA, cette réaction requérant trois enzymes, EntC/B et EntA

- la synthèse de l'entérobactine à partir du DHBA et de la sérine. Cette dernière réaction nécessite un complexe multienzymatique (EntD, E, F et G), et conduit à un second précurseur, le 2,3-dihydroxybenzoïlsérine (DBS). Les monomères de DBS sont ensuite liés par estérification, formant ainsi l'enterobactine (Earhart 1996).

Bellaire *et al.* a séquencé tous les gènes conduisant à la biosynthèse de l'entérobactine chez *B. abortus*. Suite à des essais de complémentation chez des mutants correspondants de *E. coli*, il a été démontré que *entD* et *entF* ne sont pas fonctionnels chez *Brucella*. En fait, le

gène *entF* de *B. abortus* est tronqué par rapport à celui de *E. coli*, expliquant que *Brucella* ne synthétise pas l'entérobactine. Un promoteur contenant un site de liaison au régulateur *fur* a été mis en évidence en amont de *entC*. Ce promoteur est en effet régulé par le fer (communication personnelle, B. Bellaire).

Il a été démontré que le DHBA intervenait dans la capture du fer chez *B. abortus* (Lopez-Goni, Moriyon et al. 1992). De plus, le DHBA pourrait avoir un rôle de protection contre les mécanismes destructeurs dépendant de l'O₂ tout comme démontré chez *A. vinelandii* et suggéré chez *Nocardia asteroides* (Lopez-Goni, Moriyon et al. 1992) (Lopez-Goni and Moriyon 1995) (Cornish and Page 1998). Mais le mutant *entC* de *B. abortus* ne produisant pas de DHBA ne semble pas plus sensible que la souche sauvage à l'H₂O₂.

La croissance du mutant *entC* de *B. abortus* sur un milieu appauvri en fer n'est pas atteinte (communication personnelle, B. Bellaire). On pourrait donc conclure que *Brucella* sécrèterait au moins un second sidérophore différent du DHBA qui aurait d'ailleurs été isolé et caractérisé (communication personnelle, G. C. Lopez).

La capture du DHBA chez *E. coli* se fait via différents récepteurs membranaires. L'entérobactine est capté par FepA, le DBS par Fiu, FepA et de façon moindre par Cir tandis que le DHBA est capturé par Fiu et Cir et un peu moins par FepA (Wooldridge and Williams 1993) (Hantke 1990). Malgré la présence de ces récepteurs membranaires, l'entrée du DHBA chez *E. coli* n'apparaît pas totalement dépendant de TonB. De plus, un mutant *feoB* d'*E. coli* semble partiellement déficient dans l'entrée du DHBA (Hancock, Hantke et al. 1977). Chez *Brucella*, Lopez Goni *et al.* n'ont pas constaté d'induction de récepteurs membranaires suite à une croissance sur un milieu pauvre en fer. Ils en déduisent que le sidérophore de *Brucella* n'aurait pas de récepteur ou un récepteur non régulé par le fer (Lopez-Goni, Moriyon et al. 1992). Mais rappelons que *B. melitensis* possède les gènes *exbB*, *exbD* et *tonB* et que la protéine ExbB est bien impliquée dans la capture du DHBA (communication personnelle, I. Danese). La capture du DHBA par *Brucella* est donc dépendant du système Ton et serait par conséquent aussi dépendante d'énergie et d'un récepteur. Quant à l'utilisation directe des

protéines de l'hôte et à la production de réductases, aucune donnée n'est connue à ce jour chez *Brucella*.

3.3. Les facteurs de virulence

La recherche a priori de facteurs de virulence de *Brucella* s'est d'abord focalisé sur le composant structural principal de sa membrane externe, à savoir le lipopolysaccharide (LPS) (fig. 6). Godfroid *et al.* a montré que la chaîne O du LPS est essentielle à la survie de *B. melitensis* en souris mais pas en macrophages bovins (Sangari and Aguerro 1996) (Godfroid, Taminiau *et al.* 1998). Autre facteur de virulence, HtrA (high-temperature-requirement A protein), une protéase produite par la bactérie en conditions de stress, protège *B. abortus* des dégâts oxydatifs et contribue à sa résistance aux phagocytes de l'hôte durant les premiers jours de l'infection (Elzer, Phillips *et al.* 1996). Faisant suite aux recherches a priori, des recherches aléatoires ont été appliquées à *Brucella*. Par exemple, la sélection de mutants, obtenus par transposition, présentant un phénotype atténué. Cette technique a permis entre autre la découverte d'un système de régulation à deux composants, avec une protéine régulatrice et une protéine senseur. Le mutant pour ce système est avirulent en souris et ne parvient pas à se répliquer en macrophages et en cellules HeLa probablement parce qu'il n'inhibe pas la fusion phagolysosomale (Sola-Landa, Pizarro-Cerda *et al.* 1998). Cette technique a également contribué à la découverte chez *B. suis* d'un système de sécrétion de type IV, qui est homologue au système VirB d'*Agrobacterium tumefaciens*. Les gènes *VirB* ont été séquencé chez *B. suis* et *B. melitensis*. Des mutants *VirB* chez *B. suis* sont atténués en macrophages et en cellules HeLa (O'Callaghan, Cazevieille *et al.* 1999) (communication personnelle, R. M. Delrue).

En ce qui concerne l'implication de l'acquisition du fer dans la virulence de *Brucella*, Bellaire *et al.* a montré qu'un mutant *entC* de *B. abortus* incapable de synthétiser le DHBA n'est pas atténué en macrophages murins et est capable d'établir et de maintenir une infection chronique de la rate et du foie chez les souris BALB/c suite à une injection intrapéritonéale.

Tout comme *S. enterica*, *Shigella flexneri* et *Mycobacterium* sp., *B. abortus* n'a donc pas besoin de son sidérophore en condition intracellulaire. Une infection intrapéritonéale conduit probablement la bactérie directement en intracellulaire, ce qui pourrait expliquer que la virulence du mutant *entC* soit similaire à celle de la souche sauvage. Cependant, ce mutant *entC* est atténué chez la chèvre gestante suite à une voie d'infection comprenant le passage par les muqueuses. Sur base de ces résultats, on peut se demander si l'implication du DHBA dans la virulence est dépendante de la voie d'infection utilisée et donc des biotopes rencontrés par la bactérie, ou spécifique de l'hôte ou encore de l'état de gestation de l'hôte (Bellaire, Elzer et al. 1999).

BUT

Le mutant transpositionnel de *B. melitensis* 16M, F15, présente une croissance amoindrie sur un milieu appauvri en fer et une déficience dans la capture du sidérophore produit par *Brucella* sp. Le transposon chez ce mutant, a sauté à la fin du gène *pth* (encodant une peptidyl t-RNA hydrolase) qui se situe en amont du gène *BuG* (*Brucella* iron uptake-putative GTP binding protein).

Le but de ce travail est de déterminer si les phénotypes du mutant F15 pourrait être engendré par un effet polaire sur *BuG*. En effet, *pth* est essentiel chez *E.coli* et pourrait donc l'être chez *Brucella*. De plus, la GTPase encodée par *BuG* présente une certaine similarité avec une protéine impliquée dans la capture du fer ferreux.

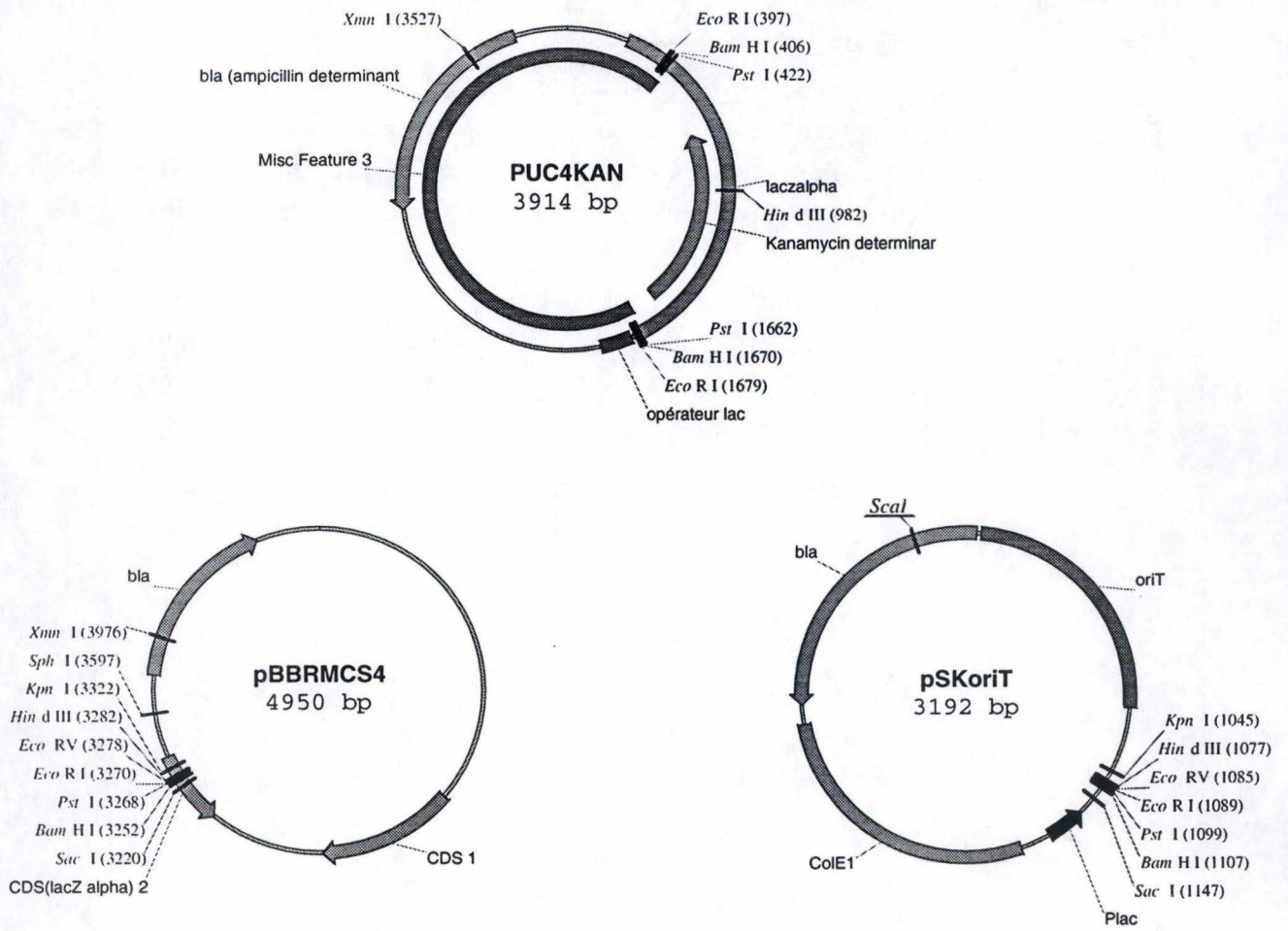


Figure 1: Représentation des plasmides utilisés lors de ce travail.

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel biologique

1. 1. Souches bactériennes et plasmides

Souches bactériennes

E. coli:

DH5 α

Quelques particularités intéressantes du génotype de cette souche:

recA1: réduit la recombinaison au millième de son taux normal, minimisant ainsi la recombinaison entre ADN endogène et exogène.

endA1: améliore le rendement et la qualité des préparations d'ADN plasmidique à petite échelle en diminuant le taux d'endonucléases.

Cette souche DH5 α est délétée dans l'opéron lactose (Δlac) mais elle peut être complétée par LacZ α .

S17-1

La souche d'*E. coli* S17-1 (thi pro recA hsdR RP4-2-tet::Mu aphA::Tn7) est donc entre autres, résistante à la streptomycine (Sm^R) et possède le plasmide RP4 intégré dans son chromosome bactérien, qui encode différentes protéines indispensables au transfert d'ADN vers une bactérie receveuse.

E. coli DH10B

Cette souche est utilisée pour la transformation pas divers plasmides ou produits de ligation. Son génotype est le suivant : F⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80dlacZ Δ lacX74 endA1 recA1 deoR Δ (ara, leu)7697 araD139 galJ galK nupG rpsL λ .

Brucella sp.:

La souche de référence utilisée tout au long de ce travail est: *B. melitensis* biovar 1 16M, phénotype Smooth, résistante à l'acide nalidixique (Nal^R, mutant spontané) recue de J.-M. Verger, INRA, Tours, France (l'agglutination se produit avec un anti-sérum M). Cette souche est représentative de la souche *B. melitensis*. Une autre souche est *B. abortus* biovar 1 544, souche lisse.

Plasmides bactériens

pSKoriT

Ce plasmide est un dérivé de pBluescript SK(-) dans lequel une origine de transfert conjugatif oriT a été clonée (Anne Tibor *et al.*) (Figure 1). Il porte une origine de répllication ColE1 non fonctionnelle chez *Brucella* et est donc suicide dans cette bactérie. Il porte aussi le gène bla encodant la résistance à l'ampicilline.

Nom	Abréviation	Concentration Solution stock (mg/ml)	Concentration standard utilisée (µg/ml)
Acide nalidixique	Nal	25	25
Kanamycine	Kan	25	25
Ampicilline	Amp	50	50
Streptomycine	Sm	10	5

Tableau 1: Concentrations stock et concentrations standards des différents antibiotiques utilisés.

pBBR1MCS4

Ce plasmide de 4950 pb porte le gène de résistance à l'ampicilline, le gène *lacZ'* contenant le site multiple de clonage du pBluescript (Figure 1). En plus de son origine de répllication REP compatible chez *Brucella* sp., ce vecteur porte une origine de transfert RK2, qui permet son transfert conjugatif.

pUC 4K

Ce plasmide de 3914 pb (Pharmacia) porte un gène encodant la résistance à la kanamycine (figure 1). Le gène Kan^R est bordé de part et d'autre par 4 sites de restriction.

