

## THESIS / THÈSE

### MASTER IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY

#### Contribution à l'étude du trafic intracellulaire de *Brucella melitensis*

Nijskens, Caroline

*Award date:*  
2002

[Link to publication](#)

#### General rights

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

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

#### Take down policy

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



---

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

**Faculté des Sciences**

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DU TRAFIC INTRACELLULAIRE DE *BRUCELLA  
MELITENSIS***

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

Caroline NIJSKENS  
Juin 2002

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix  
FACULTE DES SCIENCES**

Secrétariat du Département de Biologie

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20

E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Contribution à l'étude du trafic intracellulaire de *Brucella melitensis***

NIJSKENS Caroline

Résumé

*Brucella* est une bactérie pathogène capable de se répliquer dans des cellules eucaryotes. Cependant, les processus d'internalisation de cette bactérie et les aspects moléculaires de son trafic intracellulaire restent peu connus.

La première partie de ce mémoire met en évidence l'importance du cholestérol, un constituant de la membrane plasmique, lors de l'internalisation de *Brucella melitensis* dans les macrophages bovins. En effet, une déplétion en cholestérol par traitement des cellules avec la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine entraîne une diminution de l'internalisation de *Brucella*. Cet effet est réversible après 16 h d'incubation avec du milieu contenant du sérum.

Dans la deuxième partie, nous tentons de mettre au point un modèle amibien, *Acanthamoeba castellanii*, pour étudier le trafic intracellulaire de *Brucella*. Nous ne détectons pas de réplication de *Brucella* dans cette amibe ; *Brucella* semble être digérée par *A. castellanii*.

Dans la troisième partie, nous étudions le rôle du régulateur transcriptionnel VjbR, impliqué dans le contrôle de l'expression de l'opéron *virB*, dans le trafic intracellulaire de *Brucella*. Nous avons démontré lors d'une infection de macrophages bovins, que la présence de la souche sauvage restaure la capacité du délétant  $\Delta vjbR$  à se répliquer dans ces cellules. Ceci implique que la souche sauvage établit sa niche de réplication grâce à un facteur activé par VjbR et en fait profiter le mutant.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2002

**Promoteur:** J.-J. Letesson

Merci à Monsieur Letesson de m'avoir permis de réaliser mon mémoire dans son laboratoire.

Anne, je tiens à te dire Merci même si cela ne me semble pas suffisant. Merci pour ton aide, ton soutien et tes conseils que ce soit dans le cadre de mon mémoire ou d'un point de vue plus personnel. Merci d'avoir réussi à me rendre le sourire dans les moments les plus difficiles. Mille Merci pour tout !

Christian, merci pour ton aide et pour tes blagues. Merci d'être venu prendre de nos nouvelles tous les matins et de nous avoir encouragées (à ta manière) pendant ces quelques mois.

Valérie (un énorme Merci pour ta disponibilité « sans frontières »), Céline (Merci pour ta bonne humeur et ton énergie contagieuses), Marie (Merci pour ton aide lors de la rédaction), Thierry (alias Garçon, Merci pour ton aide quand le spectro ne voulait pas « m'écouter »), Amélie (Merci pour ton soutien moral), Mauro, Régis, David, Chantal, Calou et Stéphanie, je vous remercie d'avoir été là durant mon mémoire.

Rose-May, un grand merci pour tes explications, tes conseils et tes corrections qui m'ont été plus que très utiles.

Merci aux membres du jury (Madame Benet, Monsieur Vandenhautte, Monsieur Jadot et Monsieur Dujardin) d'avoir accepté de lire ce travail.

Merci aussi à Marie, Caroline, Géraldine, Valérie, Augustina et Marina. Eh oui, on était toutes sur le même bateau !

Merci à Johan d'avoir supporté mes sautes d'humeur et mes crises de nerfs pendant ces quelques mois enrichissants mais difficiles.

Et pour terminer, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont été là pour moi à un moment ou à un autre. Merci aussi à mes parents de m'avoir donnée l'opportunité de terminer mes études.

« On se lasse de tout sauf de comprendre. »

(attribué à VIRGILE par Servius au IV<sup>ème</sup> siècle)

## TABLE DES MATIERES

<b>I. INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
I.1. INTERNALISATION .....	1
I.1.1. La membrane plasmique et les « lipid rafts » .....	1
I.1.2. Les différents modes d'endocytose .....	4
I.1.3. La phagocytose.....	6
I.1.4. Les stratégies utilisées par les agents pathogènes pour envahir les cellules eucaryotes .....	8
I.1.4.1. Les « lipid rafts » comme porte d'entrée pour les microorganismes .....	8
I.1.4.2. La phagocytose de microorganismes.....	10
I.2. TRAFIC INTRACELLULAIRE .....	13
I.2.1. Trafic intracellulaire classique des endosomes.....	13
I.2.2. Les phagosomes .....	14
I.2.3. Les mécanismes moléculaires.....	16
I.2.4. Les stratégies utilisées par les agents pathogènes pour dévier le trafic intracellulaire classique .....	20
I.3. BRUCELLA, BACTÉRIE PATHOGÈNE INTRACELLULAIRE .....	23
I.3.1. Les bactéries du genre <i>Brucella</i> .....	23
I.3.2. Brucelloses humaines et animales.....	24
I.3.3. Pathogénie de <i>Brucella</i> .....	24
I.3.4. <i>Brucella</i> , une bactérie pathogène intracellulaire .....	25
I.3.4.1. Internalisation .....	25
I.3.4.2. Trafic intracellulaire de <i>Brucella</i> .....	26
I.3.5. Les facteurs de virulence .....	30
I.3.5.1. Le régulateur VjbR et le système VirB.....	31
<b>II. BUT DU MÉMOIRE.....</b>	<b>36</b>
<b>III. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>37</b>
III.1. EFFET DU CHOLESTÉROL SUR L'INTERNALISATION DE <i>BRUCELLA MELITENSIS</i> DANS LES CELLULES PHAGOCYTAIRES .....	37
III.1.1. Effet de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine sur l'internalisation de <i>B. melitensis</i> .....	37
III.1.2. Réversibilité de l'effet de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine sur l'internalisation de <i>B. melitensis</i> .....	39
III.1.3. Dosage du cholestérol après traitement avec la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine .....	40
III.1.4. Discussion et perspectives .....	41
III.2. UTILISATION DE L'AMIBE <i>ACANTHAMOEBA CASTELLANII</i> COMME MODÈLE DE RÉPLICATION INTRACELLULAIRE DE <i>B. MELITENSIS</i> .....	43
III.2.1. Introduction .....	43
III.2.2. Mise au point du temps de contact .....	44
III.2.3. Effet de la dose bactérienne infectante.....	45
III.2.4. Effet de la présence de la gentamycine en cours d'infection.....	45
III.2.5. Effet des conditions de culture des amibes.....	46
III.2.6. Cinétique de l'infection d' <i>A. castellanii</i> par <i>B. melitensis</i> .....	49
III.2.7. Discussion et perspectives .....	52

III.3. ETUDE DU RÔLE DE VJBR DANS LA RÉPLICATION INTRACELLULAIRE .....	54
III.3.1. Complémentation du délétant $\Delta vjbR3$ par la souche sauvage de <i>B. melitensis</i> .....	54
III.3.2. Discussion et perspectives .....	56
<b>IV. CONCLUSION .....</b>	<b>59</b>
<b>V. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>61</b>
V.1. SOUCHES BACTÉRIENNES ET CELLULES EU CaryOTES .....	61
V.1.1. les souches bactériennes.....	61
V.1.2. les cellules eucaryotes .....	63
V.2. LE PLASMIDE PBB4 .....	63
V.3. LES MILIEUX DE CULTURE .....	63
V.3.1. Milieu Luria Bertani (LB).....	64
V.3.2. Milieu 2YT.....	64
V.3.3. Solutions stocks d'antibiotiques.....	64
V.3.4. Milieu RPMI 1640.....	64
V.3.5. Milieu DMEM.....	64
V.3.6. Milieu Ac.....	65
V.4. TRANSFORMATION.....	65
V.4.1. Préparation de cellules <i>E. coli</i> compétentes.....	65
V.4.2. Transformation des cellules compétentes .....	66
V.5. CONJUGAISON .....	66
V.6. ELECTROPORATION.....	67
V.7. INFECTION DE MACROPHAGES BOVINS AVEC BRUCELLA.....	68
V.8. CHOLESTÉROL : DOSAGE ET EFFET SUR L'INTERNALISATION DE <i>B. MELITENSIS</i> .....	69
V.8.1. La méthyl- $\beta$ -cyclodextrine.....	69
V.8.2. Effet du traitement à la MCD sur la quantité de cholestérol.....	70
V.8.3. Effet du traitement à la MCD sur l'infection par <i>Brucella</i> .....	70
V.9. INFECTION D' <i>A. CASTELLANII</i> AVEC BRUCELLA.....	71
V.10. COLORATION ROUGE CONGO D' <i>A. CASTELLANII</i> .....	72
V.11. OBSERVATION DE L'ÉMISSION DE LA FLUORESCENCE PAR LA PROTÉINE GFP EN MICROSCOPIE À FLUORESCENCE .....	72
<b>VI. BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>74</b>

# I. INTRODUCTION

Les maladies bactériennes continuent à être une cause de morbidité et de mortalité importante dans le monde. Les bactéries pathogènes résistent de mieux en mieux aux traitements antibiotiques. Afin d'améliorer les moyens de préventions et les traitements actuels, il est donc important de mieux comprendre les modes d'action de ces bactéries (Finlay et Cossart, 1997).

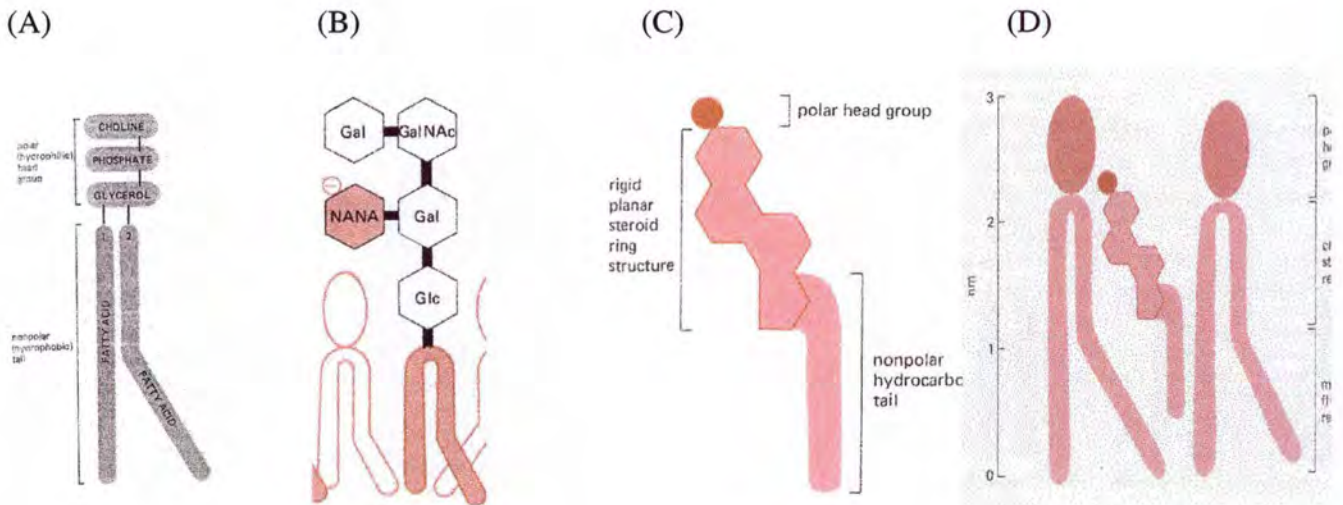
Dans ce travail, nous nous focaliserons sur les bactéries à tropisme intracellulaire. Nous commencerons par décrire les différents modes d'internalisation utilisés par les cellules eucaryotes. Nous décrirons ensuite quelques stratégies utilisées par des bactéries pathogènes pour pénétrer les cellules de l'organisme hôte. Dans un second temps, nous détaillerons le trafic endocyttaire classique ainsi que quelques stratégies employées par des agents pathogènes pour interférer avec ce trafic. Nous terminerons cette introduction par une description plus détaillée de *Brucella* qui est la bactérie qui nous intéresse dans ce travail.

## ***1.1. Internalisation***

La membrane plasmique a plusieurs fonctions ; elle joue le rôle de barrière à perméabilité sélective, permet la compartimentalisation de la cellule et les interactions entre les cellules, donne des réponses à des signaux extracellulaires, est un site d'activité enzymatique, permet des mécanismes de transport relativement sélectifs et elle est le site de l'internalisation de matériel extracellulaire.

### **1.1.1. La membrane plasmique et les « lipid rafts »**

La membrane plasmique est une bicouche phospholipidique entourant les cellules. Cette membrane est constituée de différents types de lipides (dont principalement des phospholipides, des sphingolipides, des glycolipides et du cholestérol) (fig I.1) et de protéines intervenant pour la plupart dans la transduction du signal et dans l'internalisation de composés indispensables à la survie cellulaire.



**Figure I.1 :** Présentation des différents constituants présents en membrane plasmique. (A) Représentation d'un phospholipide. (B) Représentation du ganglioside GM1. (C) Représentation du cholestérol. (D) Représentation du cholestérol inséré en membrane.

Dans ce mémoire, nous nous intéressons principalement au cholestérol qui est un composant très important de la membrane plasmique jouant un rôle vital dans la transduction du signal chez les eucaryotes supérieurs. En effet, ce stérol intervient dans le maintien de la membrane c'est-à-dire qu'il assure une certaine fluidité au niveau de la bicouche lipidique et il joue aussi un rôle important dans l'internalisation de certaines bactéries (Kurzchalia, 1999; Shin et Abraham, 2001).

Lorsque du cholestérol et des sphingolipides se regroupent en un microdomaine membranaire ordonné, on parle alors de « lipid rafts ». Les « lipid rafts » sont des assemblages latéraux dynamiques de lipides vraisemblablement situés sur le feuillet exoplasmique de la membrane plasmique mis en évidence suite à l'insolubilité de ces radeaux dans les détergents non-ioniques à basse température.

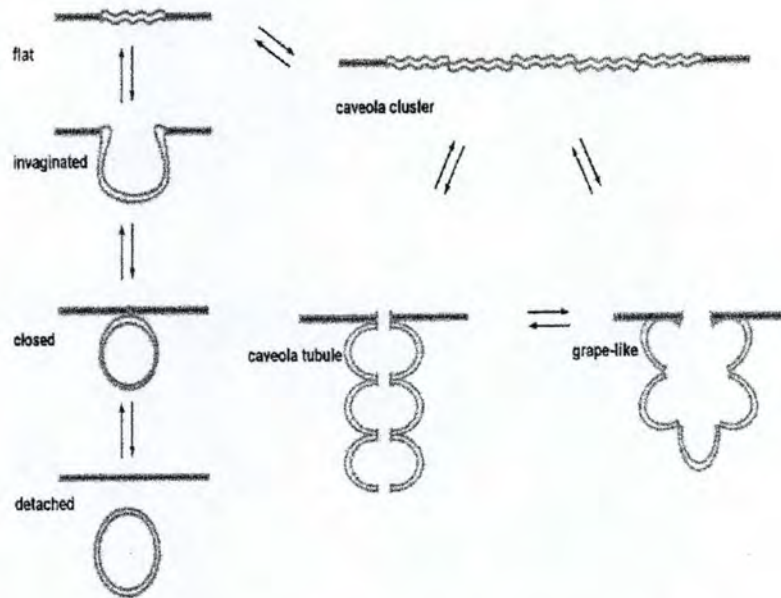
Ces radeaux se forment sans doute suite aux propriétés biophysiques (température de fusion haute pour les sphingolipides et basse pour les glycérophospholipides) des sphingolipides et du cholestérol qui s'agencent étroitement en domaines de liquide ordonné (environnement ordonné) qui se séparent des glycérophospholipides plus désorganisés dans la membrane.

Des lipoprotéines (à ancre glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) ou acylation par un myristate ou un palmitate) et certaines protéines transmembranaires sont concentrées dans ces radeaux lipidiques alors que d'autres en sont exclues. Ces radeaux lipidiques se retrouvent au niveau de la membrane plasmique mais aussi au niveau des membranes endosomales (D.A.Brown, 1998; Ikonen, 2001; Rosenberger *et al.*, 2000).

D'autre part, dans la littérature, on parle aussi de cavéoles qui sont des « lipid rafts » particuliers caractérisés par la présence de cavéoline. La cavéoline est une protéine de 22kDa qui formerait un manteau autour de la cavéole naissante (Parton, 2001). Le maintien d'une

grande quantité de cholestérol dans les cavéoles est un processus actif qui nécessite la présence de cavéoline-1 (dont la transcription est elle-même régulée par le cholestérol) (Anderson, 1998; Fielding et Fielding, 2001; Matveev, 2001).

Les cavéoles présentent une morphologie variée ; on trouve des cavéoles plates, en forme d'ampoule de 50 à 100nm de diamètre mais aussi sous forme tubulaire (fig I.2) (D.A.Brown, 1998; Kurzchalia, 1999; Shin et Abraham, 2001).