Test blanc/bleu

Les éléments génétiques portés par la souche DH5 α (Δlac) ne lui permettent pas d'avoir une activité β -galactosidase normale. Une complémentation intragénique avec un plasmide apportant LacI (fragment non opérationnel du gène de régulation de l'opéron lactose) et un fragment du gène *lacZ* (partie N-terminale de la β -galactosidase) peut néanmoins se faire. Lorsque cette complémentation est effectuée, la bactérie possède une β -galactosidase fonctionnelle. Celle-ci est mise en évidence par son action sur l' X-gal, substrat chromogène qui donne un composé bleu lorsqu'il est clivé. Le test blanc met en évidence les bactéries présentant un plasmide contenant un insert car celui-ci est disrupté dans le gène *lacZ'* et la β -galactosidase n'est donc plus fonctionnelle. La colonie bactérienne apparaîtra blanche. L'IPTG, dans le milieu de culture, permettra l'expression de *lacZ*.

1. 2. Milieux de culture

Après préparation, les milieux sont stérilisés par autoclavage (20min. à 120°C).

Milieu Luria Bertani (LB)

Forme liquide : -hydrolysate de caséine (peptone) 1g/100ml
-NaCl 0.5g/100ml
-Yeast extract 0.5g/100ml

Forme solide : Ajouter 2% d'agar

Milieu 2YT

Forme liquide : même composition que le LB liquide mais avec 2x plus de yeast extract (0.5g/100ml de Yeast extract).

Milieu SOC

-Yeast extract 0.5%
-Peptone
-KCL 2.5mM
-NaCl 10mM
-MgCl₂ 10mM
-MgSO₄ 10mM
-Glucose 20mM

Milieu appauvri en fer

Milieu LB additionné de chélateur de fer tel que l'EDDHA. Les concentrations en chélateur EDDHA de 0,15 et 30 μ g/ml ont été utilisées lors du travail.

2. Test de capture du DHBA

Afin de tester la capacité de *Brucella* à utiliser le DHBA, un test de croissance des souches bactériennes se fait dans un milieu totalement déplété en fer où le DHBA est l'unique source de fer ferrique. Les souches à

tester et témoins (souche parentale et le mutant *exbB* de *B. melitensis* 16M) poussent donc en parallèle dans un milieu témoin riche en fer (LB), un milieu sans fer (LB+deferoxamine (DFA) 500µM, chélateur de fer) et enfin un milieu appauvri en fer mais additionné de DHBA (500µM).

3. Manipulation et analyse de l'ADN

3. 1. Extraction d'ADN plasmidique

3.1.1. Minipréparation d'ADN plasmidique d'*E.coli*

Une miniprep comprend 5 étapes : la lyse alcaline des bactéries, la précipitation des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, le lavage de l'ADN plasmidique et sa resuspension.

- Ensemencer 5ml de milieu liquide (LB + antibiotiques) avec une colonie isolée.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.
- Centrifuger 1,5ml de la culture dans un eppendorf (pendant 5 minutes à 12500 rpm) et éliminer le milieu de culture.
- Resuspendre le culot bactérien dans 300 µl de S1.
- Ajouter 300 µl de S2 et mélanger doucement en retournant, incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 300 µl de S3 et mélanger doucement en retournant, incuber 10 minutes sur glaces.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C (à 14000 rpm ou vitesse maximale) et récupérer le surnageant.
- Précipiter l'ADN en ajoutant 0.7 volume d'isopropanol, homogénéiser.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C (à 12500 rpm), éliminer le surnageant.
- Laver l'ADN, en ajoutant 300 µl d'éthanol 70% et centrifuger 5 minutes à 4°C (à 12500 rpm). Eliminer prudemment l'éthanol.
- Sécher le culot d'ADN.
- Resuspendre dans 20 d'H₂O distillée stérile .

Solutions

- *S1: RNase A 100 µg/ml
Tris-HCL 50mM pH 8,0
EDTA 10mM,
à conserver à 4°C.
- *S2: NaOH 200mM
SDS 1%,
à conserver à température ambiante.
- *S3: Kac 3.0 M pH 5,5,
à conserver à 4°C.

3.1.2. Midipréparation d'ADN plasmidique d'*E.coli*

Cette technique comprend l'utilisation d'une colonne dans un kit commercial Nucleobond AX 100 échangeuse d'anions qui permet de préparer l'ADN plasmidique en éliminant les protéines, l'ARN et l'ADN génomique.

- Préculture : ensemencer 5 ml de milieu liquide (LB+antibiotiques) avec une colonie bactérienne.
- Ensemencer avec 25 à 100 ml suivant la préparation du plasmide à haut ou bas nombre de copie de ce même milieu liquide avec la préculture.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.
- Culoter la culture à 3000 rpm pendant 15 minutes, éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 4 ml de S1.
- Ajouter 4ml de S2 et mélanger doucement, laisser 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 4 ml de S3 et agiter doucement, laisser 15 minutes sur glace.
- Centrifuger 25 minutes à 12000 rpm (Sorvall, rotor SS34), à 4°C et récupérer le surnageant.
- Equilibrer la colonne avec 2 ml de tampon N2.
- Déposer le surnageant sur la colonne équilibrée .
- Laver la colonne avec 2 X 4ml de tampon N3.
- Eluer l'ADN plasmidique avec 2 ml de tampon N5.
- Précipiter l'ADN avec 0.7 volume d'isopropanol.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C (à 12000 rpm) et en éliminer le surnageant.
- Laver à l'éthanol 70% et centrifuger 5 minutes à 4°C (à 12000 rpm). Eliminer le surnageant.
- Sécher le culot.
- Resuspendre dans 100µl d'H₂O distillée stérile.

Solutions

*Les solutions S1, S2 et S3 sont décrites dans le protocole de minipréparation d'ADN plasmidique.

*Tampon d'équilibration N2 : NaCl 50 mM
MOPS 50mM
Ethanol 15%
Triton X-100 0,15%

*Tampon de lavage N3 pH7,0 : NaCl 1M
MOPS 50mM
Ethanol 15%

*Tampon d'éluion N5 pH8,2 : NaCl 1,25 M
Tris-Hcl 50mM
Ethanol 15%

3. 2. Restriction de l'ADN

Le clivage de l'ADN bicaténaire à des sites précis se fait par des endonucléases de restriction qui reconnaissent de courtes séquences souvent palindromiques de 4 à 6 paires de bases.

- x µl d'ADN à restreindre en suspension dans de l'eau distillée.
- 1/10^{ème} de tampon de restriction 10x associé à l'enzyme.

-l'enzyme de restriction: au maximum 1/10^{ème} du volume final. Entre 2 et 10 unités d'enzyme par μg d'ADN (1 unité correspondant à la quantité d'enzyme nécessaire pour restreindre complètement 1 μg d'ADN du phage λ en 1 heure à 37°C dans un volume de 25 μl).

-Amener au volume final avec de l'eau distillée stérile.

-Incuber au minimum 45 minutes à la température optimale pour l'enzyme (souvent 37°C). L'enzyme peut être soit inactivée par chauffage (15 à 20 minutes à 65 °C) si l'enzyme est thermosensible, soit éliminée par une extraction phénol/chloroforme.

3. 3. Extraction au phénol/chloroforme

Afin d'extraire les protéines d'une solution d'ADN, on utilise le mélange phénol/chloroforme. Des protéines dénaturées se trouvent à l'interface entre la phase organique et la phase aqueuse.

Méthode

-Porter le volume de la solution à un minimum de 100 μl .

-Ajouter 1 volume d'une solution de phénol saturé en chloroforme.

-Vortexer.

-Centrifuger 5 minutes dans une microfuge à vitesse maximale.

-Prélever avec précaution la phase supérieure, en évitant de reprendre l'interface.

-Précipiter l'ADN à l'éthanol.

3. 4. Précipitation à l'éthanol

A 1 volume de réaction, ajouter 1/10 NaAc 3M pH 4,8 et 2 volumes d'éthanol 100% froid (-20°C)

-Vortexer et placer 30 minutes à -80°C.

-Centrifuger à vitesse maximale pendant 25 minutes à 4 °C dans une minifuge, éliminer le surnageant prudemment.

-Laver en ajoutant de l'éthanol 70% froid

-Centrifuger 5 minutes à 4 °C, éliminer le surnageant.

-Resuspendre dans un volume adéquat d'eau stérile.

3. 5. 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 inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer.

La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Nous avons utilisé comme marqueurs de taille l'ADN du phage λ coupé par *Hind* III et le SmartLadder commercialisé par Eurogentec.

Les fragments d'ADN sont visualisés au moyen du bromure d'éthidium. Celui-ci se lie à l'ADN bicaténaire en s'intercalant entre les bases de la double hélice. Etant fluorescent, le bromure d'éthidium marque l'ADN et celui-ci est visible sous illumination UV. Il faut cependant noter que la fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille, mais aussi à la quantité d'ADN présente. 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.

Méthode

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

- Préparer les échantillons en ajoutant 1/10 de solution d'alourdisseur.
- 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).

Solution, tampons et matériel

- * Solution de bromure d'éthidium: $2\mu\text{g/ml}$
- * Solution d'alourdisseur: -glycerol 50%
 - EDTA 100mM
 - SDS 1%
 - Bleu de bromophénol
- * Tampon TAE (50 fois concentré): -Tris-HCl, pH 8,0 40mM
 - EDTA 0,002M
 - Acide acétique glacial 57,1 ml/litre

3. 6. Réaction de ligation

Pour lier de manière covalente deux fragments d'ADN, on utilise l'ADN ligase du phage T4 (Boehringer, $1\text{U}/\mu\text{l}$). Elle catalyse la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyl 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^{2+} .

Méthode

- Mélanger dans un tube Eppendorf les fragments d'ADN à liquer.
- 1/10^{ème} du volume final de tampon de ligation 10x.
- Le nombre d'unités de ligase nécessaire (dépendant de la quantité d'ADN).
- Compléter avec de l'eau distillée stérile.
- Incuber, à 16°C une nuit pour des extrémités cohésives et minimum 3 heures à température ambiante pour des bouts francs.

3. 7. Transformation bactérienne

La transformation de bactéries compétentes consiste à faire entrer de l'ADN exogène (dans ce cas, un plasmide) dans une bactérie.

1. Electroporation bactérienne

L'électroporation est une méthode de transformation de bactéries, où un choc électrique permet l'introduction l'ADN exogène dans la bactérie.

Méthode:

Préparation de cellules compétentes

Par une suite de lavages, les bactéries sont désalées.

- Inoculer 500 ml de LB liquide avec 0,5 ml d'une culture fraîche de bactérie *E. coli*.

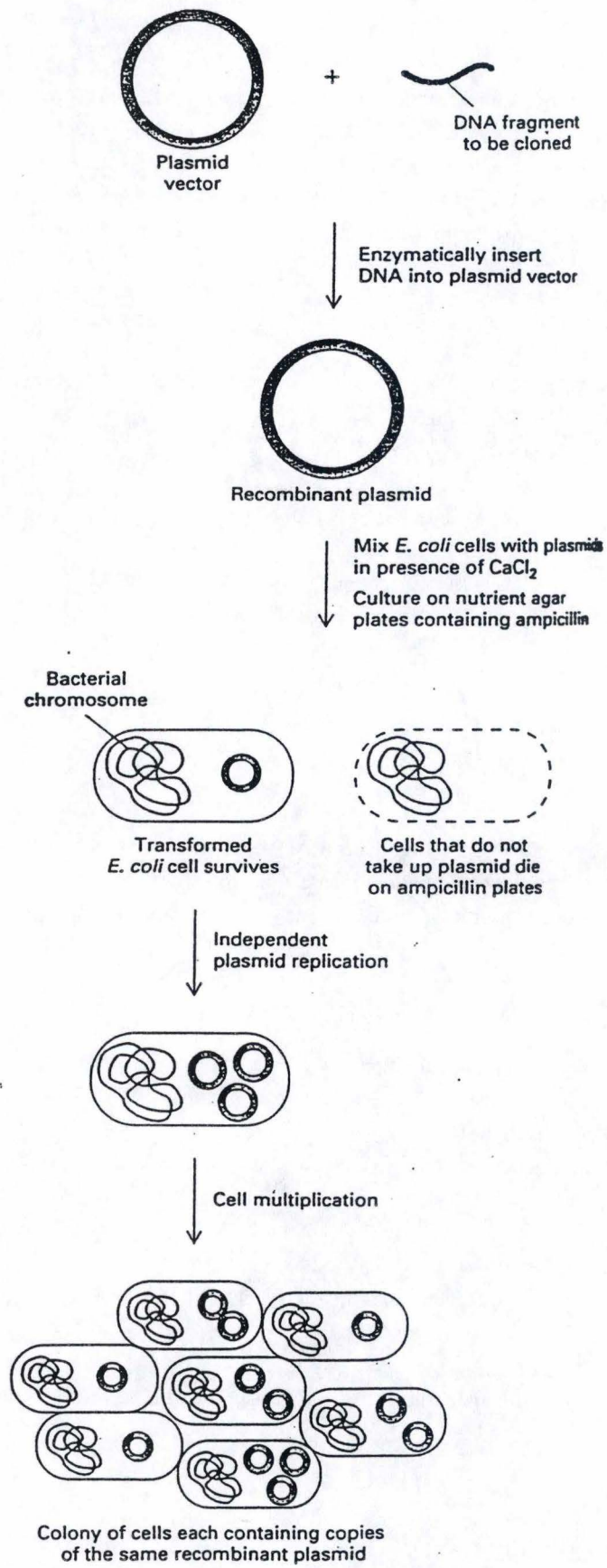


Figure 2: Principe de la transformation bactérienne.

- Incuber les bactéries à 37 °C sous forte agitation jusqu'à ce que la culture aie atteint une D.O. de 0,5 à 0,8 à 550 nm (phase mi-log de croissance).
 - Placer la culture 15 à 30 minutes dans la glace, culoter les bactéries en centrifugeant à 4°C, à 3000 rpm pendant 15 minutes.
 - Eliminer le surnageant. Resuspendre le culot dans 500 ml d'eau MilliQ stérile froide.
 - Centrifuger.
 - Resuspendre dans 250 ml d'eau froide et centrifuger.
 - Resuspendre dans 10 ml d'eau froide contenant 10% de glycérol. Centrifuger.
 - Resuspendre dans un volume final de 1 à 2 ml d'eau froide contenant 10% de glycérol. (La concentration cellulaire est d'environ 1 à 3.10¹⁰ cellules/ml.
 - Cette suspension peut être aliquotée sur glace et conservée à -80°C.
- Electroporation
- Laisser dégeler les cellules électrocompétentes sur glace.
 - Placer dans un eppendorf stérile, dans 100 µl de cellules compétentes, ajouter l'ADN plasmidique ou le mélange de ligation.
 - Mélanger et placer la solution 1 minute sur glace.
 - Transférer dans la cuvette d'électroporation, refroidie sur glace, le contenu de l'eppendorf.
 - Placer la cuvette dans l'électroporateur (BIO RAD Gene Pulser™)
- Régler l'appareil sur:
 - capacité 25 µF
 - résistance 200 Ω
 - différence de potentiel 22,5 Kv/cm
 - Décharger le condensateur (choc électrique).
 - Ajouter rapidement 1 ml de SOC.
 - Transférer dans un eppendorf et laisser 1 heure à 37°C.
 - Etaler sur milieu sélectif et laisser pousser une nuit à 37°C.

2. Transformation chimique

Pour cette transformation, la paroi et la membrane bactérienne sont rendues perméables à l'ADN: la bactérie est alors dite compétente (figure 2). Cette technique n'a été utilisée lors de ce travail que pour transformer des *E. coli* S17-1.

Des bactéries gram-négatives *E. coli* en début de phases exponentielle de croissance sont rendues artificiellement compétentes par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium (CaCl₂). Celui-ci déstabilise la paroi de la bactérie, qui gonfle alors en prenant l'aspect d'un sphéroblaste. L'ADN plasmidique ajouté forme avec le calcium un complexe résistant aux désoxyribonucléases. Ce complexe est supposé adhérer à la bactérie. Les bactéries sont 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 ensuite isolés par culture sur boîte de milieu sélectif.

Méthodes

Préparation de cellules compétentes

- Ensemencer 100ml de LB+ antibiotique à partir d'une préculture. Incuber à 37 °C sous agitation jusqu'à une absorbance d'environ 0,3 à 550 nm (début de la phase exponentielle).
- Arrêter la croissance en refroidissant la culture sur glace pendant 10 minutes.
- Centrifuger la culture 15 minutes à 3000 rpm à 4 °C. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de CaCl₂ 50mM. Répéter cette étape une seconde fois.
- Laisser la solution 30 minutes sur glace puis centrifuger 15 minutes à 3000 rpm à 4°C.

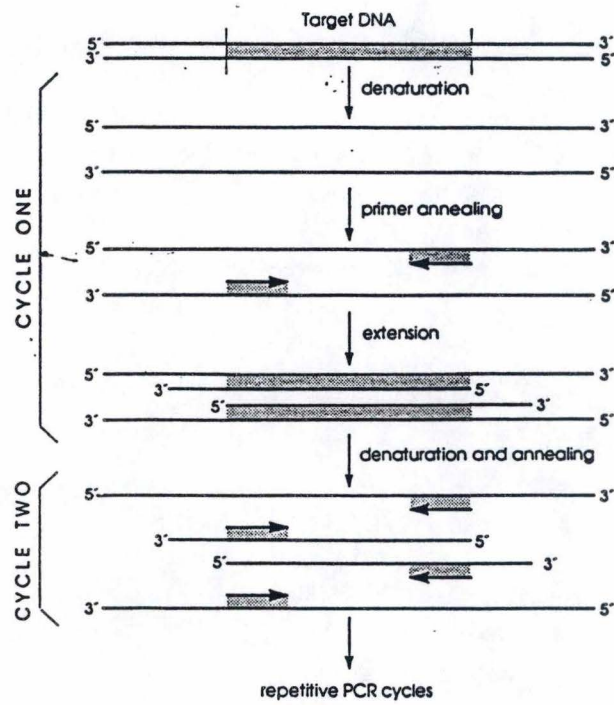


Figure 3: Schéma de l'amplification du gène par PCR (d'après Gerhardt, 1994).

-Éliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de solution froide en CaCl_2 50mM glycérol 15% équivalent au dixième du volume initial.

-Aliquoter la suspension en eppendorfs et stocker à -80°C .

Transformation des cellules compétentes

-A 50 à 150 μl de cellules compétentes, ajouter environ 10 μl de mélange de ligation ou 10 à 100 ng d'ADN.

-Déposer 30 minutes sur glace.

-Réaliser un choc thermique de 2 minutes à 42°C .

-Ajouter 900 μl de SOC liquide.

-Incuber 30 min. à 1 heure à 37°C .

-Étaler sur boîtes de milieu sélectif et incuber une nuit à 37°C .

Témoin de transformation

-Un témoin de compétence. Des cellules compétentes transformées avec une quantité précise d'un plasmide non restreint sont étalées sur milieu sélectif.

-Un témoin de viabilité des cellules compétentes: des cellules compétentes après transformation, sont étalées sur milieu LB.

3. 8. Amplification d'ADN par PCR

1. PCR classique

L'ADN doit être dénaturé pour permettre l'hybridation des amorces (figure 3). Des amorces oligonucléotidiques complémentaires de séquences se trouvant de chaque côté de la région-cible, s'hybrident l'une au brin "sens" et l'autre au brin "anti-sens".

Une ADN polymérase thermostable, telle que la Taq (Biotools) qui ajoute une base A aux extrémités 3' ou la Pwo (mélange de Taq et d'Expand, qui elle, n'ajoute pas de A) est alors utilisée pour synthétiser à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque amorce un brin d'ADN complémentaire. Un cycle consiste en 3 étapes: dénaturation des brins d'ADN, hybridation des amorces et élongation (synthèse d'un brin d'ADN complémentaire). En répétant ce cycle, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies du fragment cible.

Ce T_m se calcule de la façon suivante, 4°C sont comptabilisés pour les bases G et C et 2°C pour les bases A et T: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$.

Les amorces utilisées pour l'amplification du gène *BuG* sont:

Primer direct (GTP1): 5' CTATGACGCATAGCCACAA 3'

Primer reverse (GTP2): 5' CAGGTATTGAAGCGGAACA 3'

Quant aux amorces utilisées pour de l'amplification de la partie interne du gène *BuG*, leur séquence est la suivante:

Primer direct (GTPi1): 5' CGAACTTATGCTGTCGGACCT 3'

Primer reverse (GTPi2): 5' GCTTGGAGGTGAGAAGGTTCA 3'

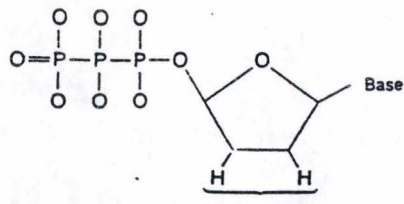
Les amorces qui ont permis l'amplification de la cassette Kan sur le pUC4K sont:

Primer direct (Kanamont): 5' GGGCATGCGGAAAGCCACGTTGTGTCT 3'

Primer reverse (Kanaval): 5' GGGGTGACCTTAGAAAACTCATCGAGCAT 3'

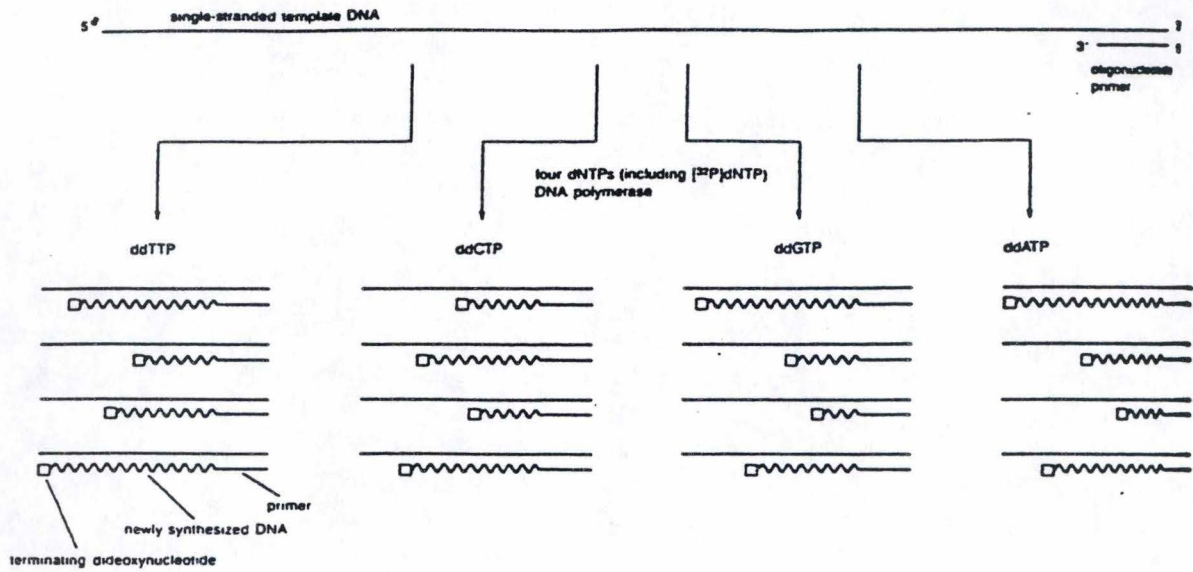
Méthode

Mélange de réaction réalisé dans un microtube:



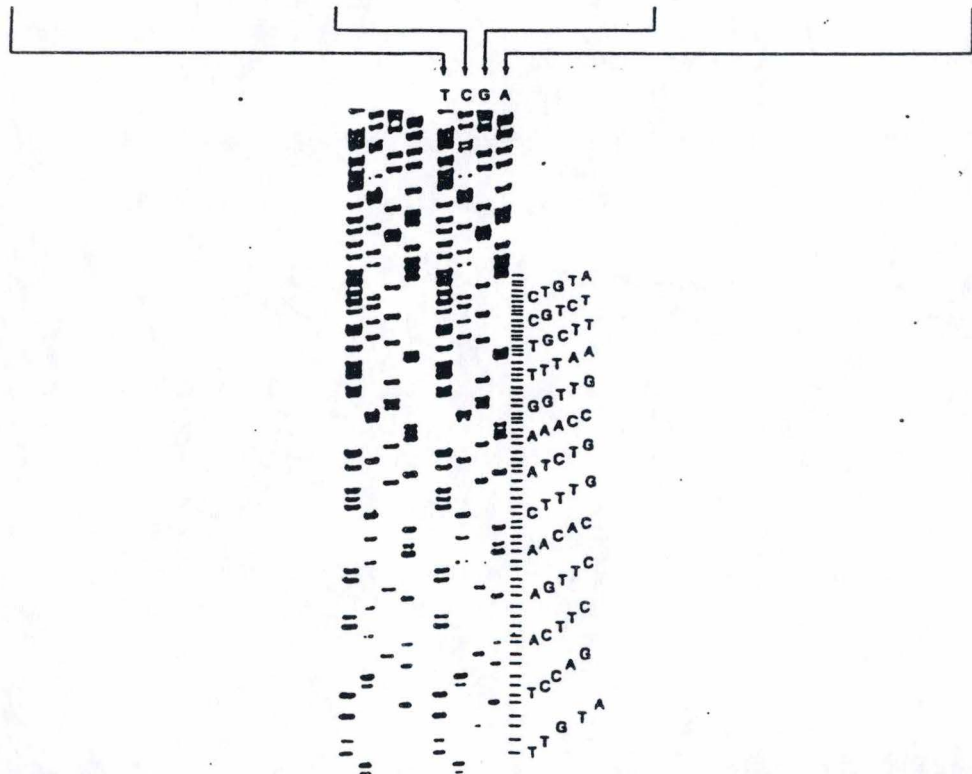
Ne peut pas former
de lien phosphodiester
avec le dNTP suivant

Figure 4: Réaction de séquençage.



The newly synthesized chains terminate when a ddNTP is incorporated in place of the normal dNTP

Denature and separate fragments of radiolabeled DNA by electrophoresis



- Tampon d'ADN polymérase 10X 5µl
- dNTP 10mM 2µl
- Primer 1 1µl/60pmole
- Primer 2 1µl/60pmole
- Polymérase (2 U/µl) 1µl
- Porter à 50 µl avec de l'eau distillée stérile.

Programmer l'appareil comme suit:

- Dénaturation de 5 minutes à 95°C.
- Environ 26 cycles d'amplification divisé en 3 étapes:
 - * 30 sec. à 95°C pour la dénaturation.
 - * 1 min. à X°C pour l'hybridation (X=55°C pour l'amplification de *BuG* et lors de l'utilisation des oligonucléotides R et F, et X=60°C pour l'amplification de la partie interne de *BuG*).
 - * 1 min. à 72°C pour la polymérisation d'environ 1 kb (68°C quand utilisation de la Pwo).
- Elongation finale de 10 minutes à 72°C (68°C quand utilisation de la Pwo).

2. PCR sur colonies

Pour cette méthode, l'ADN n'est pas récupéré des clones bactériens. Une partie de la colonie est additionnée au mélange PCR et c'est lors de la première dénaturation à 95°C que les cellules sont lysées et libèrent leur ADN.