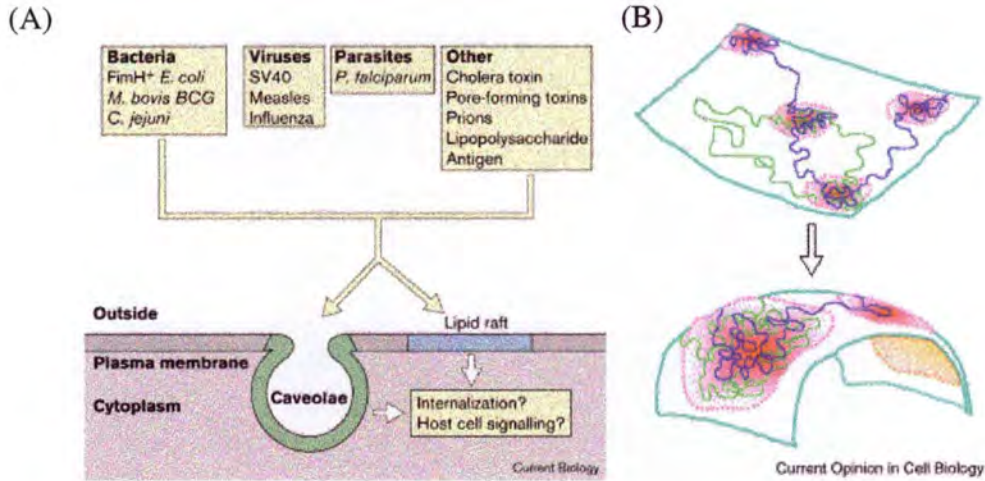


**Figure I.2 :** Représentation des différentes morphologies des cavéoles. Les cavéoles sont des microdomaines dynamiques ayant différentes formes. Certaines cellules n'ont des cavéoles que d'une seule forme alors que d'autres cellules présentent des cavéoles de formes différentes (repris de Matveev, 2001).

Dorénavant, dans ce mémoire, nous utiliserons le terme de « lipid rafts » pour désigner les « lipid rafts » contenant de la cavéoline ou pas bien que ce sujet soit encore controversé dans la littérature (Nichols et Lippincott-Schwartz, 2001; Shin et Abraham, 2001).

Les fonctions des « lipid rafts » sont multiples mais les rôles précis de ces derniers ne sont pas complètement compris. Ils jouent un rôle important dans la transduction du signal et seraient des plates-formes d'internalisation pour l'importation de certaines macromolécules dans la cellule hôte. Les « lipid rafts » représentent un petit pourcentage de la surface cellulaire mais leur haute concentration en molécules intervenant dans la transduction du signal en fait une cible naturelle pour les microorganismes pathogènes désirant communiquer avec la cellule hôte (fig I.3) (Rosenberger et al., 2000). Les « lipid rafts » seraient aussi utilisés comme une porte d'entrée avantageuse pour les microorganismes pathogènes puisqu'ils génèrent une endocytose particulière (voir points I.1.2 et 3) (Gruenberg, 2001 ;

Anderson, 1998; Nichols et Lippincott-Schwartz, 2001; Rosenberger et al., 2000; Shin et Abraham, 2001).



**Figure I.3 :** (A) Les « lipid rafts » et les cavéoles sont utilisés comme porte d'entrée par les microorganismes pathogènes (repris de Rosenberger et al., 2000). (B) Les « lipid rafts » se regroupent dans la membrane suite à un stimulus originaire du cytosol ou de l'extérieur (interaction récepteur-ligand, par exemple) et provoquent la formation d'une vésicule. La composition lipidique contribue probablement à la courbe de la membrane. Le trajet de deux protéines ayant une affinité pour les « lipid rafts » est représenté (les lignes bleues et vertes) (repris de Ikonen, 2001).

### 1.1.2. Les différents modes d'endocytose

L'internalisation de matériel extracellulaire dans des vacuoles provenant de la membrane plasmique se déroule via un processus nommé l'endocytose. Il existe plusieurs types d'internalisation suivant la taille de la particule à internaliser, l'intervention de la clathrine ou non et l'intervention de l'actine ou non.

L'endocytose se divise en deux grands groupes ; des processus indépendants de récepteurs qui concernent l'internalisation des fluides péricellulaires ou pinocytose et des processus dépendants de récepteurs qui concernent l'internalisation des macromolécules et des particules (tableau I.1). La pinocytose se subdivise en deux classes ; la micropinocytose qui donne lieu à des vacuoles d'internalisation d'un diamètre inférieur à 200nm dérivant d'invagination de la membrane plasmique et la macropinocytose qui donne lieu à des vacuoles d'un diamètre supérieur à 200nm. Les processus récepteur-dépendants se subdivisent également ; donnant lieu à des vacuoles d'un diamètre inférieur à 200nm, l'endocytose au sens strict dépendante de la clathrine et l'endocytose médiée par les cavéoles indépendante de la clathrine (voir paragraphe suivant). La phagocytose donne lieu à des vacuoles d'un diamètre supérieur à 200nm (Nichols et Lippincott-Schwartz, 2001; Rittig et al., 1999). Cependant, une autre définition de la phagocytose consiste à dire qu'elle est caractérisée par

l'internalisation de particules d'une taille supérieure à 0,5µm (Aderem et Underhill, 1999; Pieters, 2001).

Lorsque les vésicules ont une taille inférieure à 200nm, le processus est indépendant de la polymérisation de l'actine et dépendant de la clathrine (à l'exception des cavéoles). La clathrine est une grande protéine qui polymérise en un triskélion composé de trois chaînes lourdes et de trois chaînes légères. Ces triskélions polymérisent et forment le manteau de clathrine autour de la vésicule (Gruenberg, 2001). Tandis que la macropinocytose et la phagocytose sont des processus indépendants de la clathrine mais dépendants de la polymérisation de l'actine.

**Tableau I.1 :** Tableau récapitulatif des différents modes d'endocytose. Les processus indépendants de l'actine ou de la clathrine sont notés Ind.. Tandis que les processus dépendants sont notés Dép.. Pour les cavéoles, les études de l'implication de l'actine sont en cours.

	Mécanisme indépendant des récepteurs		Mécanisme dépendant des récepteurs		
	vésicule < 200nm	vésicule > 200nm	vésicule < 200nm		vésicule > 200nm
	<b>Micropinocytose</b>	<b>Macropinocytose</b>	<b>Endocytose</b>	<b>Cavéole</b>	<b>Phagocytose</b>
Actine	Ind.	Dép.	Ind.	?	Dép.
Clathrine	Dép.	Ind.	Dép.	Ind.	Ind.

L'endocytose impliquant des « lipid rafts » contenant souvent de la cavéoline est indépendante de la clathrine et différente de la voie d'endocytose classique. En effet, les vésicules formées ne fusionneraient pas avec les endosomes ni avec les lysosomes (Shin et Abraham, 2001). Ceci s'explique probablement par le fait que leur rôle physiologique (permettre l'entrée de ligands dans la cellule et les amener au compartiment cible, par exemple) implique de ne pas dégrader la molécule transportée (Anderson, 1998; Shin et Abraham, 2001). Les cavéoles permettent, en effet, une internalisation récepteur-dépendante de certaines macromolécules :

- La diffusion sans internalisation de membrane nommée potocytose concerne par exemple le folate, ...
- L'encapsulation et la translocation avec internalisation de membrane concernent par exemple des hormones, le cholestérol, les IgA,... Ces macromolécules sont alors dirigées vers le compartiment cible sans être dégradées ni inactivées.

La sélectivité selon laquelle les macromolécules arrivent à utiliser les cavéoles pour entrer dans les cellules est clairement établie puisque seuls les ligands dont les récepteurs sont localisés au niveau des cavéoles parviennent à entrer de cette manière (Anderson, 1998; Nichols et Lippincott-Schwartz, 2001; Rosenberger et al., 2000; Shin et Abraham, 2001).

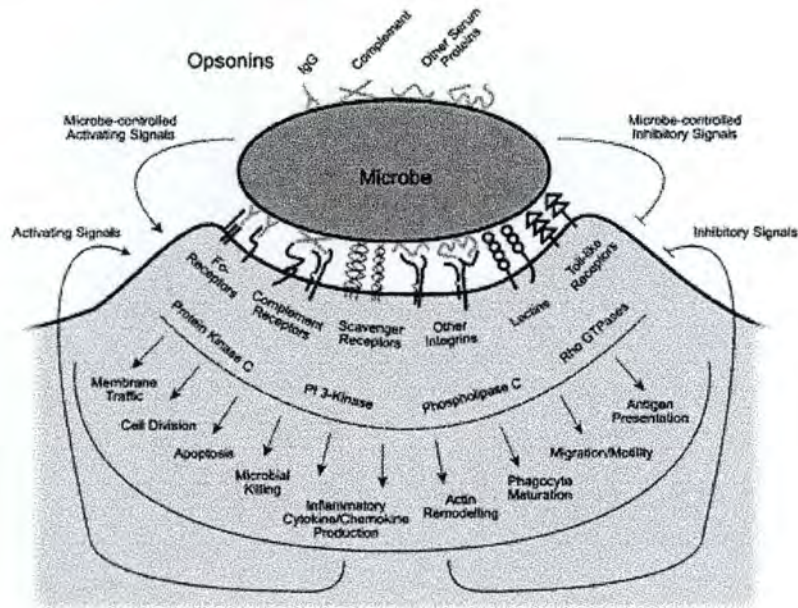
Nous nous intéresserons plus particulièrement à la phagocytose puisque c'est le mécanisme majeur d'internalisation des bactéries, des parasites et des champignons.

### 1.1.3. La phagocytose

La phagocytose permet à l'organisme d'éliminer certains agents infectieux, d'éliminer des cellules sénescents mais elle intervient aussi dans le développement, le remodelage des tissus; la réponse immunitaire ou encore l'inflammation.

La phagocytose est très efficace chez des cellules spécialisées encore nommées cellules phagocytaires professionnelles comme les macrophages, les neutrophiles et les monocytes (Rittig et al., 1999). Cependant, la phagocytose se déroule aussi chez des cellules phagocytaires non professionnelles mais le processus y est moins efficace. La raison principale est l'absence chez ces cellules de récepteurs qui augmentent la gamme et le taux de phagocytose comme chez les cellules phagocytaires professionnelles (Aderem et Underhill, 1999). Presque tous les types de cellules de mammifères sont donc capables de réaliser la phagocytose à condition qu'une liaison récepteur-ligand puisse s'établir. Les récepteurs impliqués dans la phagocytose sont traditionnellement classés en trois groupes. Il s'agit des récepteurs Fc, des récepteurs au complément (CR) et d'un nombre toujours croissant d'autres récepteurs (comme les récepteurs scavenger, les récepteurs au mannose, les récepteurs aux composants de la matrice extracellulaire, les récepteurs « Toll-like »). Les ligands intervenant dans la phagocytose sont soit des motifs structuraux de la surface microbienne elle-même soit des opsonines de l'hôte qui recouvrent la surface du microorganisme ; on parle respectivement de phagocytose non-opsonique et de phagocytose opsonique (Aderem et Underhill, 1999; Rittig et al., 1999).

La phagocytose se déroule suivant un mécanisme complexe (fig I.4). En effet, plusieurs récepteurs différents reconnaissent une même particule et la phagocytose est souvent médiée par plusieurs récepteurs simultanément. De plus, les récepteurs reconnus par les microbes induisent des voies de transduction du signal différentes et ces signaux peuvent interagir entre eux. La reconnaissance des microbes est, en outre, couplée à la réponse inflammatoire qui influencera l'efficacité de l'internalisation des particules par le phagocyte lui-même mais aussi l'état d'activation des cellules immunitaires environnantes (Underhill et Ozinsky, 2002).



**Figure I.4 :** Schéma démontrant la complexité de la phagocytose (repris de Underhill et Ozinsky, 2002).

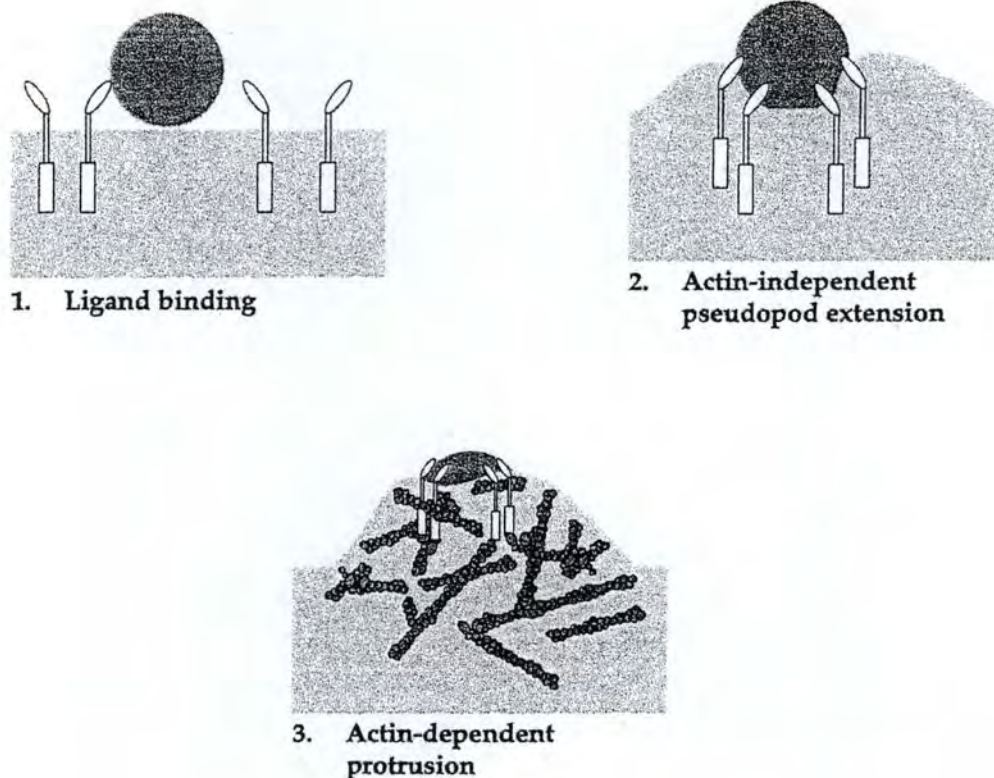
Il existe différents types de phagocytose (via les récepteurs Fc, via les récepteurs au complément, ...). La phagocytose médiée par les récepteurs Fc est la mieux décrite et a abouti au modèle classique de type « zipper » (fig I.7). Cependant, les différents types de phagocytose peuvent être divisés en quatre étapes (fig I.5) :

1-Interaction entre les récepteurs et leurs ligands. Cette première étape permet l'attachement de la particule à internaliser sur la membrane de la cellule et le regroupement des récepteurs.

2-Activation des voies de transduction du signal à partir des récepteurs qui entraînera le recrutement des protéines régulant la réorganisation du cytosquelette d'actine au site d'attachement de la particule. Lors de la deuxième étape, on constate l'apparition d'une légère extension de la membrane plasmique suivant un mode indépendant de l'actine.

3-Cette réorganisation du cytosquelette entraîne la formation de pseudopodes membranaires autour de la particule de manière à l'entourer complètement. Ce processus est dépendant de l'actine.

4-Elimination du manteau d'actine entourant le phagosome nouvellement formé et maturation du phagosome en phagolysosome et dégradation de la particule ingérée.



**Figure 1.5 :** Présentation schématique des trois premières étapes de la phagocytose. (1) Représente la liaison du ligand sur ses récepteurs. (2) Représente l'extension des pseudopodes via un mécanisme actine-indépendant. (3) Représente la formation de pseudopodes via un mécanisme actine-dépendant (repris de May et Machesky, 2001).

La liaison aux récepteurs provoque l'activation des voies de transduction du signal qui consiste souvent en une cascade de phosphorylation à partir des récepteurs. La seconde étape implique des changements au niveau de l'actine du cytosquelette dus principalement à l'intervention de calcium, de phospholipases, de protéines de type kinases C, des phosphoinositides kinases, de petites GTPases de la famille des Rho GTPases (surtout RhoA, Rac1 et Cdc42) et de GTPases de facteurs d'ADP-ribosylation (Ernst, 2000; May et Machesky, 2001; Underhill et Ozinsky, 2002).

Actuellement, la phagocytose est étudiée de différentes manières. On peut soit tenter de retrouver les fonctions des protéines intervenant dans la phagocytose en exprimant des dominants négatifs de ces protéines ou en délétant le gène encodant la protéine en question (Aderem et Underhill, 1999). Des organismes génétiquement manipulables comme l'amibe *Dictyostelium discoïdeum*, *Drosophila*, ... sont utilisés pour mieux comprendre la phagocytose. D'autres méthodes comme l'analyse de l'expression sur cDNA array est employée pour étudier les interactions microbe-phagocyte (Underhill et Ozinsky, 2002).