3. 9. Séquençage d'ADN

Pour séquencer des fragments d'ADN nous avons utilisé le Kit ABI PRISM dye terminator (Perkin Elmer) (figure 4). Le principe appliqué dans ce kit est une Amplification d'ADN par PCR avec assimilation de didéoxyribonucléotides marqués à la fluorescéine. chacun de ces nucléotides possède son marquage propre (sa longueur d'onde d'émission), ce qui rend possible la lecture à partir d'une seule réaction PCR. Ce type de réaction permet par la suite l'utilisation d'un séquenceur automatique.

La réaction de PCR de séquençage est basée sur le principe de Sanger (1977). L'incorporation des didéoxyribonucléotide arrête la réaction de polymérisation ce qui permet d'obtenir une population de brins tronqués qui représente la séquence d'ADN

- Une réaction de PCR est réalisée sur le fragment d'ADN .

* La concentration en ADN matrice doit être de 0.1 µg/µl si c'est un fragment monocaténaire, 0.2µg/µl si il est bicaténaire et 10 à 30 ng/µl de produit PCR. Lorsqu'on utilise un produit PCR, une purification préalable est nécessaire, elle permet d'éliminer les amorces et les nucléotides qui interagiraient avec la réaction de séquençage

*La quantité d'amorce doit être de 3.2 pM

*8µl de terminator ready reaction mix sont ajoutés ensuite. Cette solution contient les 4 didésoxynucléotides marqués à la fluorescéine, du Tris-HCl (pH 9), du MgCl₂, une pyrophosphatase stable, l'ampliTaq ADN polymérase FS, dITP, dATP, dTTP, dCTP. Le dITP remplace le dGTP se qui évite la compression des bandes lors de l'électrophorèse L'ampliTaq ADN polymérase FS remplace la Taq polymérase classique car elle est plus efficace pour l'incorporation de nucléotides marqués.

- Les temps de réaction préalablement réglés sur l'appareil PCR sont ceux appliqués en générale.

- Après la réaction de PCR, il est nécessaire de purifier l'ADN car de nombreux nucléotides marqués n'ont pas été incorporés dans la réaction de polymérisation. Leur présence pourrait perturber l'électrophorèse dans le séquenceur. Pour cette purification nous avons suivi le protocole suivant

* Ajouter 2µl de NaAc 3M pH4.8

* Ajouter 50µl d' EtOH 95%

E. coli donneuses

B. melitensis receveuses

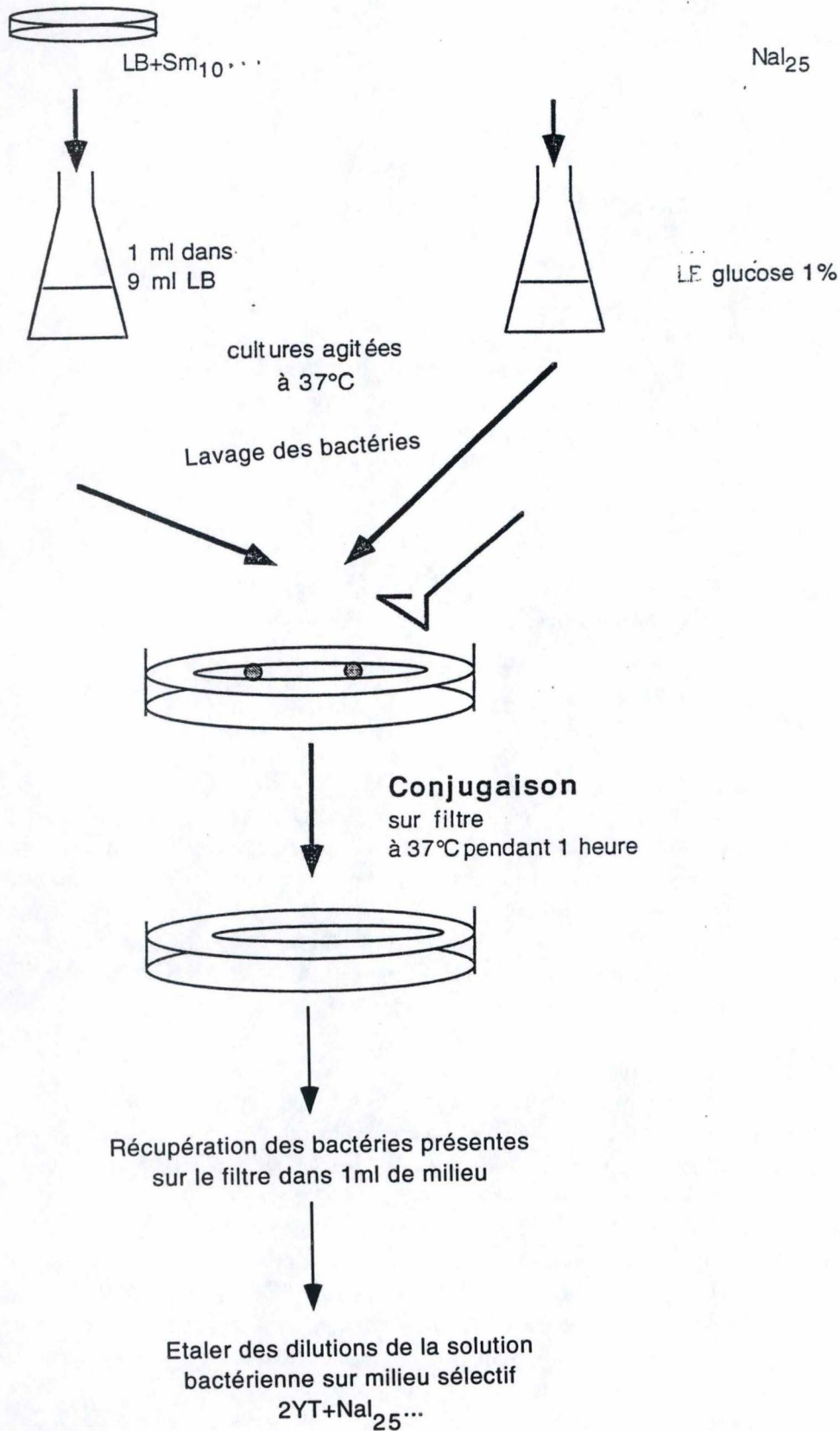


Figure 5: Conjugaison

- * Mettre 10' sur glace
- * Centrifuger 20' dans une minifuge à vitesse maximale
- * Eliminer le surnageant
- * Ajouter 250µl d'EtOH 70% à 4°C
- * Centrifuger pendant 20 minutes
- * Eliminer l'EtOH, laisser sécher à l'air

- Les produits PCR sont séparés suivant leurs tailles par électrophorèses en gel de polyacrylamide en présence d'urée. Le résultat du gel sera détecté par un système optique relié à un ordinateur (ABI PRISM 377).

4. Conjugaison

La conjugaison est un transfert de matériel génétique où la bactérie donneuse transfère un plasmide conjugatif vers une bactérie receveuse (figure 5). La conjugaison se fait grâce à un contact entre bactéries, via un pili sexuel. Le transfert conjugatif commence à un site d'origine de transfert reconnu par la machinerie de transfert sur le plasmide conjugatif.

Les plasmides transférés lors de ce travail sont le pBBR1MCS4 et le pSKOriT. Les contrôles de résistance antibiotique utilisés sont: les bactéries donneuses sont étalées sur un milieu sélectif contenant de l'acide nalidixique et les *Brucella* (Nal^R) receveuses sont étalées sur un milieu additionné de l'antibiotique à laquelle résiste les *E. coli* donneuses.

Méthodes

-Préparer une préculture d' *E. coli* S17-1 (RP4⁺) donneuses contenant le plasmide dans du LB +antibiotique, ainsi qu'une culture de *Brucella* receveuse (Nal^R).

-Après une croissance à 37 °c durant une nuit, inoculer une culture de *E.coli* dans du LB +antibiotique avec 1/10 de la préculture. Laisser pousser à 37°C quelques heures.

-Avant la conjugaison, laver les bactéries pour éliminer les antibiotique du milieu de culture en centrifugeant 15 minutes à 4000 rpm et resuspendre dans du milieu sans antibiotique, le culot bactérien dans 1/10 du volume de la culture de départ.

-Placer un filtre stérile 0,22 µm de 82 mm de diamètre sur une boîte de pétri contenant du 2YT, y déposer 100 µl de culture de *B. melitensis* et 100 µl d'*E.coli* S17 lavées et resuspendues.

-Mélanger et étaler les gouttes de bactéries sur la totalité du filtre.

-Laisser incuber au moins 1 heure à 37°C.

-Récupérer les bactéries sur le filtre dans 1 ml de milieu.

-Etaler 100µl et différentes dilutions sur un milieu 2YT sélectif.

-Incuber 3-4 jours à 37°C.

5. Southern blot

5. 1. Marquage de la sonde

Le fragment d'ADN utilisé comme sonde est dénaturé et mis en présence d'hexanucléotides aléatoires (figure 6). Une synthèse 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 (Boehringer).

-Environ 1 µg d'ADN est porté à un volume finale de 16 ml avec de l'eau stérile.

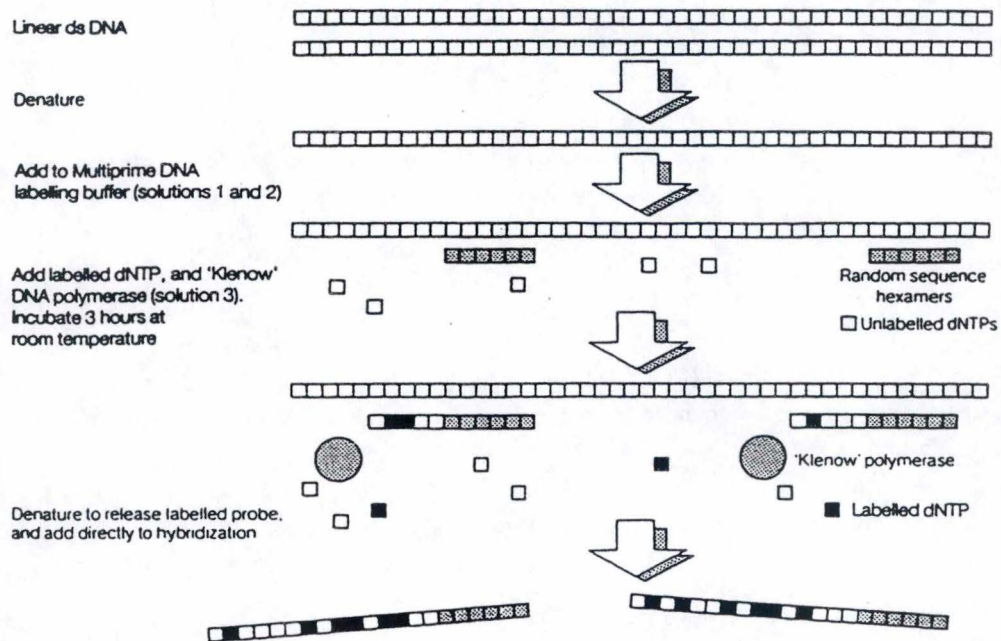


Figure 9 : Méthode de synthèse des sondes marquées à la digoxygénine par amorçages aléatoires ou « random priming ».

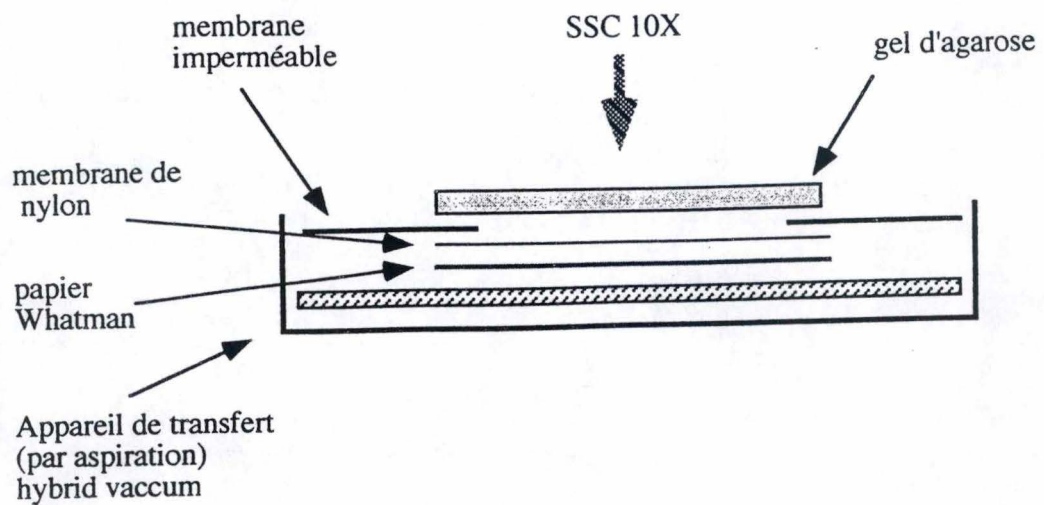


Figure 10 : Représentation schématique du système de transfert.

- Faire bouillir pendant 10 min. et ensuite conserver sur glace.
- Ajouter 4 µl du mélange DIG High Prime, mélanger et centrifuger brièvement.
- 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.

5. 2. Electrophorèse en gel d'agarose

La séparation des fragments d'ADN restreint s'est faite dans un gel d'agarose de 0,8 %. Un marqueur de taille marqué avec la molécule DIG (Boehringer) a été utilisé.

5. 3. Transfert et immobilisation

Après avoir séparé les fragments d'ADN sur gel d'agarose, on transfère les acides nucléiques sur une membrane de nylon (figure 7).

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.