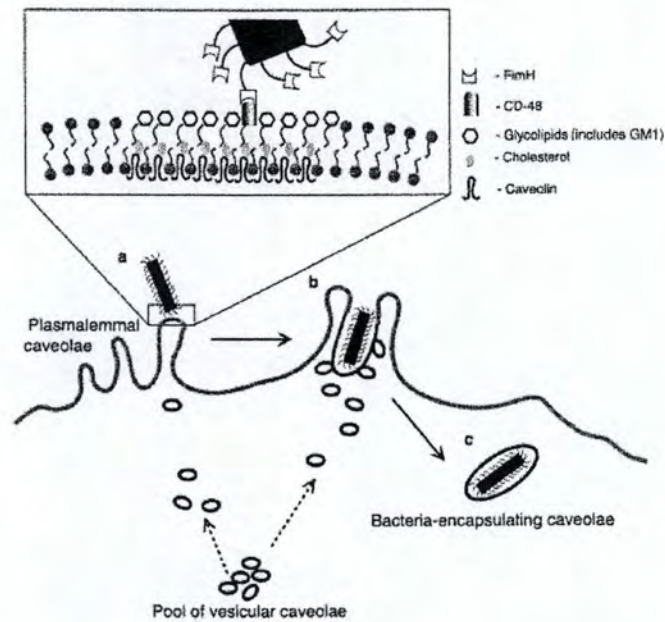
I.1.4. Les stratégies utilisées par les agents pathogènes pour envahir les cellules eucaryotes

I.1.4.1. Les « lipid rafts » comme porte d'entrée pour les microorganismes

Il a été démontré que certains microorganismes pathogènes comme *Mycobacterium spp* et *Escherichia coli* sont internalisés au niveau des « lipid rafts ».

*M. tuberculosis* entre principalement au niveau des cavéoles de la membrane plasmique des macrophages en interagissant avec des récepteurs du complément de type 3 mais aussi avec des récepteurs Fc et d'autres récepteurs comme les récepteurs au mannose et les récepteurs scavenger. Gatfield montre qu'une déplétion en cholestérol à l'aide de cyclodextrine n'influence pas les récepteurs au complément mais que *M. tuberculosis* n'est plus capable d'entrer dans la cellule hôte. Ceci prouve que le cholestérol qui, rappelons le est concentré au niveau des « lipid rafts », est indispensable à l'internalisation de cette bactérie. Le cholestérol sert, en fait, de site d'ancrage pour *Mycobacterium spp* mais le récepteur bactérien au cholestérol n'est pas encore connu. De plus, le cholestérol présent au niveau de la vésicule d'endocytose permet l'association de la protéine TACO (« tryptophane aspartate-containing coat protein ») de la cellule hôte indispensable pour la survie intracellulaire de *Mycobacterium spp* puisque c'est grâce à ce manteau de protéines TACO entourant son phagosome que cette bactérie empêche la fusion phagolysosomale (Gatfield et Pieters, 2000; Pieters, 2001; Pieters et Gatfield, 2002).

En ce qui concerne *E. coli*, il faut se rappeler que cet entéropathogène est une bactérie extracellulaire mais qui, dans certains cas, peut se faire internaliser. La bactérie est internalisée dans les macrophages au niveau des cavéoles suite à l'interaction entre l'adhésine FimH (« mannose-binding fimbrial adhesin ») et son récepteur, le CD48 (protéine à ancre GPI) qui se trouve au niveau de ces microdomaines. Suite à l'ancrage de *E. coli* sur la cellule au niveau de la cavéole, il y aura un recrutement de vésicules cytoplasmiques riche en lipides pour agrandir la vacuole d'internalisation de *E. coli* (fig I.6) (Gatfield et Pieters, 2000; Shin et Abraham, 2001; Shin et Abraham, 2001).



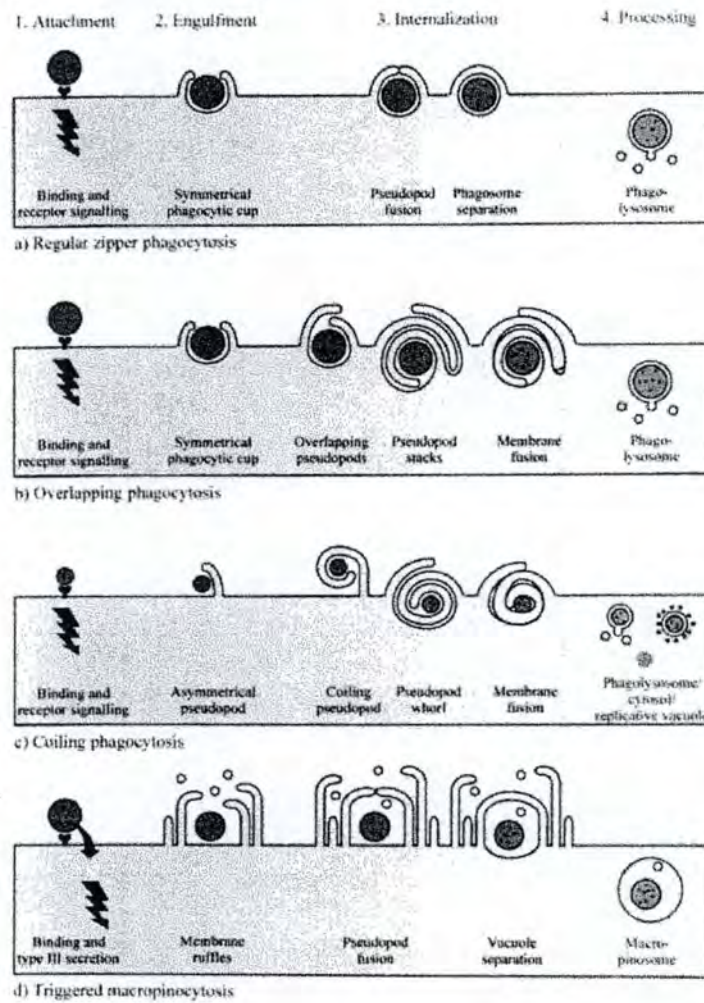
**Figure I.6 :** Modèle de l'internalisation de *E. coli* FimH positif au niveau des cavéoles de la membrane plasmique. (a) Couplage spécifique entre une bactérie exprimant FimH et le récepteur CD48 localisé au niveau des cavéoles. Ce couplage provoque la venue de cavéoles vésiculaires du pool intracytoplasmique vers le site d'attachement de la bactérie. En encadré, un agrandissement de la membrane du cavéole montrant sa composition. (b) Les cavéoles recrutées viennent étendre la membrane plasmique au niveau du site d'internalisation de la bactérie. (c) Les extensions de la membrane plasmique forment éventuellement un compartiment intracellulaire possédant des cavéoles (repris de Shin et Abraham, 2001).

Plusieurs autres microorganismes pathogènes se font internaliser via les « lipid rafts ». Il s'agit par exemple de *Plasmodium falciparum* et *Toxoplasma gondii* mais aussi du virus SV 40 (« simian virus ») (Lauer et al., 2000; Robibaro et al., 2002; Samuel et al., 2001; Shin et Abraham, 2001; Shin et Abraham, 2001).

#### 1.1.4.2. La phagocytose de microorganismes

La phagocytose est reconnue depuis plus d'un siècle comme étant un moyen de limiter voire d'éliminer des infections. Mais, les microorganismes pathogènes sont capables de détourner la phagocytose à leur avantage et de l'induire chez les cellules phagocytaires non professionnelles (Ernst, 2000).

Les mécanismes d'entrée dans les cellules hôtes varient d'un microorganisme pathogène à l'autre. Rittig (Rittig et al., 1999) dénombre quatre types de phagocytose de microorganismes présentés dans la figure I.7 ci-dessous.



**Figure I.7 :** Différents modes de phagocytose employés par les microorganismes pour envahir les cellules hôtes. Le mécanisme « Zipper » (A), « l'overlapping phagocytosis » (B), la « coiling phagocytosis » (C) et le mécanisme « Trigger » (D) (repris de Rittig et al., 1999).

Certaines bactéries pathogènes comme *Yersinia spp* ou *Listeria monocytogenes* sont internalisées par un mécanisme « zipper-like » où les protéines bactériennes de surface lient les récepteurs de l'hôte comme si on fermait une fermeture éclair. Elle existe chez les phagocytes professionnels et non professionnels (P.Cossart, 2001).

Pour *L. monocytogenes*, le ligand est une internaline bactérienne qui interagit avec une E-cadhérine c'est-à-dire une molécule d'adhésion humaine avec une grande spécificité (Meresse et al., 1999).

La « coiling phagocytosis » et « l'overlapping phagocytosis » sont d'autres types de phagocytose principalement observés chez les phagocytes professionnels.

Des microorganismes pathogènes comme *Legionella pneumophila*, *Leishmania promastigote*, *Trypanosoma brucei*, les spirochètes ... entrent dans les cellules par « coiling

phagocytosis ». Ce type de phagocytose diffère de la phagocytose classique car il n'y a extension que d'un seul pseudopode, qu'il n'y a pas fusion de deux pseudopodes au-dessus de la particule, que le pseudopode unique forme plusieurs couches et que la transformation intracellulaire du pseudopode se réalise grâce à des fusions membranaires. Ce type de phagocytose est induit par la cellule hôte car il est utilisé que les microorganismes soient vivants ou tués.

Les deux mécanismes suivants ne semblent pas être utilisés par les cellules en conditions physiologiques normales et concernent surtout l'entrée dans des phagocytes non professionnels.

*Salmonella spp* et *Shigella spp* utilisent un mécanisme phagocytaire dit « trigger » qui entraîne la formation de grands pseudopodes au niveau du site d'attachement. Donc, le microorganisme pathogène sera internalisé dans un macropinosome en même temps que les fluides et petites particules environnantes. En fait, le mécanisme de phagocytose « trigger » s'apparente à de la macropinocytose. Ce phénomène est induit par la bactérie et nécessite un système de sécrétion contact dépendant (type III) qui fait pénétrer des protéines bactériennes dans la cellule hôte. Ces protéines provoquent une modification des voies de transduction du signal. Dans le cas de *Salmonella spp*, il s'agit de protéines principalement encodées par l'îlot de pathogénicité I (SPI-I) comme SipA et SipC. Tandis que pour *Shigella spp*, il s'agit de protéines encodées par l'opéron *ipa* comme IpaB et IpaC et par le système de sécrétion *mxi-spa* (Meresse et al., 1999; P.Cossart, 2001; Gorvel et Meresse, 2001; Pieters, 2001; Ugalde, 1999).

D'autres microorganismes pathogènes comme les protozoaires parasites (*Toxoplasma spp*, *Plasmodium spp*, *Trypanosoma spp*, ...) entrent dans la cellule hôte via des invaginations de la membrane plasmique au lieu d'être internalisés suite à l'apparition de pseudopodes. Ce mécanisme est provoqué activement par les parasites en question. *Trypanosoma cruzi*, par exemple, recrute activement les lysosomes de la cellule hôte au niveau de son site d'attachement pour former la vacuole « parasitophore » alors que les *T. cruzi* morts entrent via le mécanisme classique c'est-à-dire à l'aide de pseudopodes.

## **1.2. Trafic intracellulaire**

### **1.2.1. Trafic intracellulaire classique des endosomes**

Dans les cellules eucaryotes supérieures, suite à l'endocytose au sens large, on se retrouve avec différents types de vésicules ; des vésicules entourées de clathrine, des vésicules entourées d'actine ou des vésicules impliquant la cavéoline.

Nous décrivons le trafic intracellulaire endosomal classique (fig I.8).

Les particules endocytées incluant les récepteurs et leurs ligands sont amenées au niveau des endosomes précoces où un premier triage se déroule. En effet, les ligands sont détachés de leur récepteur grâce à un pH légèrement acide (6 à 6,5) et transportés vers la voie de dégradation tandis que les récepteurs sont transportés vers la voie de recyclage.

La manière dont le triage se réalise n'est pas claire. Gruenberg (Gruenberg, 2001) suppose que le triage des protéines et des lipides serait lié à l'organisation de la membrane. En effet, dans certains types cellulaires (CHO (« chinese hamster ovary cell ») par exemple), il remarque que les « lipid rafts » interviennent dans ce triage car les endosomes qui possèdent beaucoup de « lipid rafts » continuent le trafic intracellulaire classique tandis que les autres se feront recycler. Ceci suggère que plus la membrane de l'endosome précoce est organisée et donc plus elle possède de « lipid rafts », plus l'endosome a de chance de continuer le trafic intracellulaire classique.

Les endosomes précoces sont donc le point d'entrée des molécules internalisées et le premier site de triage.

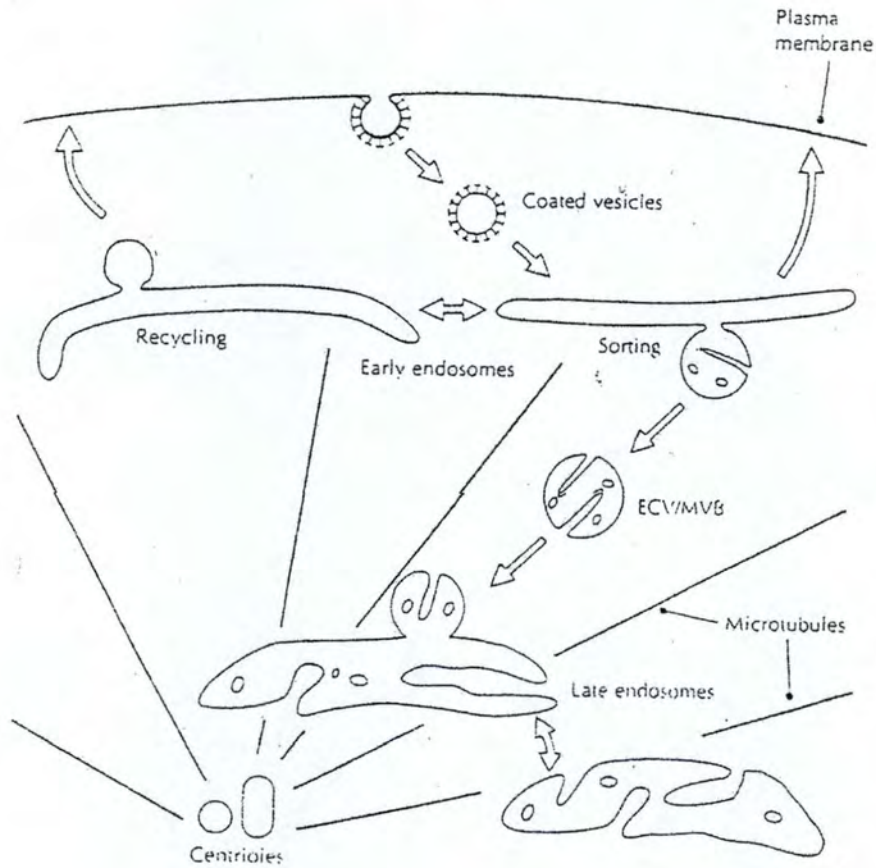
Les marqueurs des endosomes précoces les plus connus sont la petite GTPase Rab5 et l'antigène 1 (EEA1 ; « early endosomal antigen 1 »).

Après avoir quitté les endosomes précoces, les particules à recycler se retrouvent dans des structures tubulaires qui correspondent aux endosomes en cours de recyclage. Ceux-ci ne contiennent pas de ligands à dégrader et sont moins acides que les endosomes précoces. Le recyclage se déroule soit selon une voie rapide soit selon une voie plus lente mais elles aboutissent toutes les deux au niveau de la membrane plasmique même si les machineries moléculaires utilisées sont différentes.

Les particules à dégrader quant à elles, sont transportées des endosomes précoces vers les endosomes tardifs par de larges vésicules nommées ECV/MVB (« endosomal carrier vesicles/multivesicular bodies »), du moins pour les cellules de mammifères. La composition de ces vésicules n'est pas connue, on sait seulement qu'elle est différente de celle des endosomes précoces et de celle des endosomes tardifs.

Les endosomes tardifs (pH 5,5) possèdent une grande quantité de LAMP1 (« lysosomal associated membrane protein »), Rab7 et de récepteurs au mannose-6-phosphate. Ce type d'endosome fusionnera avec les lysosomes où la dégradation du matériel ingéré se déroule. Les lysosomes (pH 4) sont caractérisés par la présence de LAMP1 et d'hydrolases

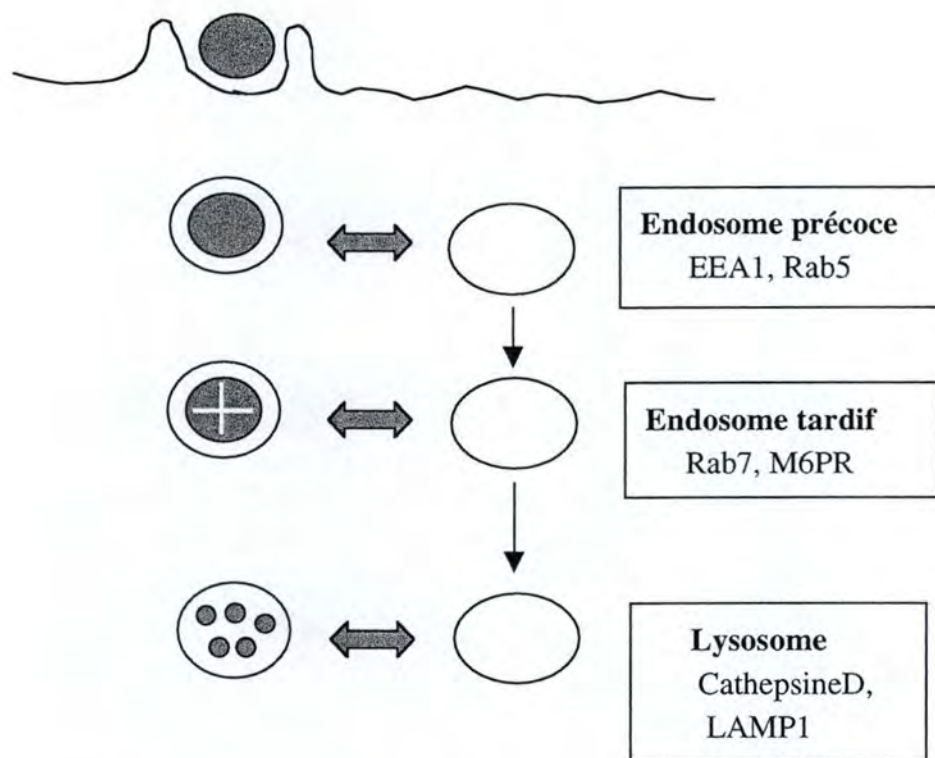
acides dont la cathepsine D (Gruenberg, 2001; Pizarro-Cerda *et al.*, 1998). On observe que le pH s'acidifie au fur et à mesure de la voie de dégradation notamment suite à la présence de plus en plus importante d'une V-ATPase (pompe à protons vacuolaire) (Nishi et Forgac, 2002).



**Figure I.8 :** Schéma résumant les principales étapes du trafic intracellulaire des endosomes (repris de Gruenberg et Maxfield, 1995).

### 1.2.2. Les phagosomes

Lors de la phagocytose, le phagosome formé est entouré de filaments d'actine qui doivent être dépolymérisés pour pouvoir entamer la première étape de maturation avec les endosomes précoces.

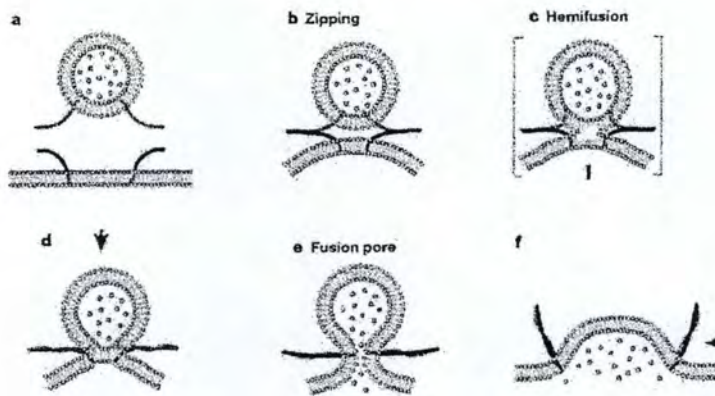


**Figure I.9 :** Schéma simplifié de la maturation classique d'un phagosome suivant le modèle du « kiss and run ». Certains marqueurs typiques des différents compartiments sont indiqués.

Dans ce mémoire, nous ne présenterons que le modèle de trafic intracellulaire du phagosome proposé par Desjardins.

Le phagosome, au cours de sa maturation, perdra et acquerra graduellement de nouvelles protéines dont des enzymes de dégradation de plus en plus actives conduisant à la formation du phagolysosome (Desjardins *et al.*, 1994). Un mécanisme appelé le « kiss and run » a été proposé par Desjardins (Desjardin, 1995). Desjardins suggère que les compartiments endosomaux préexistent à l'intérieur de la cellule et sont identifiables suite à une composition en protéines spécifique. Le phagosome interagirait avec chacun d'eux pour maturer en phagolysosome.

L'interaction entre le phagosome et les endosomes est caractérisée par une fusion incomplète des membranes des deux compartiments. Donc, les vésicules s'échangent de manière sélective leur contenu intravésiculaire (Meresse *et al.*, 1999). Dans le cas de l'hypothèse du « kiss and run » de Desjardins, les vésicules interagiront sans totalement fusionner entre elles (ceci correspond aux étapes 'a' jusque 'e' puis retourner vers 'a' dans la fig I.10).



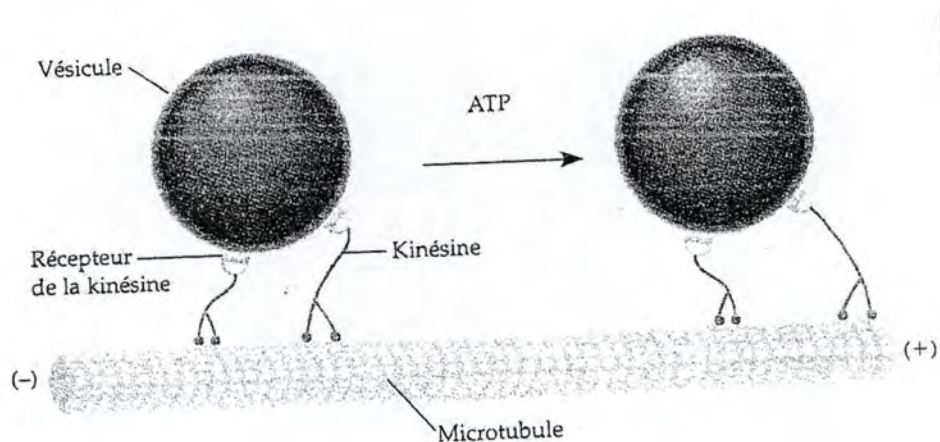
**Figure I.10 :** Modèle de la fusion des membranes médiée par les protéines SNARE. En **a**, les membranes sont proches l'une de l'autre mais les SNARE ne sont pas encore en contact. En **b**, les SNARE interagissent entre elles et rapprochent les membranes. En **c**, on observe l'éclatement des feuillettes externes suite à la tension exercée. Cette étape est dénommée l'étape d'hémifusion. En **d** et **e**, on constate la formation d'un pore de fusion et l'échange spécifique de matériel intravacuolaire. En **f**, la fusion des membranes se réalise (repris de Chen et Scheller, 2001).

### 1.2.3. Les mécanismes moléculaires

Le transport de ces vésicules peut se diviser en quatre étapes :

- formation de la vésicule
- mouvement de la vésicule vers son compartiment cible à l'aide du cytosquelette
- ancrage de la vésicule au récepteur membranaire du compartiment cible
- fusion de la bicouche lipidique

Les vésicules se déplacent le long des microtubules du cytosquelette grâce à l'intervention de la dynéine et de la dynactine pour les mouvements « négatifs » (c'est-à-dire vers l'extrémité du microtubule le plus proche du centre organisateur des microtubules), par la kinésine et son récepteur membranaire, la kinectine, pour les mouvements « positifs » (c'est-à-dire vers l'extrémité du microtubule le plus proche de la membrane plasmique) (fig I.11).

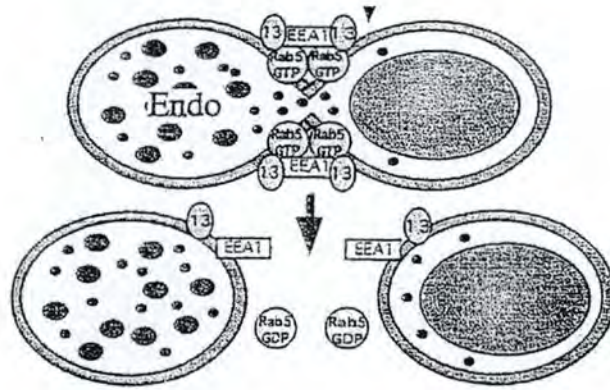


**Figure I.11 :** Représentation du mouvement des vésicules le long du cytosquelette à l'aide des molécules motrices (repris du Campbell, 1995).

Lors de l'étape d'ancrage (« docking ») de la vésicule, les protéines Rab sont importantes. Les protéines Rab constituent la plus large famille des petites GTPases monomériques (de 20 à 40 kDa). En fait, les protéines Rab et leurs effecteurs sont distribués sur des compartiments intracellulaires distincts et donnent une spécificité complémentaire aux complexes SNARE (voir ci-après) pendant l'ancrage et la fusion des membranes des vésicules impliquées. Mais, on retrouve plusieurs protéines Rab différentes sur la même vésicule. Ceci ne pose pas problème puisque plusieurs études ont démontré que les Rab sont compartimentalisées au niveau des vésicules. Les petites GTPases Rab jouent plusieurs rôles : dans le mouvement des vésicules, dans la reconnaissance spécifique et l'attachement des vésicules, dans la fusion membranaire et dans le bourgeonnement des vésicules.

La spécificité des fonctions des Rab dépend de leur localisation sur le compartiment et des interactions avec leurs effecteurs.

Plusieurs études montrent que l'ancrage des membranes est un mécanisme conservé dépendant plus des effecteurs Rab que des complexes SNARE. Par exemple, dans la voie d'endocytose précoce, Rab5 régule le transport de la vésicule entourée de clathrine de la membrane plasmique vers l'endosome précoce. EEA1 est l'effecteur de Rab5 et il médiera l'ancrage de l'endosome précoce (fig I.12).



**Figure I.12 :** Modèle du « kiss and run » de la fusion entre les endosomes précoces et les phagosomes. Rab5, EEA1, syntaxine13 sont respectivement une Rab GTPase spécifique des endosomes précoces, un effecteur de Rab5-GTP et une t-SNARE (repris de Duclos, 2000).

En fait, chaque étape du transport nécessite l'intervention d'une protéine Rab activée c'est-à-dire liant le GTP qui se liera à un facteur soluble agissant comme un effecteur pour transmettre le signal donné. Ces effecteurs sont des molécules hautement spécialisées et ne se regroupent donc pas en famille comme les protéines SNARE ou Rab.

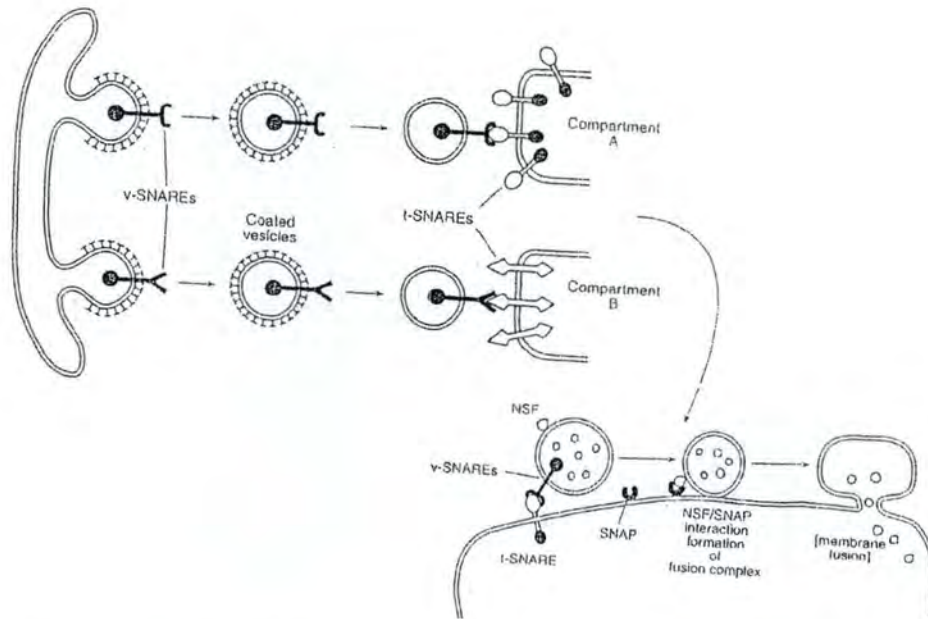
De plus, des liaisons entre des effecteurs des protéines Rab et des complexes SNARE ont été démontrées. Ces interactions pourraient enlever des inhibiteurs des protéines SNARE et ainsi permettre la fusion membranaire (Zerial et McBride, 2001).

La fusion membranaire est médiée par les protéines SNARE (« soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) attachment protein receptor »). Les protéines SNARE sont divisées en deux groupes : d'une part, les v-SNARE (par exemple les synaptobrevines) portées par la vésicule qui fusionnera et, d'autre part, les t-SNARE (par exemple la syntaxine) portées par la vésicule cible. Les protéines SNARE interviendraient donc dans la spécificité de la fusion membranaire mais les mécanismes employés sont encore controversés. En effet, la même protéine SNARE peut se retrouver à différents endroits dans le trafic intracellulaire et une protéine SNARE peut en substituer une autre. Donc, les protéines SNARE ne suffisent pas à expliquer la spécificité de l'ancrage et de la fusion des vésicules (Chen et Scheller, 2001).

La fusion membranaire se fait grâce à la formation d'un complexe entre une v-SNARE et une t-SNARE. Mais, la conformation des protéines SNARE est tellement stable qu'il faut l'intervention d'un processus énergétique (et donc d'ATP) pour pouvoir les dissocier en composants monomériques. En effet, cette dissociation est réalisée suite à l'activité de l'ATPase NSF qui s'attache aux membranes par l'intermédiaire d'un adaptateur soluble nommé  $\alpha$ -SNAP (« soluble NSF attachment protein ») qui interagit avec le complexe SNARE.

Actuellement, on pense que les protéines Rab sont des médiateurs de l'attachement des vésicules avec des membranes cibles et que les protéines SNARE sont recrutées au site de fusion via une interaction avec les complexes Rab/effecteurs respectifs. De plus, ce serait

l'assemblage du complexe SNARE et non la dissociation qui entraînerait la fusion membranaire. Le rôle du complexe NSF/ $\alpha$ -SNAP est de dissocier le complexe SNARE et de réactiver les protéines SNARE pour qu'elles puissent intervenir dans un nouveau cycle de fusion au lieu de diriger directement la fusion des lipides (Chen et Scheller, 2001).



**Figure I.13 :** Schéma simplifié de l'adressage et de la fusion d'une vésicule avec un compartiment cible, médié par les v-SNARE, les t-SNARE, SNAP et NSF (repris de Henderson, 1999).

Le modèle actuel est de dire que dès que la distance entre les membranes devient suffisamment faible, une hémifusion se déroule. Cette dernière consiste en la fusion de la moitié des feuillettes lipidiques. Ensuite, on observe la formation d'un pore de fusion et une fusion des membranes (fig I.10) (Chen et Scheller, 2001).

Le calcium ( $Ca^{2+}$ ) intervient aussi dans la fusion des membranes puisque ce dernier lie une synaptotagmine qui, en absence de  $Ca^{2+}$ , entoure le complexe SNARE et empêche la fusion des membranes (Mayer, 2001).

Les « lipid rafts » joueraient aussi un rôle dans les mouvements du phagosome, dans son acidification et dans l'activation de certaines voies de transduction du signal nécessaires à sa maturation en phagolysosome. En effet, Dermine (Dermine *et al.*, 2001) constate une augmentation graduelle des « lipid rafts » au fur et à mesure de la maturation du phagosome. De plus, les « lipid rafts » sont enrichis en actine, en sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  des protéines G ainsi qu'en sous-unités de la V-ATPase (pompe à protons vacuolaire).

#### 1.2.4. Les stratégies utilisées par les agents pathogènes pour dévier le trafic intracellulaire classique

Les microorganismes pathogènes ont développé différents moyens pour éviter de se faire digérer par les cellules. Certains vont sortir du phagosome après avoir été internalisés de manière à pouvoir se répliquer dans le cytoplasme de la cellule hôte. D'autres vont modifier le trafic intracellulaire de leur phagosome pour éviter la fusion avec les lysosomes en modifiant le trafic intracellulaire de leur phagosome pour atteindre une niche de réplication vacuolaire (fig I.14) (Duclos, 2000; Hackstadt, 2000; Meresse et al., 1999).

Une des méthodes de fuite consiste à sortir du phagolysosome vers le cytoplasme de la cellule hôte. C'est le cas pour *Listeria monocytogenes* qui est responsable de la listériose (maladie provoquant des gastro-entérites et des méningites). Dès que *L. monocytogenes* se retrouve dans le phagosome, elle sécrète une listériolysine O et, dans une moindre mesure, une phosphatidylinositol phospholipase C bactérienne. Ces facteurs vont permettre la formation d'un pore au niveau de la membrane du phagosome et ainsi provoquer la libération de *L. monocytogenes* dans le cytoplasme de la cellule hôte. Une fois que cette bactérie se retrouve dans le cytoplasme, elle va pouvoir se diviser.

La bactérie induira aussi à un de ses pôles la formation d'un complexe protéique membranaire qui va activement polymériser et dépolymériser l'actine. Ceci va permettre le déplacement de cette bactérie dans le cytoplasme de la cellule hôte mais aussi l'invasion des cellules voisines. L'avantage de cette méthode est qu'elle permet d'éviter les défenses de l'hôte comme les anticorps ou le système du complément qui agissent de manière extracellulaire (Meresse et al., 1999; P.Cossart, 2001; Pieters, 2001).