5. 4. 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 (Boehringer).
- 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'hybritybe et mélanger en inversant l'hybritybe.
- Incuber à 68°C pendant une nuit.

5. 5. Détection et révélation

La détection comprend une étape de saturation, une incubation avec l'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline et une réaction finale de chémoluminescence. Le CSDP-Ready-to-use (Boehringer) 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 , 2x 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 (Boehringer) pendant 30 min.
- Incuber pendant au moins 30min., avec l'anticorps anti-DIG-PA, 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 (Boehringer).

- Placer la membrane dans un sac en plastique et ajouter la solution de CSPD-ready-to-use.
- Exposer la membrane à un film d'autoradiographie (toujours sous plastic) pendant 30sec. à 5 min. (ou plus). Pour accentuer la le signal, incubé à 37°C .
- Immerger le film pendant 1 min. dans le révélateur.
- Rincer le film 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.

Ajouter, 0,3% de Tween 20

6. Criblage de la banque en *E. coli* de *B. abortus* 544

La banque d'ADN génomique de *B. abortus* 544 a été construite dans le plasmide pZerO-2 (KanR) et est contenue dans des *E.coli* DH10B.

6. 1. Marquage de la sonde

La sonde est marquée par la molécule DIG (digoxigenin, Boehringer).

6. 2. Colony blot

- Etaler une dilution de la banque de *B. abortus* 544 sur un milieu de sélection (LB+Km) qui permet d'obtenir des clones d'*E.coli* isolés.
- Incuber une nuit à 37°C .
- Déposer sur chaque boîte un filtre de nylon chargé positivement.

- Après 30 secondes, déposer le filtre retourné, sur une boîte de milieu LB+Kan et laisser les colonies croître de 3 à 4 heures à 37°C .
- Déposer chaque filtre de nylon (portant les bactéries sur la face supérieure) sur un buvard imbibé de solution de dénaturation pendant 7 minutes.

- Transférer les filtres sur un buvard imbibé de solution de neutralisation pendant 7 minutes.
- Transférer les filtres sur un buvard imbibé de solution SSC 20X pendant 3 minutes.
- Comprimer le filtre entre 2 papiers buvard pour éliminer les débris cellulaires.
- Sécher les filtres et incubé 2 heures à 80°C.

Solutions

*Les solutions de dénaturation et de neutralisation sont décrites au point 5. 8.

*SSC 20X: Citrate de Na 0,3 M, pH 7

NaCl 3 M

6. 3. Hybridation, Détection et Révélation.

Voir description du Southern blot dans ce matériel et méthode.

Les colonies sélectionnées comme positives après ce premier tour de criblage par Colony blot, sont repiquées individuellement et sont réutilisées dans un second tour de criblage.

RESULTATS ET DISCUSSION

Données préliminaires

Une manière d'identifier des gènes de virulence est de générer des mutations aléatoires dans le génome d'une bactérie pathogène à l'aide par exemple d'un transposon et d'identifier, sur base de tests phénotypiques, les mutants atteints dans la pathogénie (Salyers and Whitt 1994). Le laboratoire dispose d'une banque de 3040 mutants transpositionnels de *Brucella melitensis* 16M. Le transposon utilisé pour créer la banque est le mini-Tn5K*mc*at d'une taille de 2409 paires de base (**Danese, Tibor et al. 1996**).

L'implication de la capture du fer dans la virulence a été établie pour différentes bactéries. Par exemple, le criblage d'une banque de mutants transpositionnels chez *Legionella pneumophila* sur un milieu pauvre en fer a conduit à l'identification de facteurs impliqués dans la capture du fer mais aussi dans la survie en macrophages (Pope, O'Connell et al. 1996). Dès lors, en vue d'améliorer les connaissances sur les mécanismes d'acquisition du fer chez *Brucella* et leur implication dans la virulence, huit cent trente-six mutants de la banque de *B. melitensis* ont été criblés sur milieu pauvre en fer. Trente-deux mutants montrent une croissance dépendante de la présence du fer dans le milieu. Un mutant présente une réplication amoindrie en cellule. Trois mutants (F13, F15 et F32) interviennent dans la capture du sidérophore (DHBA) de *Brucella* puisqu'ils ne sont pas sauvés par l'apport exogène de DHBA dans un milieu sans fer.

Afin de déterminer la séquence du gène disrupté par le transposon, des PCR inverses (IPCR) ont été réalisées sur les trente-deux mutants. Des fragments d'ADN génomiques sont circularisés et servent de matrice à une IPCR avec des oligos déterminés sur le transposon. Un séquençage des produits PCR a été effectué ainsi que la recherche de

similarité à l'aide du programme Blast (Altschul, Gish et al. 1990)². Concernant les trois mutants impliqués dans l'entrée du DHBA, la séquence de l'IPCR obtenue pour le mutant F32 montre une forte homologie avec la protéine ExbB de *Pseudomonas putida* et pour le mutant F13 avec un ABC transporteur du sidérophore (anguibactine) de *Bacillus subtilis*. Le mutant F15, qui sera étudié lors de ce travail, présente quant à lui dans la région amont au transposon une similarité à une peptidyl-tRNA hydrolase (PTH) de *Bacillus subtilis* et dans la région située en aval du transposon, avec une potentielle GTP-binding protein de *E. coli*. L'obtention de deux similarités différentes s'explique par le fait que le transposon se trouve à l'extrémité terminale (à 190 pb de la fin) du gène *pth* qui se situe en amont du gène encodant la putative GTP-binding protein. Ces données génétiques (F15) pose un problème particulier qui sera l'objet de ce travail.

Hypothèse

Comment concilier l'impossibilité d'utiliser du DHBA exogène avec les données génétiques obtenues. Le phénotype peut être dû à la disruption de *pth* et/ou à un effet polaire sur la région en aval dont fait partie *BuG* (*Brucella* iron uptake-putative GTP-binding protein).

1. Le phénotype et *pth*

Au cours de la phase d'élongation d'une protéine, les peptidyl-tRNA's peuvent se dissocier prématurément du ribosome, provoquant l'arrêt de la traduction (Menninger 1976). Les peptidyl-tRNA qui s'accumulent dans le cytoplasme sont toxiques pour la cellule, soit en altérant l'initiation de la traduction, soit en diminuant la synthèse protéique, faute de tRNA's correspondants. Les organismes recyclent donc les peptidyl-tRNA's en tRNA's (Gross, Crow et al. 1992) (Schmitt, Mechulam et al. 1997). Chez les bactéries et les levures, cette fonction est réalisée par la peptidyl-tRNA hydrolase qui a une fonction estérase. Chez *E. coli*, l'activité

² Programme accessible sur le réseau internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>). Les méthodes de comparaison de séquences utilisées sont : blastx, qui compare les séquences protéiques déduites dans les 6 phases d'une séquence nucléique avec les séquences contenues dans les banques de séquences protéiques et blastn, qui compare une séquence nucléique avec les séquences contenues dans les banques de séquences nucléiques

MLLIAGLGNPGPQYAHTRHNIGFMAADEIFRRHRFSNWQKKFQAEIADGVIDGEKVL
LVKPQTFMNLSGQSIGAMRFYKMTPADLVVIYDELDLVPGKLRIKTGGGSGGHNGI
KSIDAHMQSFPRRTEYRRMRLGIGHPGAKELVHNYVLGDFAKADNEWLDTLMGA
VADNVAMLAKTRG

Figure 1: Séquence protéique de PTH de *Brucella* avec les 16 résidus conservés entre différentes espèces qui sont soulignés.

de la PTH est essentielle à la survie bactérienne (Gross, Crow et al. 1992) et pourrait donc l'être chez *Brucella*. Dans ce cas, le mutant transpositionnel F15 serait non viable. Cependant, les 16 résidus strictement conservés parmi les PTH de diverses espèces dont celle de *Brucella*, et probablement nécessaires à l'activité de PTH, ne sont pas touchés par le transposon (Figure 1) (Schmitt, Mechulam et al. 1997). De plus, aucun lien entre la présence du fer et l'action de la PTH n'a pu être établi sur base de la bibliographie actuelle.

2. Le phénotype et *BuG*

Les GTP-binding proteins ou GTPases constituent quant à elles, une grande famille de protéines dont le domaine globulaire de liaison au GTP est similaire. Ce domaine change de conformation suite à l'hydrolyse de GTP en GDP. La protéine est active suite à sa liaison avec GTP, ensuite l'hydrolyse de GTP la fait revenir sous forme inactive (Bourne, Sanders et al. 1991).

La GTP-binding-protein de *E. coli* et de *Brucella* montre une certaine similitude avec l'ATPase FeoB du système de capture du Fe^{2+} , Feo. Cette similarité de séquence protéique se situe au niveau du motif de fixation au GTP/ATP.

Au vu de ces données nous privilégions l'hypothèse d'un effet polaire. Pour vérifier cette hypothèse, nous envisageons deux approches.

- 1) la complémentation par apport sur plasmide du gène *BuG*.
- 2) La délétion du gène *BuG*.

Ces deux approches nécessitent la séquence complète du gène *BuG*, qui sera obtenu par le criblage d'une banque génomique.

1. Criblage de la banque

Afin d'obtenir les séquences complètes des gènes encodant la PTH et la GTPase potentielle, une banque d'ADN génomique de *B. abortus* 544 créé au laboratoire (Flore Bellefontaine *et al.*) a été criblée. Cette banque d'ADN génomique a été construite dans le plasmide pZER0-2 (Kan^R) et contient des fragments d'ADN dont la taille varie entre 5 et 10

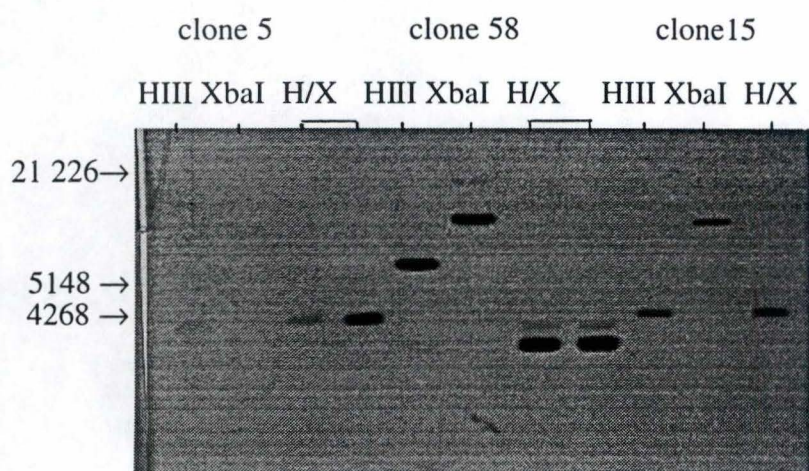
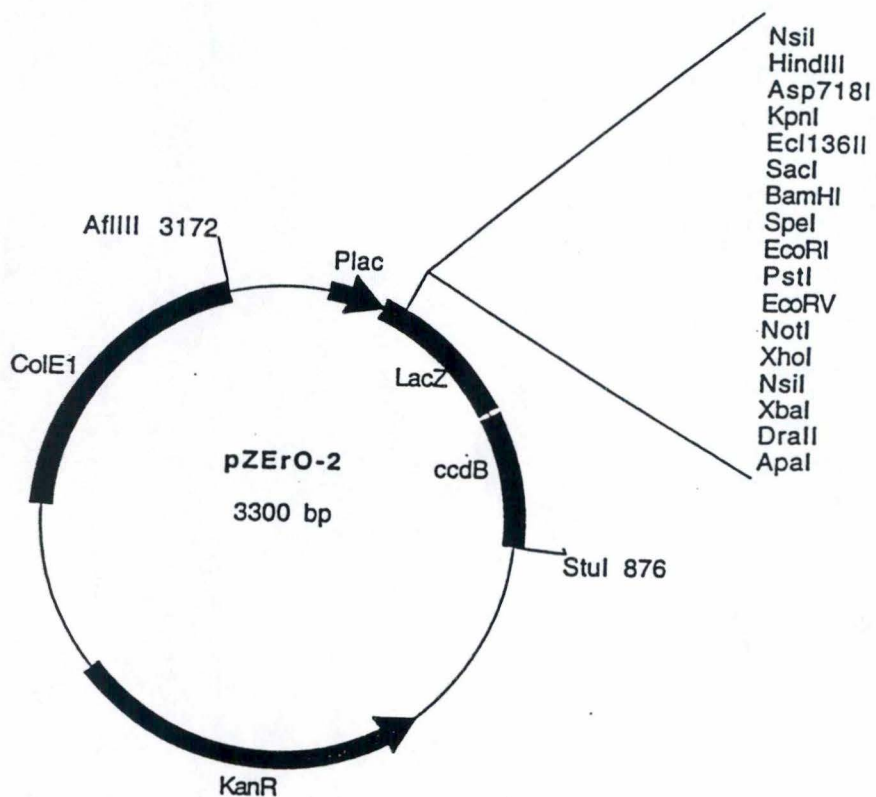


Figure 2: Southern effectué avec comme sonde l'IPCR amont, sur les clones n°5, 15 et 58 restreints par *Hind* III, *Xba* I et *Hind* III/*Xba* I.



Représentation de la carte plasmidique du pZErO-2 (Invitrogen). La double restriction *Hind* III/*Xba* I sur le pZErO-2, libère l'insert.