Une autre technique consiste à éviter les interactions avec la voie d'endocytose classique pour se répliquer dans une vacuole se situant sur le parcours des voies biosynthétiques où les enzymes intervenant dans les processus de dégradation sont moins nombreuses. Cette technique est utilisée par *Legionella pneumophila*, *Chlamydia* ou encore *Brucella*.

Nous détaillerons uniquement la technique utilisée par *L. pneumophila* qui provoque la maladie du Légionnaire (une pneumonie potentiellement létale) et nous reviendrons sur *Brucella* plus tard.

Dès l'entrée de *L. pneumophila* dans sa cellule hôte, sa vacuole d'internalisation est entourée de mitochondries et de réticulum endoplasmique. La vacuole répliquative de *L. pneumophila* est entourée de membranes riches en ribosomes dérivant du réticulum endoplasmique rugueux mais elle ne possède pas de récepteur à la transferrine et n'acquiert pas les protéines spécifiques des endosomes tardifs et des lysosomes. *L. pneumophila* s'établirait dans le réticulum endoplasmique rugueux (Tilney *et al.*, 2001).

Différents facteurs interviennent dans la formation de cette vacuole répliquative particulière. La famille de gènes *icm/dot* (« intracellular multiplication / organelle trafficking ») est indispensable et suffisante pour l'établissement de la niche de réplication. Ce

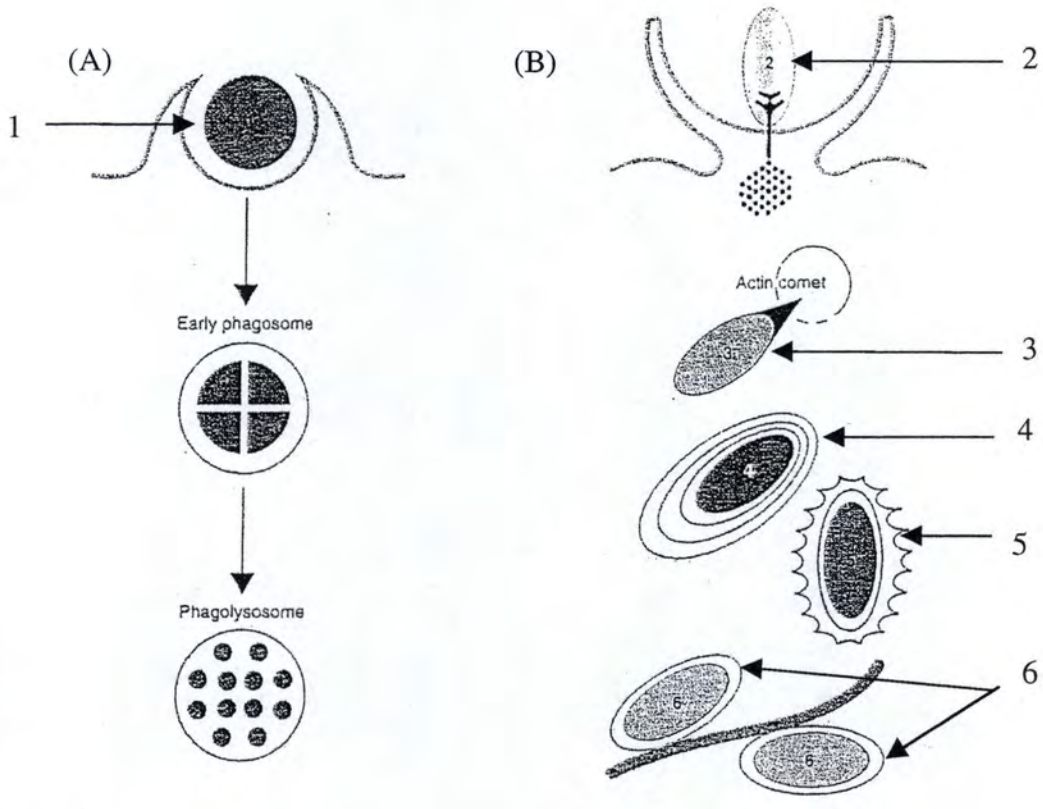
système permet la construction d'un système de sécrétion de type IV qui facilite l'exportation de facteurs de virulence dans le cytoplasme de la cellule hôte. Les protéines sécrétées par ce système sont, entre autres, DotA qui est nécessaire pour l'inhibition de la fusion entre la vacuole de réplication en question et le lysosome mais aussi DotH, DotI et DotO qui sont des protéines essentielles à la fuite hors de la voie d'endocytose et à la croissance de *L. pneumophila* mais dont les mécanismes d'action sont peu connus (Coers *et al.*, 1999; Hackstadt, 2000; Meresse *et al.*, 1999; P.Cossart, 2001; Tilney *et al.*, 2001).

Une autre stratégie consiste à arrêter la maturation de la vacuole contenant le microorganisme pathogène. Cette méthode est, entre autres, utilisée par *Mycobacterium tuberculosis* responsable de la tuberculose et par *Salmonella typhimurium* responsable de la salmonellose. Nous allons uniquement décrire le mécanisme utilisé par *M. tuberculosis*.

Les vacuoles contenant cette bactérie ont les caractéristiques des endosomes précoces et ne fusionnent pourtant pas avec les lysosomes. En effet, la vacuole de *M. tuberculosis* retient la petite GTPase Rab5 caractéristique de l'endosome précoce mais exclut la petite GTPase Rab7 caractéristique de l'endosome tardif, indiquant un arrêt rapide de la maturation de la vacuole contenant la bactérie. Une fois la maturation de sa vacuole arrêtée, *M. tuberculosis* peut survivre très longtemps soit à l'état actif soit dans un état de dormance en évitant la fusion avec le lysosome.

*M. tuberculosis* recrute et retient une protéine de l'hôte au niveau de la face cytoplasmique de son phagosome. Cette protéine est dénommée TACO ou coronine I et est un constituant du manteau phagosomal qui est normalement enlevé avant la fusion ou la maturation en lysosome. Actuellement, on ne connaît pas encore bien les gènes bactériens impliqués dans la rétention de TACO sur le phagosome mais on sait que TACO n'est pas une protéine membranaire complète. En effet, elle est liée à la membrane du phagosome via le cholestérol (Hackstadt, 2000; Meresse *et al.*, 1999; Pieters, 2001; Pieters et Gatfield, 2002; Xu *et al.*, 1994).

D'autres bactéries pathogènes comme *Coxiella burnetii* responsable de la fièvre Q prolifèrent dans l'environnement hostile du phagolysosome. De plus, le pH acide du phagolysosome semble indispensable au métabolisme de *C. burnetii* (Hackstadt, 2000). Mais les mécanismes lui permettant d'atteindre sa niche de réplication ne sont pas encore connus (Howe et Mallavia, 2000).



**Figure I.14 :** (A) Maturation simplifiée d'un phagosome. (B) Représentation des différents mécanismes utilisés par les microorganismes pathogènes. En 1, on observe l'internalisation d'une particule qui va se retrouver dans un phagosome. En 2, on représente le mécanisme « trigger » utilisé par *Shigella* par exemple. En 3, on représente la fuite de *Listeria* par exemple, dans le cytoplasme ainsi que l'apparition de la queue d'actine formée par la bactérie. En 4, on représente *Legionella* dans un autophagosome multimembranaire. En 5, on représente la vacuole de *Mycobacterium* entourée de la protéine TACO. En 6, on représente la vacuole de réplication de *Salmonella* qui acquiert la majorité des protéines membranaires lysosomales en excluant les hydrolases lysosomales (repris de Meresse et al., 1999).

### 1.3. *Brucella*, bactérie pathogène intracellulaire

(Boschioli et al., 2001; Delrue, 2002; Liautard et al., 1996; Smith, 1990; Tibor, 1999; Ugalde, 1999; Godefroid J. , sous presse)

#### 1.3.1. Les bactéries du genre *Brucella*

Les bactéries du genre *Brucella* sont des petits coccobacilles à Gram négatif ayant une taille de 0,6 à 1,5 µm sur 0,5 à 0,8 µm (c'est de l'ordre de 3 fois plus petit qu'*Escherichia coli*).

Il s'agit de bactéries pathogènes intracellulaires facultatives, décrites comme non mobiles. Elles possèdent cependant des gènes flagellaires dont la fonction est en cours d'investigation (Halling, 1998; D. Fretin, thèse en cours au laboratoire). D'autre part, elles sont capables de survivre plusieurs mois dans le sol, le purin, le lait ... alors qu'elles sont asporulées.

D'un point de vue taxonomique, on constate par comparaison de l'ARN ribosomique 16S, que *Brucella* fait partie de la classe des alpha-2-protéobactériacées tout comme *Rhizobium* ou *Agrobacterium*. Ces genres sont d'ailleurs regroupés avec *Brucella* au sein de la famille des *Rhizobiaceae*.

Le genre *Brucella* est divisé en plusieurs espèces sur base de l'hôte préférentiel. Les trois espèces principales sont *Brucella melitensis* (petits ruminants), *Brucella abortus* (bovins) et *Brucella suis* (porcins).

On sait que le génome de *B. melitensis* s'organise en deux chromosomes d'une taille de 1,15 Mb et 2,1 Mb. Aucun plasmide naturel n'a été mis en évidence au sein du genre. Actuellement, les génomes de *B. melitensis* et de *B. suis* sont entièrement séquencés et le séquençage de *B. abortus* est en cours (DeVecchio et al., 2002; Sanchez et al., 2001; <http://www.tigr.org/tigr-scripts/ufmg/ReleaseDate.pl>). Par comparaison de séquences, le lien taxonomique avec les *Rhizobiaceae* a été confirmé. Le séquençage complet du génome apporte beaucoup d'avantages. En effet, son analyse confirme l'absence de facteurs de virulence classiques (toxines, fimbriae, ...), mais met aussi en évidence des gènes susceptibles d'intervenir dans la virulence (gènes encodant des adhésines et des invasines) (Moreno et Moriyon, 2002).

#### 1.3.2. Brucelloses humaines et animales

Les espèces les plus dangereuses pour l'homme sont *B. melitensis* et *B. suis*. Dans nos pays, la brucellose touche particulièrement les agriculteurs, le personnel d'abattoir, les vétérinaires et les personnes manipulant les différentes souches de *Brucella* en laboratoire.

La brucellose humaine, encore appelée fièvre de Malte, se caractérise par des symptômes très variés et peu spécifiques. Cette pathologie se déroule en deux étapes. La première étape peut être asymptomatique. Dans un cas sur deux, elle se marque par des

fièvres ondulantes, des nausées, des vertiges, de la dépression... La deuxième étape est nettement plus dangereuse car on entre alors dans la phase chronique de la maladie. Cette dernière peut se marquer par des endocardites, des arthrites, ... et dans les cas les plus graves, il peut y avoir une atteinte neurologique.

Le traitement de la brucellose humaine recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé consiste en une double antibiothérapie (doxycycline et rifampicine ou streptomycine), le plus rapidement possible. Il faut savoir que la maladie se déclare après 5 à 30 jours d'incubation et que le traitement est un échec dans au moins 5 % des cas.

La brucellose animale est une des cinq zoonoses bactériennes les plus répandues dans le monde et elle provoque des pertes économiques considérables. Elle constitue un problème endémique dans certaines régions du monde comme le bassin méditerranéen, le Golfe Persique et l'Amérique Latine.

Concernant les brucelloses animales, les symptômes les plus importants sont l'avortement ou les naissances prématurées dus à une colonisation du placenta chez les femelles gestantes primipares et des problèmes de stérilité chez les mâles. Lors d'une infection chronique, il peut aussi y avoir des lésions d'ordre articulaire.

Actuellement, en Belgique et en Europe du Nord, la brucellose est éradiquée d'un point de vue légal. Cependant, la prophylaxie d'ordre sanitaire reste de rigueur : dépistage et abattage des animaux infectés ou exposés.

### 1.3.3. Pathogénie de *Brucella*

Les modes de transmission de la brucellose sont nombreux. Les tissus avortés, le lait infecté ou le contact direct avec un animal infecté sont les principales sources de contaminations pour les animaux et les humains.

Les *Brucella* entrent dans leur hôte via les muqueuses orales, respiratoires, conjonctivales ou génitales. Cependant les mécanismes par lesquels *Brucella* traverse les barrières épithéliales de l'hôte restent peu étudiés et peu compris ; on peut supposer que cette étape implique l'entrée et la survie dans les cellules épithéliales ainsi que leur traversée.

Une fois à l'intérieur de son hôte, *Brucella* provoque une réponse inflammatoire aiguë dans la sous-muqueuse avec infiltration de neutrophiles et de monocytes. Les *Brucella* (soit sous forme libre soit dans des phagocytes) se dirigeront alors vers les ganglions lymphatiques où les bactéries libres sont phagocytées par des macrophages. *Brucella* se retrouve donc à l'abri des attaques des anticorps et du système du complément. Les bactéries peuvent alors se multiplier dans cet environnement qu'elles parviennent à dompter. Certaines des cellules infectées mourront au niveau des ganglions lymphatiques en libérant des *Brucella* vivantes.

Si l'inflammation ne parvient pas à provoquer la mort de toutes les bactéries alors ces dernières se retrouveront dans le sang où elles se déplaceront probablement sous une forme intracellulaire dans des monocytes et des neutrophiles. Les *Brucella* ont un tropisme pour certains organes comme les glandes mammaires, les tissus lymphoïdes, les organes

reproducteurs mais on les retrouve aussi au niveau des os, du cerveau, des articulations et des yeux. Concernant les femelles gestantes primipares (génisse et chèvre), la majorité des *Brucella* sont localisées dans les cellules trophoblastiques du placenta qui ne sont pas des cellules phagocytaires.

*Brucella* est donc une bactérie intracellulaire facultative des cellules phagocytaires professionnelles et des cellules phagocytaires non professionnelles.

#### 1.3.4. *Brucella*, une bactérie pathogène intracellulaire

##### 1.3.4.1. Internalisation

L'adhésion et l'internalisation de *Brucella* ne sont pas des phénomènes clairement expliqués. On ne comprend pas encore les processus et on ne connaît pas non plus les récepteurs et les ligands intervenant dans cette internalisation.

Nous savons que *Brucella* n'entre pas fréquemment dans les cellules qu'elles soient phagocytaires professionnelles ou non. Rittig (Rittig *et al.*, 2001) compare l'entrée de *Brucella* dans les deux types cellulaires et observe qu'il y a bien plus de bactéries phagocytées par les cellules phagocytaires professionnelles que par les cellules phagocytaires non professionnelles (64 à 83% des monocytes infectés contre 3 à 5% de cellules HeLa). De plus, les bactéries adhérentes restent assez nombreuses même plusieurs heures après l'inoculation des cellules HeLa, ce qui n'est pas le cas pour les monocytes où les bactéries sont directement internalisées.

Par microscopie électronique, Rittig montre aussi que les *Brucella* sont internalisées par un mécanisme classique « zipper-like » dans les cellules phagocytaires professionnelles et non professionnelles. L'internalisation commence par l'attachement de *Brucella* soit à des protrusions de la surface cellulaire soit sur la membrane plasmique plane. Les pseudopodes sont en contact soit de façon continue avec la bactérie phagocytée soit seulement par des points discontinus. D'après Rittig, les *Brucella* sont internalisées par les monocytes humains à la fois en absence et en présence de complément et d'anticorps et les caractéristiques ultrastructurales de ces entrées avec ou sans opsonines sont similaires. L'opsonisation par des anticorps accroît l'internalisation mais pas le taux de survie intracellulaire.

Pizzaro-Cerda (Pizarro-Cerda *et al.*, 2000) a aussi suggéré que les *Brucella* seraient internalisées grâce à des extensions locales des membranes qui entourent les bactéries et qui permettent une phagocytose de type « zipper ».

Guzman-Verri et al (Guzman-Verri *et al.*, 2001) ont initié la caractérisation des événements moléculaires qui conduisent à l'internalisation de *Brucella* dans les phagocytes non professionnels HeLa. Ils ne visualisent que des réarrangements membranaires légers avec

un recrutement modeste du cytosquelette d'actine au site d'entrée de *Brucella*. Par l'utilisation d'inhibiteurs, ils montrent que l'internalisation fait intervenir le cytosquelette d'actine et dans une moindre mesure les microtubules. Des petites GTPases de la sous famille Rho sont nécessaires à l'internalisation de *B. abortus*. La GTPase Cdc42 est activée après le contact cellule-*B. abortus* virulente mais pas par le contact avec le mutant non invasif *bvrR/bvrS* (voir ci-dessous). Donc, l'activation précoce de Cdc42 est importante pour l'internalisation réussie de *Brucella*. L'attachement de *Brucella* induirait une voie de transduction du signal où des GTPases seraient activées en série.

Suite au séquençage du génome de *B. melitensis*, des gènes encodant des homologues d'adhésines et d'invasines ont été découverts. Le rôle éventuel de ces protéines dans l'adhésion et l'invasion de *Brucella* reste à étudier (Moreno and Moriyon, 2002).

Sola-Landa (Sola-Landa *et al.*, 1998) a démontré que les clones de *B. abortus* mutés dans le système de régulation à deux composants BvrR/BvrS entrent moins bien dans les cellules suggérant un rôle de ce système dans l'invasion des cellules. Les propriétés de la membrane externe sont altérées chez ces mutants indiquant que ce système régulerait des constituants de la membrane externe qui seraient impliqués dans l'invasion.

Quelques récepteurs ont cependant été identifiés sur certains types cellulaires et pas chez d'autres. Par exemple, les intégrines  $\alpha 5 \beta 1$  (Brees, 1996) interviendraient dans l'internalisation des *Brucella* dans les trophoblastes bovins mais leur implication dans l'entrée de *Brucella* dans d'autres types cellulaires n'a pas été investiguée.

#### 1.3.4.2. Trafic intracellulaire de *Brucella*

Dans le cadre de ce mémoire, nous n'aborderons pas le point de vue immunitaire (inhibition de l'explosion respiratoire, de la production de  $\text{TNF}\alpha$ ), nous nous focaliserons uniquement sur le trafic intracellulaire de *Brucella*.

Une propriété de *Brucella* mise en évidence depuis longtemps et confirmée par toutes les études récentes est sa capacité à inhiber la fusion phagolysosomale. Cependant, le trafic intracellulaire de *Brucella* semble différer suivant qu'elle soit internalisée par des cellules phagocytaires professionnelles (monocytes, macrophages) ou des cellules phagocytaires non professionnelles (cellules HeLa, cellules Véro).

Nous commencerons par décrire le trafic intracellulaire de *Brucella* dans les cellules HeLa (fig I.15).

Detilleux (Detilleux *et al.*, 1991; Detilleux *et al.*, 1990) montre par l'utilisation de différents inhibiteurs que *B. abortus* serait internalisée dans les cellules Véro par une phagocytose médiée par des récepteurs. Cette bactérie serait ensuite transférée de son phagosome vers le réticulum endoplasmique rugueux (RER) et ceci nécessiterait une acidification endosomale.

Pizarro-Cerda (Pizarro-Cerda *et al.*, 1998; Pizarro-Cerda *et al.*, 1998) procède par double marquage immunofluorescent pour montrer que la cinétique de l'infection se présente comme suit ; d'abord, il y a une période de latence d'environ 10 h pendant laquelle les *Brucella* se trouvent dans les cellules mais ne s'y répliquent pas efficacement. Ensuite, on observe une phase de croissance exponentielle marquée par une réplication bactérienne importante.

Détaillons cette cinétique (fig I.15) et signalons que Pizarro-Cerda utilise le modèle du « kiss and run » pour interpréter ses résultats. Cinq à 15 minutes après l'inoculation des bactéries sur les cellules, les *Brucella* se retrouvent dans un phagosome précoce caractérisé par la présence de protéines des endosomes précoces dont EEA1 (« early-endosomal protein 1 »). Ceci concerne 10 à 15% des phagosomes contenant *Brucella*. Le phagosome contenant *Brucella* est Rab7 négatif et n'a pas de récepteurs au mannose-6-phosphate, il ne colocalise donc pas avec des marqueurs des endosomes tardifs.

Ensuite, les phagosomes contenant *Brucella* accumuleront les marqueurs lysosomaux LAMP1 et LAMP2. Deux heures après l'inoculation, 95% des phagosomes contenant *Brucella* possèdent le marqueur LAMP1. Ce marqueur proviendrait de la fusion avec des vésicules originaires de l'appareil de Golgi (Pizarro-Cerda *et al.*, 1998).

Par contre, moins de 10% de ces phagosomes acquièrent le marqueur lysosomal cathepsine D qui est une hydrolase acide du lysosome. Donc, le phagosome contenant *Brucella* ne fusionne pas avec les lysosomes.

À ce stade, *Brucella* se localise dans un compartiment qui a les caractéristiques d'un autophagosome.

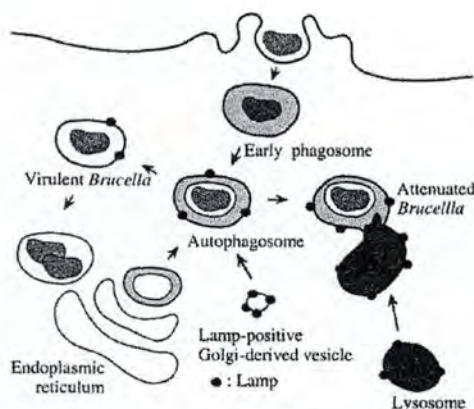
Un autophagosome normal est une vésicule probablement originaire du réticulum endoplasmique (RE) qui porte le marqueur membranaire sec61 $\beta$  et qui séquestre du matériel cytoplasmique comme des organelles en vue d'un recyclage. Lors de sa maturation, l'autophagosome acquiert des protéines membranaires d'origine lysosomale dont LAMP1. Puis, on assiste à l'acidification de ce compartiment par l'acquisition d'une proton-ATPase. La maturation se termine par l'obtention d'enzymes lysosomales dont des hydrolases acides pour pouvoir dégrader le matériel intravacuolaire.

On observe que le phagosome de *Brucella* possède les marqueurs LAMP1 et sec61 $\beta$  une heure après l'inoculation mais il ne possède pas le marqueur de la lumière du RE (BiP) ou la ribophorine, un marqueur de la membrane du RE. De plus, le phagosome contenant *Brucella* colocalise avec le monodansylcadavérine, un marqueur fluorescent spécifique des autophagosomes. En outre, les caractéristiques ultrastructurales du phagosome contenant *Brucella* sont semblables à celles des autophagosomes c'est-à-dire que ce compartiment est multilamellaire. Tout ceci suggère que *Brucella* se retrouverait dans un autophagosome.

Huit heures après l'inoculation, LAMP1 ne colocalise plus avec le phagosome de *Brucella* et la réplication bactérienne est observée. La niche de réplication de *Brucella* serait un compartiment périnucléaire lié au RE. Ceci est suggéré par la présence des marqueurs du RE sec61 $\beta$ , calnexine et PDI. De plus, après un traitement avec la brefeldine A, la vacuole de réplication de *Brucella* possède des marqueurs de l'appareil de Golgi. Or, la brefeldine A est

un métabolite provoquant une redistribution rapide des constituants du Golgi vers le RE. Donc, la vacuole de réplication de *Brucella* possède des caractéristiques du RE.

En résumé, on constate que *Brucella* est capable d'échapper à la voie d'endocytose classique après infection de cellules HeLa. Les phagosomes contenant *Brucella* acquièrent les caractéristiques des endosomes précoces. Puis, ils exploitent la machinerie autophagique de la cellule hôte et terminent leur course dans une vésicule RE-like qui est définie comme étant le compartiment de réplication de *Brucella* (Detilleux et al., 1991; Pizarro-Cerda et al., 1998; Pizarro-Cerda et al., 1998).



**Figure I.15 :** Modèle représentant le trafic intracellulaire de *Brucella abortus* dans des cellules HeLa (repris de Pizarro-Cerda et al., 1998).

Le trafic intracellulaire dans les phagocytes est moins bien connu que celui dans les cellules HeLa (Arenas *et al.*, 2000; Rittig et al., 2001).

L'équipe de Köhler (Kohler *et al.*, 2001) démontre que la réplication intracellulaire de *Brucella* nécessite sa localisation dans un phagosome. En effet, l'expression artificielle de la listériolysine dans *Brucella* entraîne la disruption du phagosome contenant *Brucella* qui est alors incapable de se répliquer.

Lors de l'infection de monocytes, *Brucella* se retrouve dans deux types de phagosomes ; 1- le phagosome étroit (PE), qui entoure directement la bactérie sans laisser d'espace entre celle-ci et la membrane du phagosome et 2- le phagosome spacieux (PS), qui laisse de l'espace entre la bactérie et la membrane phagosomale (Rittig et al., 2001).

Les phagosomes PE fusionnent avec les endosomes précoces mais pas avec les endosomes tardifs et les *Brucella* y restent intactes : ils représentent les compartiments permettant la survie de *Brucella*. Par contre, les PS fusionnent avec les deux types d'endosomes et aussi, après de longues périodes d'incubation (plus de 18 h) avec des vésicules qui correspondraient à des autophagosomes et les *Brucella* y sont dégradées : ils représentent les compartiments conduisant à la mort des *Brucella* (Rittig et al., 2001). Une hétérogénéité morphologique des phagosomes contenant *Brucella* a aussi été observée dans une lignée de macrophages murins (J774) par une autre équipe (Arenas et al., 2000).

Rittig observe aussi qu'au fur et à mesure du temps, les proportions des types de phagosomes changent :

- après 15 minutes, on a 83% de PE et 11% de PS (6% d'autres sortes)
- après 8 heures, on a 47% de PE et 49% de PS (4% d'autres sortes)

Cela suggère que seule une minorité des phagosomes parvient à maintenir l'arrêt de la maturation.

L'équipe de Naroeni (Naroeni *et al.*, 2001) a démontré que l'inhibition de la fusion phagolysosomale est restreinte au phagosome contenant *Brucella*. En effet, la machinerie fusionnelle de la cellule hôte n'est pas altérée par la présence de la bactérie. Ceci suggère que *Brucella* ne sécrète pas, dans le cytoplasme du macrophage, de facteur bactérien interférant avec le trafic intracellulaire normal. Il s'agirait donc d'un facteur bactérien présent dans la membrane du phagosome et qui entraînerait l'inhibition de la reconnaissance phagosome-lysosome et, par conséquent, de la fusion phagolysosomale. De plus, les résultats de Rittig (Rittig *et al.*, 2001) suggèrent également que *Brucella* influence sélectivement l'accès à son compartiment intracellulaire : l'accès de marqueurs de plus de 400Da est limité si le phagosome contient des *Brucella* vivantes.

Arenas (Arenas *et al.*, 2000) montre que dans les macrophages murins, *Brucella* n'empêche pas l'acidification du phagosome. L'équipe de Françoise Porte (Porte *et al.*, 1999) a aussi montré que lors de l'infection de macrophages murins (J774), le compartiment contenant *B. suis* vivante s'acidifie (pH de 4,0 à 4,5) endéans les 60 minutes après l'infection. La survie de *B. suis* est diminuée si le pH est augmenté pendant cette première heure d'infection par un traitement des macrophages avec la bafilomycine A (un inhibiteur de proton-ATPases vacuolaires). Ceci montrerait que l'acidification du phagosome contenant *Brucella* est essentielle à la réplication de la bactérie dans les macrophages. Cette acidification induirait l'expression de certains gènes bactériens de virulence et est, en tout cas, nécessaire à l'induction de l'opéron *virB* (voir point suivant) (Boschioli *et al.*, 2002).

Rittig (Rittig *et al.*, 2001) montre également que le pH du phagosome est acide. Il observe que *Brucella* meurt dans des phagosomes acides de type PS alors qu'elle survit dans des phagosomes acides de type PE. De plus, même si les *Brucella* ont subi un choc acide avant l'infection, elles ne survivent pas mieux. Rittig pose la question de savoir ce qui est le plus important : le pH acide ou l'apposition étroite de la membrane phagosomale ? Le pH acide seul n'est pas suffisant à l'établissement de l'infection. Par contre, l'apposition étroite de la membrane du phagosome serait cruciale pour diminuer la fusiogénicité du compartiment.

La localisation intracellulaire de *Brucella* est similaire dans les cellules épithélioïdes et dans les cellules phagocytaires, du moins au cours des huit premières heures d'infection. Mais, dans les cellules épithélioïdes, la majorité des phagosomes est de type PE. C'est le cas

aussi pour des macrophages en culture par opposition aux monocytes fraîchement isolés du sang (Rittig et al., 2001).

De plus d'après Rittig, après 8 heures d'infection de cellules épithélioïdes, aucune indication ne permet l'association du phagosome de *Brucella* avec le RER ou avec des autophagosomes. Arenas (Arenas et al., 2000) montre aussi qu'en macrophages murins, seul un faible pourcentage de *B. abortus* colocaliserait de façon transitoire avec des autophagosomes et la plupart survivent dans des structures qui ne sont pas des autophagosomes ni du RE. Ces résultats convergent vers l'hypothèse que le compartiment de réplication de *Brucella* serait différent dans les cellules phagocytaires professionnelles et non professionnelles.

### 1.3.5. Les facteurs de virulence

Contrairement à d'autres bactéries pathogènes, *Brucella* ne possède pas les facteurs de virulence classiques comme des exotoxines, un lipopolysaccharide toxique, une capsule, des plasmides de virulence ou des phages lysogéniques. De plus, *Brucella* ne génère pas de formes résistantes, ne procède pas à de la variation antigénique et ne possède pas de fimbriae. En fait, la virulence de *Brucella* se retrouve dans sa capacité d'envahir, de survivre et de se répliquer dans des compartiments vacuolaires de cellules phagocytaires professionnelles ou non.

Les facteurs de virulence que nous décrirons ci-dessous (fig I.17) interviennent à différentes étapes du trafic intracellulaire décrit au point précédent. Ces facteurs bactériens permettent à *Brucella* d'éviter la fusion phagolysosomale et de détourner le trafic à son avantage.

La chaîne O du lipopolysaccharide joue un rôle dans la virulence de *Brucella* et est un des premiers facteurs de virulence à avoir été identifié. Le rôle de cette chaîne O a été mis en évidence grâce à des études de mutants rugueux génétiquement caractérisés. On observe que les souches lisses (qui possèdent la chaîne O) sont plus virulentes que les souches rugueuses (qui n'ont pas la chaîne O). Cependant, les fonctions exactes de cette chaîne O dans la virulence de *Brucella* ne sont pas encore clairement établies, on sait seulement que cette chaîne O serait impliquée dans la résistance aux défenses de l'hôte (Allen *et al.*, 1998; Godfroid *et al.*, 1998; Smith, 1990; Tibor, 1999).

Les mutants du système de régulation à deux composants, BvrR/BvrS, sont non seulement affectés au stade de l'invasion mais ils sont également incapables de se répliquer dans les macrophages et dans les cellules HeLa. Ces mutants ne savent pas inhiber la fusion phagolysosomale et sont atténués. Le dysfonctionnement dans le système de régulation BvrR/BvrS altère les propriétés de la membrane externe (Sola-Landa et al., 1998).

### 1.3.5.1. Le régulateur *VjbR* et le système *VirB*

#### a) Identification des mutants incapables de se répliquer dans les cellules HeLa

Pour identifier des facteurs bactériens impliqués dans le trafic intracellulaire classique de *B. melitensis* 16M, une banque de mutants transcriptionnels a été criblée. Les mutants ne se répliquant pas après 48 h d'infection dans des cellules HeLa ont été identifiés au sein de cette banque. Treize mutants ont ainsi été retenus : douze mutés au niveau de l'opéron *virB* et un muté au niveau du gène *vjbR* (Delrue *et al.*, 2001).

#### b) Trafic intracellulaire

Le trafic intracellulaire des mutants *virB2*, 4 et 9 et du mutant *vjbR* serait semblable. En effet, les données obtenues sont les mêmes pour le mutant *vjbR* et les mutants *virB* (Delrue, 2002).

Les mutants ne seraient pas affectés au stade de l'internalisation. Leur internalisation serait aussi efficace que celle de la souche sauvage *B. melitensis* 16M. De plus, le mutant *virB10* de *B. abortus* de Comerci ne montre pas de différence d'adhérence ni d'internalisation par rapport à une souche sauvage (Comerci *et al.*, 2001).

Le trafic intracellulaire des mutants a été étudié dans les cellules HeLa par une technique de double marquage indirect en immunofluorescence des bactéries et des marqueurs d'organelles intracellulaires.

Les mutants sont donc internalisés et se retrouvent dans un phagosome qui a les caractéristiques des endosomes précoces. En effet, le phagosome contenant les mutants est EEA1 positif.

Après quatre heures d'infection, les phagosomes contenant les mutants acquièrent le marqueur LAMP1 mais restent cathepsine D négatif. Les mutants échappent donc à la voie endocytaire classique comme la souche parentale sauvage. Cependant, contrairement à la souche sauvage, ils n'excluent pas LAMP1. De plus, les vacuoles contenant les mutants sont aussi positives pour  $\text{sec61}\beta$ , un marqueur du réticulum endoplasmique. Ceci suggère que les mutants seraient localisés dans un compartiment similaire aux vésicules d'autophagie issues du RE, comme c'est le cas pour la souche sauvage.

Un mutant polaire *virB10* (protéines VirB10 à 13 absentes) acquiert rapidement la cathepsine D et interagit donc avec les lysosomes. Donc, l'absence de VirB10 à 13 affecte la capacité à éviter la voie d'endocytose classique. Par contre, un mutant *virB10* non polaire (seule la protéine VirB10 absente) échappe à la voie d'endocytose classique mais ne sait pas atteindre sa niche de répllication « RE-like » (phénotype semblable aux mutants *virB2*, 4 et 9 de R. -M. Delrue) (Comerci *et al.*, 2001; Delrue, 2002).