Figure 3: Séquence des gènes *pth* et *BuG* chez *B. abortus* 544.

```

Bruce      MGFNRGIVGLPNVGKSTLFNALTKTAAQAANYPFCTIEPNTGEVAVPDPQRQNEIA
Rhosp     KEWIMGFRMGIVGLPNVGQIHVFNALTRTAAQAANFPFCTIEPNVGEVAVPDARLEILA
Haein     MGFKCGIVGLPNVGKSTLFNALTK-AGIEAANYPFCTIEPNTGVVPMPPDPRLDALA
Ecoli     MGFKCGIVGLPNVGKSTLFNALTK-AGIEAANFPFCTIEPNTGVVPMPPDPRLDQLA
Synec     MLRAGIVGLPNVGKSTLFNALVANAKAEAAANFPFCTIEPNVGVVSVPPDRLGKLA
Rickp     MTLKLGIVGLPNVGKSTLFNALTASQIADAANYPFCTIEPNSSKVLVDPDERLQRLV
          :. *****: :****. :***:***** . * :** * :.

Bruce      RIAGSKEIIPTRINFVDIAGLVRGASKGEG LGNQFLANIREVDAIVHVLRCFEDDDITHV
Rhosp     EIAGSKQIIPTRMTFVDIAGLVRGASKGEG LGNQFLANIRECDAIAHVLRCFEDGDITHV
Haein     EIVKPERILPTTMEFVDIAGLVAGASKGEG LGNKFLANIRETDAIGHVVRFCFENDDIVHV
Ecoli     EIVKQRTLPTTMEFVDIAGLVKASKGEG LGNQFLTNIRETEAIGHVVRFCFENDNIHV
Synec     EISQSVKVPTRMEFVDIAGLVAGASKGEG LGNQFLANIREVDAIVHVVRCFDDDDITHV
Rickp     SLVGSNKMI PSYIEFVDIAGLVKASKGDGLGNKFLSHIREVDAIHLVRCFEDDIIHV
          : . . :*: : ***** *****:****:***:*** :** ***:***: : * **

Bruce      EGRIDPVSDAQT VETELMLSDLESIERRIVQIRKRATSKDKEALAILPVMEKALELLQNG
Rhosp     EGRIDPVADAETIETELMLADMDSIERRLANLARKLKGDKDKEAADQDRLLRVAMAAL EAG
Haein     AGKIDPLDDIDTINTELALADLDSCERAIQRLQKRAKGGDKKAKFELSVMEKILPVLENA
Ecoli     SGKVNPAADDIEVINTELALADLDTCERAIHRVQKKAKGGDKDAKAEAVLEKCLPQLENA
Synec     SGSVDPVRDVEVIDLELVLADLAQVEKRLERSRKQARG-NKDLLEEVA ILERLVAALNEG
Rickp     HNKIDPLYDIEVIETELILT DIASLEKHF I KSEKRLKSGDKMVEQIALLKEIYKVLAE
          . ::* * :.: : ** *:*: * : : . : : . :* . :. : * .

Bruce      QPVRMLMKDISPEDLLTLKGLNLLTSKPVLYVCNVAEGDAANGNAFSAAVDKMAEEQGAQ
Rhosp     RPARSVT--VSADDQRAWRLQLLTSKPVLYVCNVEEASAAKGNSSARVAEMARAQGA
Haein     GMIRSVG--LDKEELQAIKSYNFLTLKPTMYIANVNEDGFEN-NPYLDRVREIAAKEGAV
Ecoli     GMLRALD--LSAEKAAIRYLSFLTLKPTMYIANVNEDGFEN-NPYLDQVREIAAKEGSV
Synec     IPARRVG--LTAAEQELIKSLGLLTLKPIIYATNVTEDDLGGNDWVEQVKAIAAKDEAK
Rickp     KPARI LN--EVLGADNLKQLQLITSKPILYVCNVFEQDA AIGNKFTQLVAKRAETEKTK
          * : : : : * * * : * * * . * * * * : :

Bruce      TVIISAIEAEVAQLP-DEEAGEYLESMGLEEPGLDRLIRAGYKLLDLITYFTAGPKETR
Rhosp     TVVISARIEEEIAQLP-PEEAGMFLEEMGLEEAGLDRLIRAGYELLGLQTYFTVGPKEAR
Haein     VVPVCAAIESEIAELD-DEEKVEFLQDLGIEEPGLNVRVIRAGYALLNLQTYFTAGVKEVR
Ecoli     VVPVCAAVEADIAELD-DEERDEFMQELGLEEPGLNVRVIRAGYKLLNLQTYFTAGVKEVR
Synec     VVISAQVESELVELP-EEERQDFLASLGVTEGGLKSLIRATYELLGLR TYLTTPQETR
Rickp     SLVISSKIESEIALLESVEEKEEFLKYIGLNKTGLSKVIKEGYNLLNLKSF FTIGPKEAH
          : :.: :* :. . * ** : : :*: : ** . :*: * **.* :.: * * :*.:

Bruce      AWTIKRGTKAPAAAGVIHTDFERGFIRAQTIAYEDYVKYNGELGAKEAGKARDDEGKEYI
Rhosp     AWTITRGM LAPQAAGVIHGDFEKGFI RAETVAYADYVAGRGEAGAKEAGKFR-VEGKTYE
Haein     AWTISVGATAPKAAAVIHTDFEKGFI RAEVIAYEDFIQFNGENGAKEAGKWR-LEGKDYI
Ecoli     AWTIPVGATAPQAAGKIHTDFEKGFI RAQTISFEDFITYKGEQGAKEAGKMR-AEGKDYI
Synec     AWTIISGMKAPQAAGVIHTDFERGFIRAETVAYEDLISCGSMQGAKEKGLVR-SEGKEYV
Rickp     SWTFKDGTLAPAAAGI IHTDFEKGFI RAEVI SYEDYINLGSEAKAKEVGMKMR-LEGKDYK
          :** . * ** ** . ** ***:*****:.: : * : . *** * * *** *

Bruce      VHDGDVMLFRLQZ
Rhosp     VQDGDVLHFLFNA
Haein     VQDGDVMHFRFNV
Ecoli     VKDGDVMNFLFNV
Synec     VQEGDVLLFRFNV
Rickp     MQDGDIVHFRFNI
          :.:***: : * : :

```

Figure 4: Alignement multiple de sequences protéiques par le programme CLUSTAL W (1.74), de différentes putative GTP binding proteins, dont celle de *B. abortus* 544 (Thompson *et al.*, 1994). Les acides aminés identiques sont indiqués d'une astérisque, les acides aminés fortement similaires de deux points tandis qu'une faible similarité est désignée par un point. Le motif de fixation ATP/GTP prédit par le logiciel PROSITE est ombré. Le logiciel retrouve le consensus (AG-x4-G-K-ST) correspondant au site de fixation ATP/GTP ou P loop.

Kb. Pour ce criblage, l'IPCR amont, obtenue sur l'ADN du mutant F15, a été marquée avec DIG et utilisée comme sonde. Trois clones positifs, n° 5, 15 et 58, ont été isolés. L'ADN plasmidique de ces 3 clones a été récupéré, restreint par *Hind* III, *Xba*I et *Hind* III/*Xba*I et un Southern blot a été réalisé avec comme sonde l'IPCR amont du mutant F15 (figure 2). Les clones n°5, 15 et 58 contiennent tous les trois le gène *pth* dans un insert d'ADN génomique d'une taille approximative de 4,7, 5,5 et 7,8 Kb respectivement.

2. Séquences et analyse de *pth* et *BuG*

Les séquences ont été réalisées sur les inserts d'ADN génomique de *B. abortus* 544 des clones n°5, 15 et 58 avec les oligonucléotides R et F spécifiques du plasmide ainsi qu'avec les oligonucléotides F15 et R15 déterminés sur base de la séquence de l'IPCR amont. Des incertitudes dans les séquences de *pth* et *BuG* ont été corrigées sur base des séquences des IPCR obtenues sur l'ADN génomique de *B. melitensis* 16M. Chez *Brucella*, le gène *pth* a une taille de 546 pb et *BuG*, une taille de 1104 pb (figure 3). Les deux gènes sont séparés par une région de 270 pb ne présentant aucune similarité avec une ORF connue. La taille des gènes correspond à la taille des homologues de *E. coli* (*pth* et *ychF*) , 579 pb et 1089 pb respectivement.

Divers programmes de prédiction de structure secondaire ont été appliqués à la GTPase de *Brucella* potentiellement impliquée dans la capture du DHBA. Un motif de liaison au GTP/ATP ou P-loop est prédit par le programme PROSITE (Hofmann, Bucher et al. 1999). Le motif de liaison se trouve dans la zone N-terminale très conservée chez plusieurs GTPases potentielles (figure 4). Aucune séquence signal ni segments transmembranaires ne sont prédits. On peut donc supposer que la protéine encodée par le gène *BuG* est bien une GTP ou ATPase et est probablement une protéine cytoplasmique. Cette potentielle GTPase cytoplasmique à fonction inconnue et hautement conservée, donc probablement avec une fonction importante. Nous formulons l'hypothèse qu'elle est une protéine impliquée dans l'entrée du sidérophore DHBA chez *Brucella*.

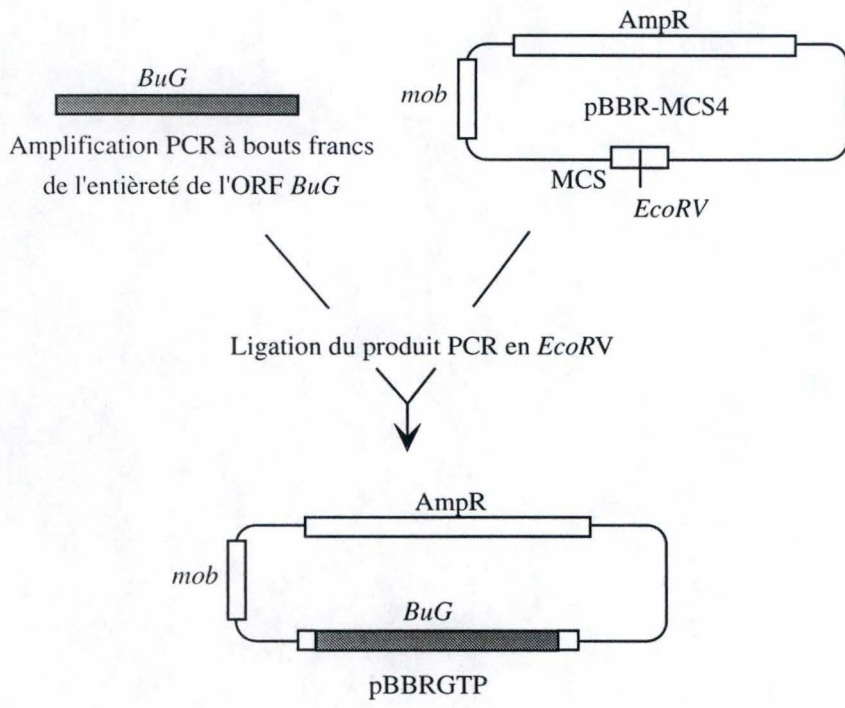


Figure 5: Schéma de construction des plasmides pBBRGTPA/B.

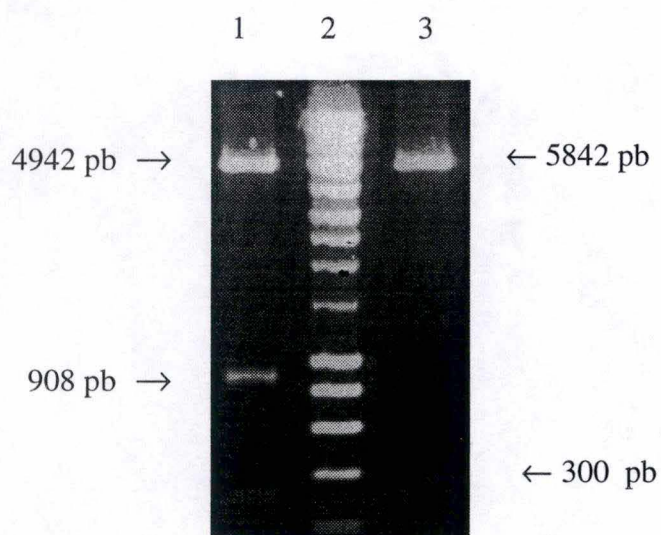


Figure 6: Restriction diagnostique *EcoRI* effectuée sur la construction pBBR1M1CS4 contenant le gène *BuG*: dans le sens de clonage A (piste 1) ou B (piste 3).

3. Complémentation du mutant transpositionnel F15

L'entièreté du gène *BuG* porté par un plasmide réplcatif chez *Brucella* a été amené dans la souche mutante F15. La restauration du phénotype parental permettra d'impliquer le gène *BuG* et d'éliminer la participation du gène *pth* dans le phénotype mutant. Si aucune restauration du phénotype sauvage n'est observée, cela pourrait être dû au fait que le gène *BuG* n'a aucune implication dans le phénotype, mais pourrait aussi être dû à la non expression de la GTPase potentielle. Cette dernière hypothèse ne peut être vérifiée car on ne dispose pas d'anticorps contre cette GTPase. Cela pourrait également être dû à un effet polaire se situant en aval de *BuG*.

3.1. Clonage de l'ORF *BuG* dans le pBBR1MCS4

L'ORF encodant la GTPase a été amplifiée sur le plasmide issu du clone n°5, sur bases d'amorces (GTP1 et GTP2), déterminées respectivement 49 pb en amont de l'ATG prédit pour *BuG* et recouvrant le codon terminateur.

Le produit PCR à bouts francs, d'une taille d'environ 1,2 Kb obtenue suite à une amplification avec l'enzyme Pwo a été cloné dans le vecteur pBBR1MCS4 (Amp^R) restreint en *EcoRV*(figure 5). Suite à un test blanc/bleu, l'ADN plasmidique de plusieurs colonies blanches-Amp^R a été récupéré. Les plasmides obtenus ont été restreints par *EcoRI* afin de confirmer la présence de l'insert et son sens de clonage. Deux sites *EcoRI* sont présents dans le gène *BuG*. Les profils de restriction attendus sont respectivement de 5842, 300 et 8 pb ou de 4942, 908 et 300 pb selon le sens de clonage. Les deux constructions avec le gène *BuG* cloné dans les 2 sens portent le nom de pBBRGTPA et pBBRGTPB, et sont illustrés à la figure 6 (piste 1 et 3, respectivement). Le clonage du gène *BuG* dans le sens du *Plac* dans le plasmide est donc le sens B d'insertion. Quant au pBBRGTPA, il sera utilisé comme contrôle négatif.