Des résultats complémentaires ont été obtenus pour un de ces mutants, le mutant *vjbR*. Le monodansylcadavérine se retrouve au niveau du compartiment contenant le mutant *vjbR*. Ce compartiment posséderait également les caractéristiques ultrastructurales des autophagosomes (notamment une structure multimembranaire) (Delrue, 2002). Donc, ce mutant résiderait dans un compartiment qui a les caractéristiques d'un autophagosome.

### c) Le système de sécrétion de type IV : *virB*

L'opéron *virB* encode un système homologue au système de sécrétion de type IV retrouvé chez *Agrobacterium tumefaciens*, *Helicobacter pylori* ou encore *Legionella pneumophila* par exemple. Les systèmes de sécrétion de type IV sont des « machines » de sécrétion utilisées par des bactéries pathogènes pour libérer des molécules effectrices au cours d'une infection (fig I.16).

Tous les systèmes de sécrétion de type IV partagent deux caractéristiques communes :

- ces systèmes de sécrétion exportent des macromolécules (protéines ou complexes ADN-protéines) vers d'autres cellules habituellement après un contact intercellulaire
- ces systèmes ont un ancêtre commun avec les machineries de conjugaison.

Le système de sécrétion de type IV d'*Agrobacterium tumefaciens* est le modèle de référence. Ce système est composé de douze gènes (*virB1* à *virB11* et *virD4*) qui sont organisés en deux unités de transcription divergentes sur le plasmide Ti (« tumor inducing »).

Les protéines VirB sont classées en trois groupes selon la fonction qu'elles assurent dans l'appareil de sécrétion de type IV :

- protéines exocellulaires qui médient l'attachement
- protéines du corps de l'appareil de sécrétion dans le périplasma bactérien
- protéines ATPases cytoplasmiques

Le système de sécrétion de type IV d'*A. tumefaciens* permet l'exportation d'ADN dans le noyau et de protéines dans le cytosol de la cellule végétale. L'exportation de ces effecteurs dans les cellules de la plante provoque la formation d'une tumeur au site d'invasion.

Les protéines encodées par l'opéron *virB* (12 ou 13 ORF) de *Brucella* sont essentielles à la multiplication des bactéries dans les macrophages et dans les cellules HeLa. Les mutants *virB* sont aussi atténués en souris (Boschioli et al., 2002; Comerci et al., 2001; Delrue et al., 2001; Hong et al., 2000; O'Callaghan et al., 1999; Sieira et al., 2000).

La transcription de l'opéron *virB* est densité dépendante. En effet, Boschioli (Boschioli et al., 2002) a montré que l'opéron *virB* est induit en phase de latence et inhibé en phase stationnaire en milieu minimum. De plus, en mimant une forte densité de population par l'ajout d'homosérines lactones de *Brucella* (HSL) pendant la phase de latence, on inhibe l'opéron *virB* (Taminiau et al., 2002). Les HSL sont des phéromones bactériennes qui interviennent dans le quorum-sensing qui est un mécanisme permettant la modulation de

l'expression des gènes en réponse à une augmentation de la densité de population bactérienne. Au laboratoire, B. Taminau (Taminau et al., 2002) a montré que *B. melitensis* produit deux HSL dont la principale est la C<sub>12</sub> HSL.

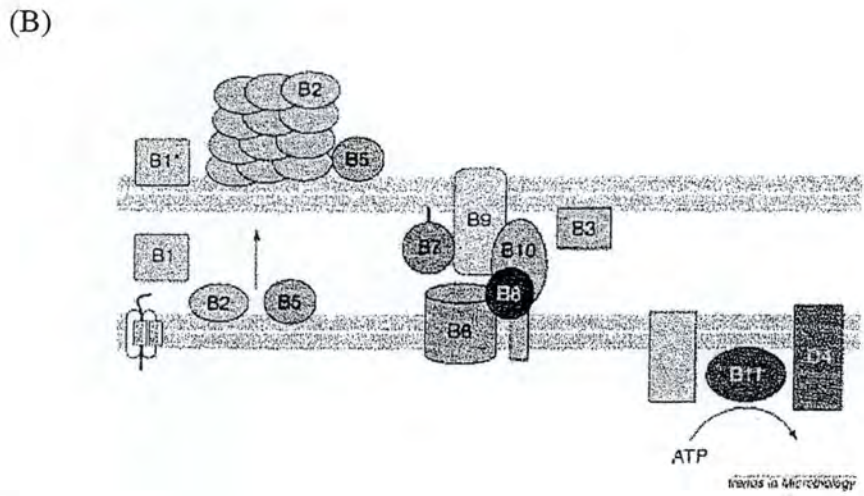
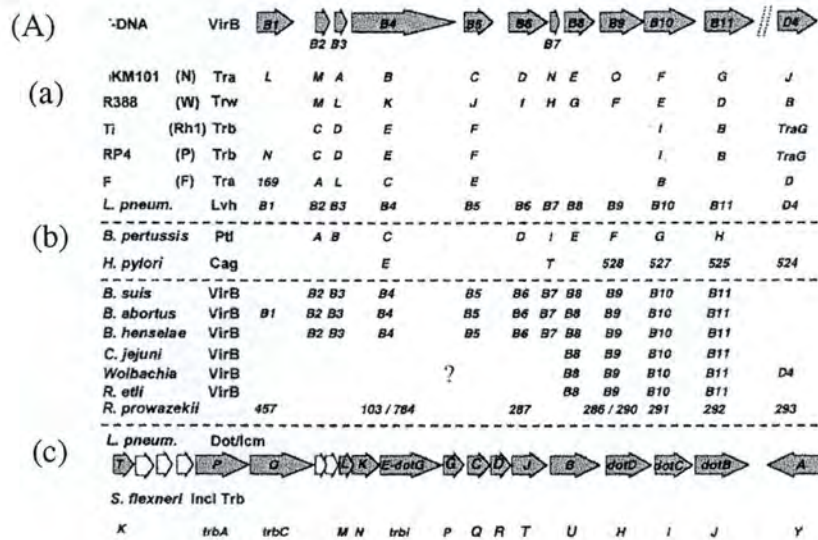
L'opéron *virB* est induit dans les macrophages après trois heures d'infection. L'induction est inhibée par la cytochalasine D (inhibiteur de la polymérisation d'actine) indiquant que ce n'est pas le contact cellule-bactérie qui est inducteur mais que l'induction se fait spécifiquement à l'intérieur des macrophages.

Comme décrit au point I.3.4.2, l'acidification du phagosome se fait durant la première heure de l'infection et est nécessaire à l'induction de l'opéron *virB* (Boschiroli et al., 2002).

In vitro, les conditions d'induction de l'expression de *virB* ressemblent à celles rencontrées par la bactérie dans son hôte :

- expression induite à 37°C, température corporelle de l'hôte humain
- expression induite en milieu pauvre, suggérant que le stress nutritionnel est un signal régulateur. L'environnement intracellulaire de *Brucella* semble, en effet, pauvre car de nombreux gènes induits dans les cellules ou nécessaires à la virulence sont impliqués dans le métabolisme de base (Boschiroli et al., 2002).

Comerci et Delrue (Comerci et al., 2001; Delrue, 2002) démontrent qu'un système de type IV fonctionnel est essentiel à la biogenèse de la vacuole de réplication de *Brucella*. Le système de sécrétion des mutants non polaires *virB10*, 2, 4 et 9 serait altéré mais partiellement fonctionnel. En effet, ce système permettrait encore la sécrétion de facteurs empêchant l'interaction entre le phagosome de *Brucella* et le lysosome. Deux types d'effecteurs potentiels seraient sécrétés par le système VirB ; l'un agissant pour éviter la voie d'endocytose classique (mis en évidence par le mutant polaire *virB10*) et l'autre nécessaire pour établir la niche de réplication (mis en évidence par le mutant non polaire *virB10* (Comerci et al., 2001) et les mutants *virB2*, 4 et 9 (Delrue, 2002)).



**Figure I.16 :** (A) Organisation génétique des gènes encodant un système de sécrétion de type IV. Le modèle de système de sécrétion de type IV est celui d'*Agrobacterium tumefaciens* et est représenté au sommet de la figure. (a) Représente les systèmes de conjugaison. (b) Représente les systèmes de transfert décrits comme des transporteurs d'effecteurs protéiques pendant une infection. (c) Les gènes *dot/icm* de *L. pneumophila* codent pour des protéines qui sont davantage homologues aux protéines de transfert du plasmide CoIIb-P9 (IncI) de *Shigella flexneri*, plutôt qu'au système VirB d'*A. tumefaciens*. Ce système peut transférer de l'ADN et exporte des protéines effectrices lors d'une infection cellulaire. (B) Localisation des composants du système de sécrétion de type IV, VirB, d'*A. tumefaciens* (repris de Christie et Vogel, 2000).

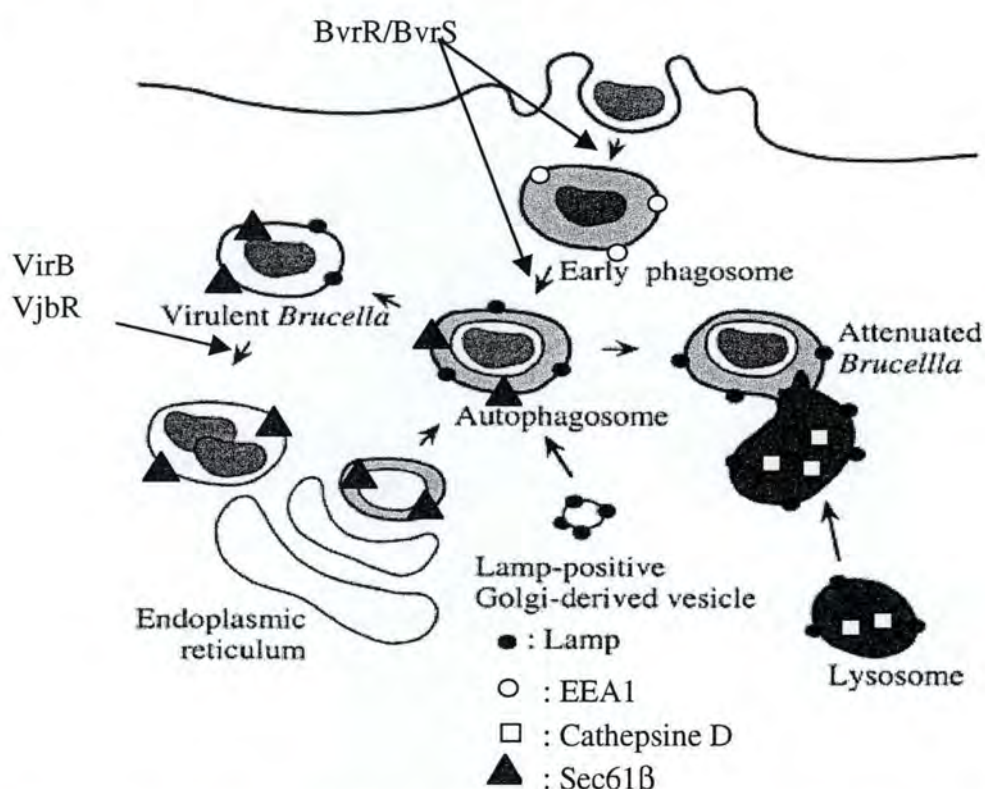
#### d) Le régulateur VjbR

Le gène disrupté par le transposon dans le mutant *vjbR* encode un régulateur transcriptionnel, VjbR (260 acides aminés), de la famille LuxR. Les membres de cette famille possèdent un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de liaison aux homosérines lactones (HSL).

#### e) Lien entre le régulateur VjbR et l'opéron *virB*

D'une part, les mutants *vjbR* et *virB2, 4* et *9* semblent avoir le même trafic intracellulaire, d'autre part, la C<sub>12</sub> HSL intervient dans l'expression de *virB* et VjbR est un régulateur de la famille LuxR. Ces données ont amené R. -M. Delrue à poser la question suivante : VjbR régule-t-il l'expression de l'opéron *virB* ?

En comparant l'expression de *virB* dans une souche sauvage et chez un mutant *vjbR*, elle a montré que VjbR est un activateur de la transcription de l'opéron *virB*. Ceci a été montré *in vitro* et lors d'infection de cellules HeLa. En effet, lorsqu'on infecte des cellules HeLa avec le délétant *vjbR* (où le gène *vjbR* est remplacé par une cassette de résistance à la kanamycine), on constate que l'opéron *virB* n'est pas transcrit, contrairement à ce qui est observé avec la souche sauvage de *B. melitensis* 16M.



**Figure I.17 :** Modèle du trafic intracellulaire de *Brucella abortus* dans les cellules HeLa. Les facteurs de virulence intervenant dans l'invasion ou la déviation du trafic intracellulaire sont indiqués ainsi que les marqueurs des différents compartiments utilisés par Pizarro-Cerda.

## II. But du mémoire

Ce mémoire comporte plusieurs parties qui ont pour point commun l'étude de l'interaction entre *Brucella* et sa cellule hôte.

La première partie consiste à déterminer si le cholestérol est important pour l'internalisation de *B. melitensis* comme c'est le cas pour *Mycobacterium*. Dans ce but, les cellules seront déplétées en cholestérol par traitement à la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine puis nous testerons l'effet de cette déplétion sur l'internalisation de *Brucella*.

Dans la seconde partie, nous avons cherché à mettre au point un nouveau modèle de réplication intracellulaire de *Brucella*, le modèle amibien. Nous avons utilisé *Acanthamoeba castellanii* car c'est la seule souche amibienne que nous avons obtenue et cultivée dans le temps imparti.

Dans la troisième partie, nous testerons si la présence de la souche sauvage restaure la capacité du mutant  $\Delta vjbR3$  à se répliquer dans les cellules. Cette donnée permettra de mieux comprendre l'implication du régulateur VjbR comme acteur dans la déviation du trafic intracellulaire de *Brucella*.

### III. Résultats et discussion

#### **III.1. Effet du cholestérol sur l'internalisation de *Brucella melitensis* dans les cellules phagocytaires**

##### III.1.1. Effet de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine sur l'internalisation de *B. melitensis*

Chez certains microorganismes pathogènes comme *Mycobacterium*, *Plasmodium falciparum* ou encore *Salmonella typhimurium*, le cholestérol intervient à l'étape d'internalisation du microorganisme dans la cellule hôte. Leur internalisation diminue lorsqu'une déplétion en cholestérol est provoquée dans la cellule hôte (Garner *et al.*, 2002; Gatfield et Pieters, 2000). Par contre, d'autres bactéries comme *Listeria monocytogenes* ne semblent pas être influencées par une déplétion en cholestérol (Braun et Cossart, 2000).

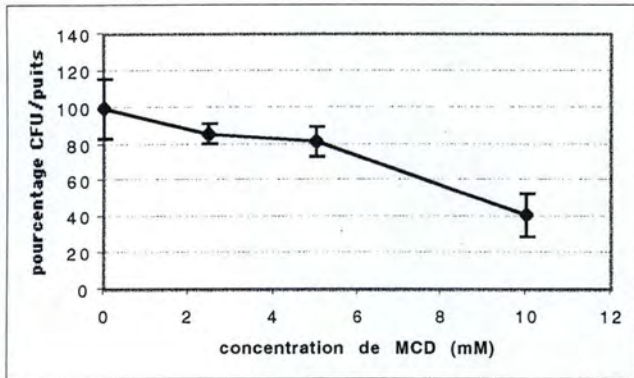
L'objectif de cette première partie est de tester si le cholestérol est nécessaire à l'internalisation de *B. melitensis* par les cellules phagocytaires qui, dans notre cas, sont une lignée de macrophages bovins (R.Stabel, 1995).

Dans ce but, préalablement à l'étape d'infection bactérienne, nous avons traité les cellules phagocytaires avec la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (MCD) qui séquestre le cholestérol membranaire et le rend soluble dans le milieu aqueux environnant en l'enfermant dans une « cage » dont le centre est hydrophobe et la surface hydrophile. Ce traitement avec la MCD entraîne une diminution rapide du taux de cholestérol membranaire (Christian *et al.*, 1997; Neufeld *et al.*, 1996).

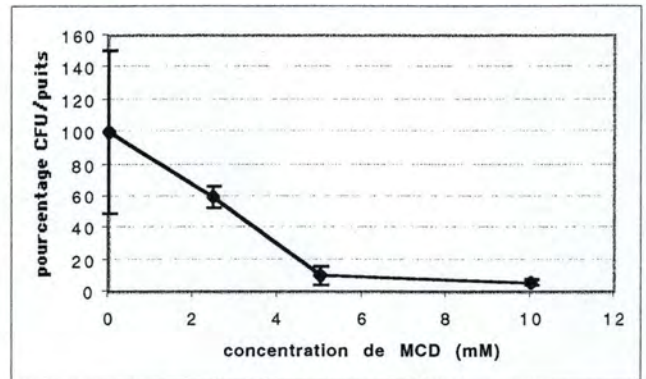
En pratique, lors de l'incubation du tapis cellulaire avec la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine, nous avons testé l'effet de deux temps d'incubation (30 min et une heure) et des concentrations croissantes de 0, 2,5, 5 et 10 mM de MCD (Garner *et al.*, 2002; Jadot *et al.*, 2001). Après lavage, les cellules sont ensuite incubées avec les bactéries *B. melitensis* 16M NalS pendant une heure. Les bactéries extracellulaires sont finalement éliminées par lavages et incubation avec l'antibiotique gentamycine. À cette étape, les bactéries intracellulaires vivantes sont dénombrées.