Mutant transpositionnel F15
complémenté par:

	Souche parentale	Mutant <i>exbB</i>	pBBRGTPA	pBBRGTPB
LB	+	+	+	+
LB DFA	-	-	-	-
LB DFA-DHBA	+	-	-	+

Tableau 1: Croissance en milieu riche en fer (LB) et pauvre en fer (LB+ deferoxamine (DFA)), avec ou sans sidérophore(DHBA), des souches de *Brucella* F15 complémentées et des souches témoins: parentale et mutant *exbB*. Une croissance est annotée par un + tandis qu'une croissance nulle est annotée par un -.

3. 2. Introduction des plasmide pBBRGTPA/B dans le mutant transpositionnel F15

Les constructions (Amp^R) obtenues ont été transférées par transformation chimique dans des *E. coli* S17-1 (Sm^R) et les transformants ont été sélectionnés sur milieu sélectif LB+ Amp Sm. Un transfert conjugatif des plasmides, à partir des cellules donneuses *E. coli* S17-1 avec le mutant de *B. melitensis* 16M (Nal^R) F15, a ensuite été réalisé. Les *Brucella* contenant les plasmides ont été sélectionnées sur un milieu sélectif contenant de l'acide naladixique et de l'ampicilline.

3. 3. Tests phénotypiques

Les clones de *Brucella* F15 complémentés ont été testés pour la capture du DHBA (tableau 1). La souche contenant le pBBRGTPB est capable de capturer le DHBA de la même manière que la souche parentale, alors que la complémentation pour le pBBRGTPA (*BuG* dans le sens inverse du *Plac*) n'est pas fonctionnelle. L'apport du gène *BuG* sauvage permet de restaurer le phénotype sauvage chez le mutant F15. L'implication de la GTPase dans la capture du DHBA est ainsi démontrée. Quant à la mutation dans le gène *pth*, elle n'intervient pas dans le phénotype mutant car la présence d'un gène *pth* sauvage n'est pas nécessaire au rétablissement d'un phénotype sauvage pour le mutant F15.

4. Création d'un mutant pour la GTPase de *B. melitensis* 16M

En parallèle de la complémentation, un mutant pour le gène *BuG* a été créé. En effet, si la complémentation n'avait pas donné de résultat positif, la question concernant l'implication du gène *BuG* dans le phénotype mutant resterait sans réponse. Nous avons choisi une méthode simple et rapide pour créer une mutation, l'intégration.

4.1. Construction d'un plasmide pour la création d'intégrants chez *Brucella* sp.

Notre premier objectif était d'obtenir un vecteur non répliatif, possédant un gène de résistance à un antibiotique qui permet une sélection facile des intégrants chez *Brucella*. Le

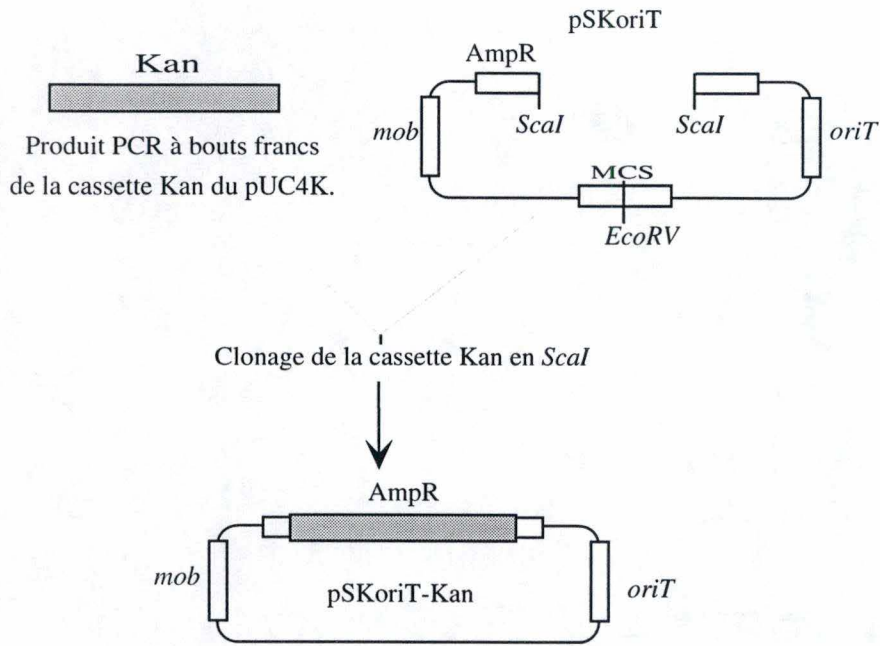


Fig 7: Schéma représentant la construction du plasmide pSKoriT-Kan, utilisable comme outil génétique chez *Brucella* sp.

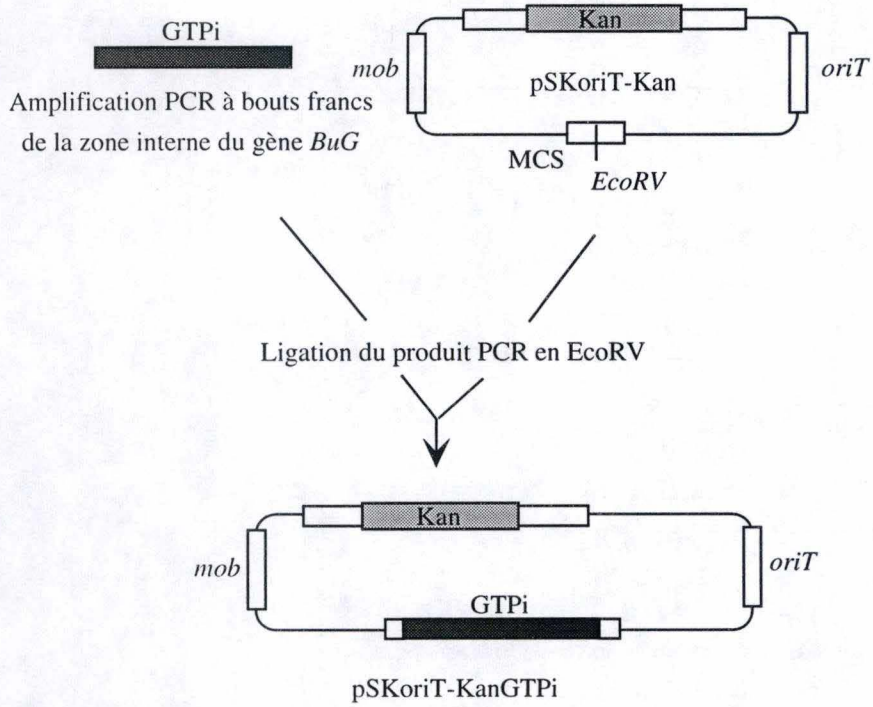


Figure 8: Construction du plasmide pSKoriT-KanGTPi

plasmide non répliatif chez *Brucella* utilisé au laboratoire, est le pSKoriT (Letesson, Tibor et al. 1997) mais ce plasmide confère la résistance à l'ampicilline. Cet antibiotique n'est pas facilement utilisable chez *Brucella* entre autre car il se dégrade assez rapidement à 37°C et que la croissance de *Brucella* est lente. En effet, plusieurs essais sont restés infructueux pour l'obtention d'intégrants Amp^R chez *Brucella* suite à la conjugaison avec ce plasmide. Par conséquent, pour pallier à cet inconvénient, une cassette Kan a été clonée dans le gène *bla* (encodant la résistance à l'ampicilline) du pSKoriT (figure 7). La cassette Kan a été amplifiée sur le plasmide commercial pUC4K avec l'enzyme Pwo et clonée bouts francs dans le pSKoriT restreint par *ScaI*. La construction finale a été nommée pSKoriT-Kan.

4. 2. Création d'un intégrant pour la GTPase potentielle de *B. melitensis* 16 M

Une portion interne du gène *BuG*, de 218 pb, a été amplifiée avec la Pwo sur l'ADN génomique de *B. melitensis* 16M par les amorces GTPi1 et GTPi2. Le produit PCR a été cloné bouts francs dans le pSKoriT-Kan linéarisé en *EcoRV*.

Des cellules DH5 α électrocompétentes ont été transformées avec le mélange de ligation puis étalées sur le milieu sélectif LB+Kanamycine. Les colonies positives ont été identifiées sur base de PCR diagnostiques sur colonies, avec les amorces Reverse (R) et Forward (F) spécifiques du plasmide situées de part et d'autre du site *EcoRI*. La piste n° 2 nous montre le profil attendu (424pb) lors d'un clonage réussi. La construction a été appelée pSK-KanGi.(figure 8+ 9) Par contre, la piste 3 montre la taille obtenue en l'absence de la portion interne de *BuG*.

Le plasmide pSK-KanGTPi a été transformé dans des cellules S17-1. Ensuite, celui-ci a été transféré par conjugaison des S17-1 donneuses à *B. melitensis* 16M (Nal^R). Les *Brucella* contenant le plasmide (Kan^R) ont été sélectionnées sur milieu LB+ Nal Kan.

4. 3. Tests phénotypiques

L'intégrant pour la GTPase de *B. melitensis* 16 M a été testé sur milieu pauvre en fer et pour la capture du DHBA. Les témoins utilisés sont la souche sauvage *B. melitensis* 16 M

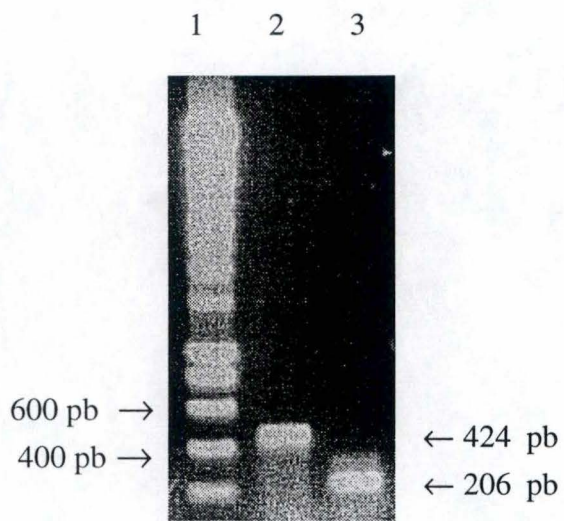


Figure 9: Résultats positif (piste 2) et négatif (piste 3) de PCR diagnostique sur colonies avec les amorces Reverse-Forward (206 pb sépare ces deux amorces). En piste 2, la PCR a donc amplifié la région interne de *BuG* clonée dans le plasmide pSK Kan.

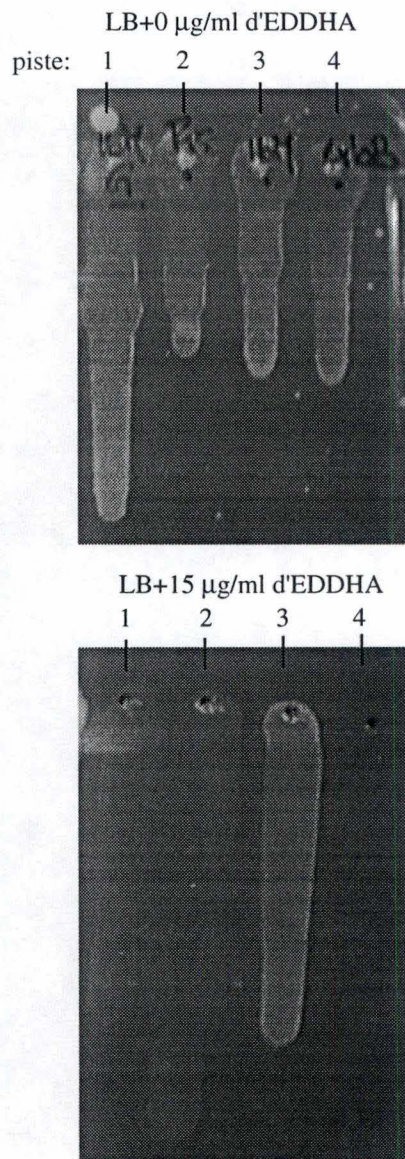


Figure 10: Croissance de la souche intégrante *BuG* de *B. melitensis* 16M (piste 1) et de la souche mutante transpositionnelle F15 (piste 2), ainsi que des témoins de croissance (la souche parentale (piste 3) et le mutant *exbB* (piste 4)); sur des milieux appauvri en fer (LB+EDDHA 0, 15 et 30 $\mu\text{g/ml}$). Sur le milieu fortement appauvri en fer (30 $\mu\text{g/ml}$ en EDDHA), aucune des souches testées ne pousse.

	Souche parentale	Mutant <i>exbB</i>	Intégrant <i>BuG</i>
LB	+	+	+
LB DFA	-	-	-
LB DFA-DHBA	+	-	-

Tableau 2: Croissance en milieu riche en fer (LB) et pauvre en fer (LB+ DFA), avec ou sans sidérophore (DHBA), de la souche de *B. melitensis* 16M disruptée dans le gène *BuG* et des témoins de capture positif et négatif, respectivement, la souche parentale et le mutant *exbB*.

et le mutant *exbB* de *B. melitensis* 16 M qui montre une croissance dépendante du fer et une déficience pour la capture du DHBA. La croissance de l'intégrant sur un milieu appauvri en fer (LB+ EDDHA15µl/ml) est amoindrie de façon similaire à celle du mutant transpositionnel F15. De plus, l'intégrant ne peut capturer le DHBA (figure 10) (tableau 2). Ces résultats confirment l'implication de la GTPase de *Brucella* dans la survie sur milieu pauvre en fer et son rôle dans la capture du DHBA.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail devait répondre à la question suivante: le gène *BuG* situé en aval du gène *pth* est-il impliqué dans les phénotypes mutants de croissance dépendante de la présence du fer dans le milieu ainsi que de la déficience dans la capture du DHBA chez *B. melitensis* 16M. La complémentation de ces phénotypes dans la souche mutante de *B. melitensis* 16M F15 par une copie sauvage du gène *BuG* démontre l'implication de *BuG* dans le phénotype mutant. Le mutant de *Brucella* dans le gène *BuG* confirme ce résultat. Ces données conduisent donc à l'hypothèse d'un effet polaire sur *BuG* dans le mutant F15. L'explication la plus probable de cet effet polaire serait que les gènes *pth* et *BuG* font partie d'un même opéron. Afin de confirmer cela, une RT-PCR pourra être réalisée avec une amorce s'hybridant de part et d'autre de l'hypothétique jonction. Un Northern blot avec comme sonde *pth* et/ou *BuG* donnera quant à lui la taille de l'opéron. Chez *E. coli*, *pth* et *ychF* (codant pour la GTPase homologue à celle codée par *BuG* chez *Brucella*) sont suffisamment proches que pour être en opéron. Cependant, les gènes situés en aval et en amont sont trop éloignés pour former une seule unité de transcription. Une explication alternative à l'effet sur *BuG* pourrait être une perturbation en aval du transposon indépendamment d'un lien transcriptionnel.

Cette GTPase est une protéine fortement conservée parmi les bactéries Gram négatives. Toutefois, aucune fonction ne lui est attribuée. La fonction donnée à cette protéine chez *Brucella* au terme de ce mémoire est la capture du DHBA. Etant donné que *pth* et *ychF* sont disposés de la même façon chez *E. coli*, le produit du gène *ychF* pourrait également être impliqué dans la capture du sidérophore.

L'utilisation de certains programmes de prédiction secondaire nous a permis de proposer que la GTPase de *Brucella* ne posséderait pas de segments transmembranaires et de séquence signal, ce qui laisse supposer que cette protéine est cytoplasmique ou en membrane interne.

En resituant le rôle de cette protéine dans ce qui est déjà décrit sur le système de capture des sidérophores chez *E.coli*, plusieurs questions se posent: cette GTPase est-elle impliquée dans la capture d'autres sidérophore que le DHBA, mais aussi dans le transport de la vitamine B12? ou encore, serait-elle l'ATPase de l'ABC transporteur spécifique au DHBA?

La première expérience à réaliser devrait donc viser à déterminer si cette protéine hydrolyse le GTP ou l'ATP. Afin d'intégrer la fonction de cette protéine dans le mécanisme de capture du fer, des expériences déterminant des interactions protéiques pourraient être réalisées. En effet, on sait que différentes protéines impliquées dans l'acquisition du fer sont en interaction.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahmer, B. M., M. G. Thomas, et al. (1995). "Characterization of the *exbBD* operon of *Escherichia coli* and the role of *ExbB* and *ExbD* in *TonB* function and stability." J Bacteriol **177**(16): 4742-7.
- Al-Tawfiq, J. A., K. R. Fortney, et al. (2000). "An isogenic hemoglobin receptor-deficient mutant of *Haemophilus ducreyi* is attenuated in the human model of experimental infection." J Infect Dis **181**(3): 1049-54.
- Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.
- Bellaire, B. H., P. H. Elzer, et al. (1999). "The siderophore 2,3-dihydroxybenzoic acid is not required for virulence of *Brucella abortus* in BALB/c mice." Infect Immun **67**(5): 2615-8.
- Biswas, G. D., J. E. Anderson, et al. (1997). "Cloning and functional characterization of *Neisseria gonorrhoeae tonB*, *exbB* and *exbD* genes." Mol Microbiol **24**(1): 169-79.
- Bitter, W., J. Tommassen, et al. (1993). "Identification and characterization of the *exbB*, *exbD* and *tonB* genes of *Pseudomonas putida* WCS358: their involvement in ferric-pseudobactin transport." Mol Microbiol **7**(1): 117-30.
- Bourne, H. R., D. A. Sanders, et al. (1991). "The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism." Nature **349**(6305): 117-27.
- Braun, M., H. Killmann, et al. (1999). "The beta-barrel domain of *FhuA*Δ5-160 is sufficient for *TonB*-dependent *FhuA* activities of *Escherichia coli*." Mol Microbiol **33**(5): 1037-49.
- Braun, V. (1995). "Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via *TonB*-*ExbB*-*ExbD*-dependent receptor proteins." FEMS Microbiol Rev **16**(4): 295-307.
- Braun, V. and K. Hantke (1991). Genetics of bacterial iron transport. CRC Handbook of microbial iron chelates: 107-138.
- Bullen, J. J. and E. Griffiths (1987). *Iron and infection*: 69-137.
- Cornish, A. S. and W. J. Page (1998). "The catecholate siderophores of *Azotobacter vinelandii*: their affinity for iron and role in oxygen stress management." Microbiology **144**: 1747-1754.
- Danese, I., A. Tibor, et al. (1996). "Transposition mutagenesis of *Brucella melitensis* 16M with a mini-Tn5K_{cat} and evaluation of the reporter gene expression." Arch. Physiol. Biochem. 104:45.
- Earhart, C. F. (1996). Uptake and metabolism of iron and molybdenum. *E. coli* and Salmonella Cellular and molecular biology. F. C. Neidhart. **1**: 1075-1090.
- Elkins, C., P. A. Totten, et al. (1998). "Role of the *Haemophilus ducreyi* *Ton* system in internalization of heme from hemoglobin." Infect Immun **66**(1): 151-60.

- Elzer, P. H., R. W. Phillips, et al. (1996). "The HtrA stress response protease contributes to resistance of *Brucella abortus* to killing by murine phagocytes." Infect Immun **64**(11): 4838-41.
- Genco, C. A., C. Y. Chen, et al. (1991). "Isolation and characterization of a mutant of *Neisseria gonorrhoeae* that is defective in the uptake of iron from transferrin and haemoglobin and is avirulent in mouse subcutaneous chambers." J Gen Microbiol **137**(Pt 6): 1313-21.
- Godfroid, F., B. Taminiau, et al. (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**(11): 5485-93.
- Godfroid, J., F. Boelaert, et al. (1995). "vie et mort de la vaccination antibrucellique des bovins dans les pays de l'union européenne (... en attendant les vaccins du futur? ...)." La vaccination en Buiatrie: 185-198.
- Gross, M., P. Crow, et al. (1992). "The site of hydrolysis by rabbit reticulocyte peptidyl-tRNA hydrolase is the 3'-AMP terminus of susceptible tRNA substrates." J Biol Chem **267**(3): 2080-6.
- Guerinot, M. L. (1994). "Microbial iron transport." Annu Rev Microbiol **48**: 743-72.
- Hancock, R. E., K. Hantke, et al. (1977). "Iron transport in *Escherichia coli* K-12. 2,3-Dihydroxybenzoate-promoted iron uptake." Arch Microbiol **114**(3): 231-9.
- Hantke, K. (1990). "Dihydroxybenzoylserine--a siderophore for *E. coli*." FEMS Microbiol Lett **55**(1-2): 5-8.
- Hofmann, K., P. Bucher, et al. (1999). "The PROSITE database, its status in 1999." Nucleic Acids Res **27**(1): 215-9.
- Jarosik, G. P., J. D. Sanders, et al. (1994). "A functional tonB gene is required for both utilization of heme and virulence expression by *Haemophilus influenzae* type b." Infect Immun **62**(6): 2470-7.
- Jiang, X. and C. L. Baldwin (1993). "Iron augments macrophage-mediated killing of *Brucella abortus* alone and in conjunction with interferon-gamma." Cell Immunol **148**(2): 397-407.
- Lambrecht, R. S. and M. T. Collins (1993). "Inability to detect mycobactin in mycobacteria-infected tissues suggests an alternative iron acquisition mechanism by mycobacteria in vivo." Microb Pathog **14**(3): 229-38.
- Lawlor, K. M., P. A. Daskaleros, et al. (1987). "Virulence of iron transport mutants of *Shigella flexneri* and utilization of host iron compounds." Infect Immun **55**(3): 594-9.
- Lazdunski, C. J., E. Bouveret, et al. (1998). "Colicin import into *Escherichia coli* cells." J Bacteriol **180**(19): 4993-5002.
- Letain, T. E. and K. Postle (1997). "TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli* [published erratum appears in *Mol Microbiol* 1997 Aug;25(3):617]." Mol Microbiol **24**(2): 271-83.
- Letesson, J. J., A. Tibor, et al. (1997). "Humoral immune responses of *Brucella*-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant *Brucella* proteins in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay." Clin Diagn Lab Immunol **4**(5): 556-64.
- Liautard, J. P., A. Gross, et al. (1996). "Interactions between professional phagocytes and *Brucella* spp." Microbiologia **12**(2): 197-206.

- Litwin, C. M. and S. B. Calderwood (1993). "Role of iron in regulation of virulence genes." Clin Microbiol Rev **6**(2): 137-49.
- Lopez-Goni, I. and I. Moriyon (1995). "Production of 2,3-Dihydroxybenzoic Acid by *Brucella* Species." Current Microbiology **31**: 291-293.
- Lopez-Goni, I., I. Moriyon, et al. (1992). "Identification of 2,3-dihydroxybenzoic acid as a *Brucella abortus* siderophore." Infect Immun **60**(11): 4496-503.
- Menninger, J. R. (1976). "Peptidyl transfer RNA dissociates during protein synthesis from ribosomes of *Escherichia coli*." J Biol Chem **251**(11): 3392-8.
- Michaux-Charachon, S., G. Bourg, et al. (1997). "Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*." J Bacteriol **179**(10): 3244-9.
- Moeck, G. S. and J. W. Coulton (1998). "TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport." Mol Microbiol **28**(4): 675-81.
- Nassif, X., M. C. Mazert, et al. (1987). "Evaluation with an *iuc::Tn10* mutant of the role of aerobactin production in the virulence of *Shigella flexneri*." Infect Immun **55**(9): 1963-9.
- Neilands, J. B. (1994). Identification and isolation of mutants defective in iron acquisition. Methods in enzymology. I. Academic Press. **235**.
- O'Callaghan, D., C. Cazeville, et al. (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**(6): 1210-20.
- Occhino, D. A., E. E. Wyckoff, et al. (1998). "Vibrio cholerae iron transport: haem transport genes are linked to one of two sets of *tonB*, *exbB*, *exbD* genes." Mol Microbiol **29**(6): 1493-507.
- Payne, S. M. (1993). "Iron acquisition in microbial pathogenesis." Trends Microbiol **1**(2): 66-9.
- Pizzaro-Cerda, J., E. Moreno, et al. (1999). *Brucella abortus* invasion and survival within professional and nonprofessional phagocytes. **6**: 201-232.
- Pope, C. D., W. O'Connell, et al. (1996). "Legionella pneumophila mutants that are defective for iron acquisition and assimilation and intracellular infection." Infect Immun **64**(2): 629-36.
- Rowland, B. M., T. H. Grossman, et al. (1996). "Sequence and genetic organization of a *Bacillus subtilis* operon encoding 2,3-dihydroxybenzoate biosynthetic enzymes." Gene **178**(1-2): 119-23.
- Salyers, A. A. and D. D. Whitt (1994). Experimental approaches to investigating the host-bacterium interaction. Bacterial pathogenesis A molecular approach: 73-89.
- Sangari, F. J. and J. Aguero (1996). "Molecular basis of *Brucella* pathogenicity: an update." Microbiologia **12**(2): 207-18.
- Schmitt, E., Y. Mechulam, et al. (1997). "Crystal structure at 1.2 Å resolution and active site mapping of *Escherichia coli* peptidyl-tRNA hydrolase." Embo J **16**(15): 4760-9.
- Schryvers, A. B. and L. J. Morris (1988). "Identification and characterization of the transferrin receptor from *Neisseria meningitidis*." Mol Microbiol **2**(2): 281-8.
- Schubert, S., D. Fischer, et al. (1999). "Ferric enterochelin transport in *Yersinia enterocolitica*: molecular and evolutionary aspects." J Bacteriol **181**(20): 6387-95.

- Sola-Landa, A., J. Pizarro-Cerda, et al. (1998). "A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence." Mol Microbiol **29**(1): 125-38.
- Tibor, A. (1999). Caractérisation de trois protéines de la membrane externe de *Brucella abortus*.
- Tsolis, R. M., A. J. Baumler, et al. (1996). "Contribution of TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse." Infect Immun **64**(11): 4549-56.
- Vartivarian, S. E. and R. E. Cowart (1999). "Extracellular iron reductases: identification of a new class of enzymes by siderophore-producing microorganisms." Arch Biochem Biophys **364**(1): 75-82.
- Weinberg, D. W. (1995). Acquisition of iron and other nutrients in vivo. Virulence mechanisms of bacterial pathogens. J. A. Roth: 79-93.
- Williams, P. and E. Griffiths (1992). "Bacterial transferrin receptors--structure, function and contribution to virulence." Med Microbiol Immunol **181**(6): 301-22.
- Wood, A. a. (1993). Principes of cellular and molecular immunology.
- Wooldridge, K. G. and P. H. Williams (1993). "Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria." FEMS Microbiol Rev **12**(4): 325-48.
- Zhao, Q. and K. Poole (2000). "A second tonB gene in *Pseudomonas aeruginosa* is linked to the exbB and exbD genes." FEMS Microbiol Lett **184**(1): 127-32.