Les résultats présentés à la figure III.1 sont exprimés en pourcents de *B. melitensis* vivantes par rapport aux puits contrôles incubés sans MCD.

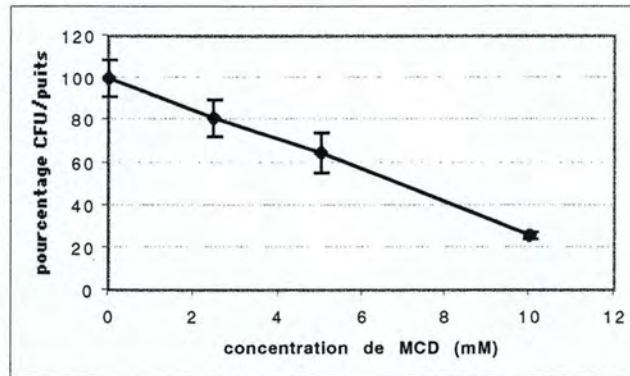
(A)



(B)



(C)



**Figure III.1 :** Effet de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine sur l'internalisation de *B. melitensis*. *Brucella* vivantes (CFU) par puits dénombrées après une heure d'infection suite à une incubation avec des concentrations croissantes de MCD. Les résultats sont exprimés en pourcents par rapport aux puits contrôles incubés sans MCD. Chaque point représente la moyenne de trois puits. L'écart-type est indiqué et les trois expériences sont indépendantes. L'incubation avec la MCD est de 30 minutes (A) ou d'une heure (B et C).

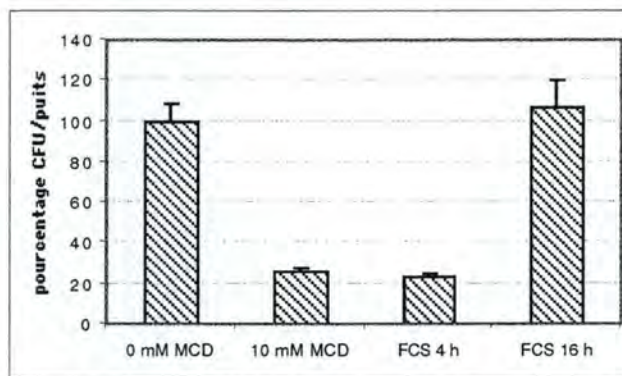
Ces résultats indiquent que l'internalisation diminue d'autant plus que la concentration en MCD augmente. La diminution du taux d'internalisation de *B. melitensis* est très nette suite à une incubation du tapis de macrophages bovins avec 10 mM de MCD. Il semble également qu'en augmentant le temps d'incubation (de 30 minutes à une heure), l'effet de la MCD soit plus marqué.

De plus, l'entrée de *Brucella* n'est pas réduite artificiellement suite à une mort cellulaire car le traitement avec la MCD ne semble pas avoir d'effet significatif sur la viabilité ou la morphologie des cellules (résultats non montrés).

### III.1.2. Réversibilité de l'effet de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine sur l'internalisation de *B. melitensis*

Si la diminution du taux d'entrée de *B. melitensis* est spécifiquement due à une déplétion des cellules en cholestérol, la récupération du cholestérol devrait restaurer la capacité des cellules à internaliser les *Brucella*. Des cellules déplétées peuvent « récupérer » du cholestérol membranaire par addition de milieu de culture contenant du sérum. Nous avons donc testé si l'inhibition de l'entrée de *B. melitensis* induite par le traitement avec la MCD est réversible.

Pratiquement, après un traitement avec 10 mM de MCD pendant une heure, les cellules sont incubées avec du milieu additionné de sérum comme source de cholestérol. Après 4 h ou 16 h d'incubation, l'infection bactérienne est réalisée et les bactéries intracellulaires sont dénombrées après une heure d'infection.



**Figure III.2 :** Réversibilité de l'inhibition de l'entrée de *B. melitensis* par le traitement avec la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine. Pourcentage de *B. melitensis* vivantes (CFU) par puits après incubation en absence de MCD (0 mM), en présence de MCD (10 mM) et après récupération en présence de sérum pendant 4 h (FCS 4 h) ou 16 h (FCS 16 h). Les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport aux puits contrôles incubés sans MCD. Chaque point correspond à la moyenne de trois puits et l'écart-type est indiqué.

La figure III.2 montre qu'une durée d'incubation de 4 h en présence de sérum semble trop courte pour observer une « réversion ». Par contre, après 16 h d'incubation en présence de sérum, la capacité des macrophages bovins à internaliser *B. melitensis* est totalement rétablie ; la « réversion » est complète.

À titre indicatif, citons Garner (Garner et al., 2002) qui a montré que l'inhibition de l'entrée de *Salmonella typhimurium* dans les cellules HeLa est partiellement levée après 4 à 8 h d'incubation en présence de sérum et complètement levée après 12 à 22 h. Il faut au moins 12 h de réversion pour restaurer 90% du taux d'internalisation de départ.

Il faudrait tester des temps de réversion plus courts (10, 12 ou 14 heures) pour déterminer la limite de réversion pour *B. melitensis*.

Notre expérience suggère que l'inhibition de l'internalisation de *B. melitensis* est spécifiquement due à une déplétion des membranes en cholestérol. D'autres méthodes sont envisageables pour montrer la spécificité de l'effet de la MCD :

1 - un traitement comparatif des cellules avec de l'  $\alpha$ -cyclodextrine qui séquestre le cholestérol de façon négligeable (Ohtani *et al.*, 1989) et qui par conséquent ne devrait pas avoir d'effet sur l'internalisation de *Brucella*.

2 - après une déplétion avec la MCD, l'addition de la MCD chargée avec du cholestérol devrait entraîner une réversion.

### III.1.3. Dosage du cholestérol après traitement avec la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine

Nous avons ensuite voulu quantifier la déplétion en cholestérol suite au traitement des cellules avec la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine.

En pratique, nous avons traité des cellules (plus de 10 millions par échantillon) pendant 30 ou 60 minutes avec 0, 2,5, 5 et 10 mM de MCD. Les cellules ont ensuite été lavées, récupérées, lysées, puis le cholestérol total a été dosé dans le lysat à l'aide d'un kit de dosage enzymatique (SIGMA diagnostics) (tableau III.1).

**Tableau III.1 :** Dosage du cholestérol cellulaire après traitement avec la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine. Utilisation de plus de  $10^7$  macrophages bovins par échantillon. Deux kits différents ont été utilisés : essai 1 (Kit 1) et essais 2 et 3 (Kit 2). La concentration en cholestérol est exprimée en mg/ml.

Échantillons	Essai n°1		Essai n°2		Essai n°3	
	DO 500 nm	[cholestérol] mg/ml	DO 500 nm	[cholestérol] mg/ml	DO 500 nm	[cholestérol] mg/ml
Blanc	0,010		0,000		0,000	
Etalon (cholestérol 2 mg/ml)	0,410		2,664		2,700	
0 mM MCD	0,077	0,335	0,543	0,408	0,302	0,224
2,5 mM MCD	0,105	0,475	0,859	0,644	0,369	0,273
5 mM MCD	0,106	0,480	0,620	0,465	0,414	0,307
10 mM MCD	0,093	0,415	0,725	0,544	0,460	0,341

La sensibilité du premier kit de dosage du cholestérol total étant trop faible, nous avons utilisé un nouveau kit de dosage qui a permis de détecter le cholestérol présent dans nos échantillons mais il reste toujours peu sensible.

Nos résultats ne montrent pas de diminution de la quantité de cholestérol suite au traitement avec la MCD. Pourtant, dans la littérature, il est clairement démontré que la MCD séquestre le cholestérol (Christian *et al.*, 1997; Kilsdonk *et al.*, 1995; Ohtani *et al.*, 1989). Nous n'avons pas d'explication claire concernant ce résultat inattendu. Il est possible que le dosage du cholestérol sur un lysat cellulaire total ne permette pas de mettre en évidence une diminution de cholestérol affectant principalement la membrane plasmique. Après la lyse des

cellules, un fractionnement des organites subcellulaires pourrait être réalisé suivi d'un dosage du cholestérol dans les différentes fractions obtenues.

D'autres méthodes de mise en évidence du cholestérol sont décrites pour prouver la diminution du cholestérol suite à un traitement avec la MCD (Garner et al., 2002). On peut, d'une part, incorporer du cholestérol radioactif et quantifier la radioactivité associée aux membranes avant et après le traitement avec la MCD. D'autre part, on pourrait utiliser un marqueur fluorescent, la filipine, qui se lie spécifiquement au cholestérol non-estérifié. Cette méthode permet de visualiser par microscopie à fluorescence la déplétion en cholestérol à la surface cellulaire.

#### III.1.4. Discussion et perspectives

Le cholestérol est présent dans toute la membrane plasmique mais est particulièrement concentré au niveau des « lipid rafts » qui sont des zones de la membrane plasmique riches en cholestérol, en gangliosides et en protéines intervenant dans la transduction du signal.

Nos résultats montrent que le traitement de macrophages bovins avec 10 mM de MCD pendant 30 min à 1 h entraîne une diminution de l'internalisation de *Brucella*. L'effet semble spécifiquement dû à une déplétion en cholestérol car l'incubation en présence de sérum restaure la capacité d'internaliser des cellules. Cependant, nous n'avons pas réussi à quantifier cette déplétion en cholestérol.

Afin de quantifier l'internalisation de *B. melitensis*, nous dénombrons les *Brucella* intracellulaires vivantes après 1 h de contact et 1 h d'infection. Il serait plus exact de dire que ces données quantifient la survie intracellulaire de *B. melitensis* à court terme qui est à considérer comme un phénomène différent de l'entrée bactérienne proprement dite. L'étape d'internalisation bactérienne c'est-à-dire la phagocytose serait plus précisément mesurée par comptage des bactéries intracellulaires par microscopie à fluorescence à des temps plus courts (entre 0 et 1 h). Cette méthode utiliserait, par exemple, des bactéries *Brucella* fluorescentes (exprimant la « Green Fluorescent Protein » de façon constitutive) et nécessiterait de distinguer les bactéries intracellulaires des bactéries extracellulaires par marquage immunofluorescent des bactéries extracellulaires. Notons que cette méthode, contrairement à celle que nous avons utilisée, ne permet pas de différencier les bactéries vivantes des bactéries mortes.

Au cours de ce mémoire, l'équipe de Françoise Porte a publié des résultats montrant que deux composants des « lipid rafts », le cholestérol et le ganglioside GM1, sont impliqués dans l'entrée de *Brucella suis* dans des macrophages murins (Naroeni et Porte, 2002). Ces résultats s'appuient à la fois sur la mesure de la phagocytose par microscopie à fluorescence et sur la quantification de la survie à court terme. Les agents « séquestrant » utilisés sont la MCD et la filipine pour le cholestérol et la toxine cholérique pour le ganglioside GM1. Ces trois traitements diminuent le taux d'internalisation de *Brucella*. Le traitement avec la MCD

est de 30 min et l'effet est maximal à une concentration de 10 mM comme nous l'avons observé. La diminution de survie à court terme serait directement liée à l'inhibition d'entrée observée en microscopie. Nos données obtenues avec *B. melitensis* et une lignée de macrophages bovins sont complémentaires de leurs résultats.

Pour compléter nos résultats, deux expériences sont envisageables. De façon à tester si le cholestérol s'accumule au site d'entrée de *Brucella* comme c'est le cas pour *Mycobacterium* (Gatfield et Pieters, 2000), la filipine, marqueur fluorescent se liant spécifiquement au cholestérol, permettra de visualiser le cholestérol membranaire dans des macrophages infectés et non infectés. D'autre part, en incubant *Brucella* avec du cholestérol radioactif, on pourra vérifier si *Brucella* se lie directement au cholestérol. Le composé de *Brucella* se liant au cholestérol devra alors être identifié. Le  $\beta$ -glucan cyclique périplasmique de *Brucella* serait un candidat pour cette fonction. Dans le paragraphe suivant, nous détaillons les éléments qui étayent cette hypothèse.

Une souche de *B. abortus* mutée dans la synthétase de  $\beta$ -1,2-glucan périplasmique est atténuée dans le modèle murin BALB/c et a un taux de réplication très réduit dans les cellules HeLa (Briones *et al.*, 2001; Inon, 1998). Ces oligosaccharides sont composés du même monomère que la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine ; le glucopyranose. La MCD est un polymère cyclique constitué de 6 à 8 de ces unités liées en  $\alpha$ -1,4. Par contre, les glucans périplasmiques de *Rhizobium*, d'*Agrobacterium* et probablement de *Brucella* également contiennent de 17 à 24 résidus liés en  $\beta$ -1,2 (André, 1995). Contrairement aux cyclodextrines, on connaît peu de choses de la forme générale et des dimensions de la cavité de ces  $\beta$ -glucans. Cependant, Moreno indique dans son article que le  $\beta$ -glucan cyclique de *Brucella* interagit avec les membranes de l'hôte et séquestre le cholestérol (Moreno et Moriyon, 2002). Nous supposons donc qu'il y a un lien entre l'atténuation des mutants synthétase et le fait que les  $\beta$ -glucans cycliques séquestrent le cholestérol. Briones (Briones *et al.*, 2001) montre néanmoins que la souche mutée dans la synthétase de  $\beta$ -1,2-glucan envahit aussi bien les cellules HeLa que la souche sauvage *B. abortus* (mais s'y réplique très mal). Donc, les  $\beta$ -1,2-glucans n'interviendraient pas au niveau de l'internalisation que nous avons étudiée mais plus tard dans le trafic intracellulaire. Le cholestérol jouerait donc un rôle important dans le trafic intracellulaire de *Brucella*. Chez *Mycobacterium tuberculosis* par exemple, le cholestérol intervient lors de l'internalisation et lors du trafic intracellulaire (Gatfield et Pieters, 2000).

Nos résultats et ceux de Naroeni et Porte suggèrent que les « lipid rafts » seraient une porte d'entrée de *Brucella* dans les macrophages. Le mode d'entrée est probablement essentiel dans la maturation de la vacuole naissante. L'avantage de ce moyen d'entrée est qu'il entraînerait la localisation de *Brucella* dans une vésicule intracellulaire contenant des microdomaines lipidiques qui ne suit pas la voie d'endocytose classique car elle ne fusionnerait pas avec un lysosome (Anderson, 1998; Shin et Abraham, 2001; Shin et Abraham, 2001). Donc, l'entrée de *Brucella* dans les cellules par les « lipid rafts » pourrait

contribuer à expliquer pourquoi le phagosome contenant cette bactérie ne fusionne pas avec un lysosome.

### **III.2. Utilisation de l'amibe *Acanthamoeba castellanii* comme modèle de réplication intracellulaire de *B. melitensis***

#### III.2.1. Introduction

Afin d'étudier l'interaction entre *B. melitensis* et une cellule hôte, nous avons testé un nouveau modèle de réplication intracellulaire de *Brucella* : les amibes. Différents modèles amibiens sont actuellement utilisés pour l'étude d'interaction hôte-pathogène : il s'agit principalement de l'amibe du sol *Dictyostelium discoïdeum* et des amibes d'eau douce *Hartmanella vermiformis* et *Acanthamoeba castellanii*.

*D. discoïdeum* est un eucaryote complexe qui passe une partie de son cycle de vie sous forme unicellulaire. Cette amibe est très intéressante pour l'étude des interactions avec les bactéries car elle se nourrit de ces dernières par un mécanisme phagocytaire ressemblant à celui des macrophages des mammifères. De plus, elle est haploïde, son génome est relativement petit (34Mb) et presque entièrement séquencé (Solomon et Isberg, 2000). Cette amibe est manipulable génétiquement et des mutants du trafic intracellulaire existent déjà. *D. discoïdeum* est donc un modèle idéal pour étudier l'interaction hôte-pathogène car ce système permet d'identifier les protéines eucaryotes intervenant dans cette interaction en identifiant des mutants de cette amibe qui n'autorisent pas l'adhésion, l'entrée ou la réplication bactérienne.

N'ayant pas réussi à obtenir de souche de *D. discoïdeum* dans le cadre de ce mémoire, nous avons testé la réplication de *B. melitensis* dans le modèle *A. castellanii*.

En effet, ce type de modèle a été utilisé pour étudier l'internalisation et le trafic intracellulaire de *Legionella pneumophila*, de *Mycobacterium avium*, de *Chlamydia* ou encore de la levure encapsulée *Cryptococcus neoformans* (Cirillo *et al.*, 1999; Essig *et al.*, 1997; Miltner et Bermudez, 2000; Moffat et Tompkins, 1992; Steenbergen *et al.*, 2001). On constate donc, que plusieurs bactéries pathogènes et *C. neoformans* qui ont un tropisme intracellulaire pour les macrophages sont capables de se répliquer dans des amibes comme *A. castellanii*. En fait, le processus de phagocytose d'*A. castellanii* est semblable à celui des macrophages.

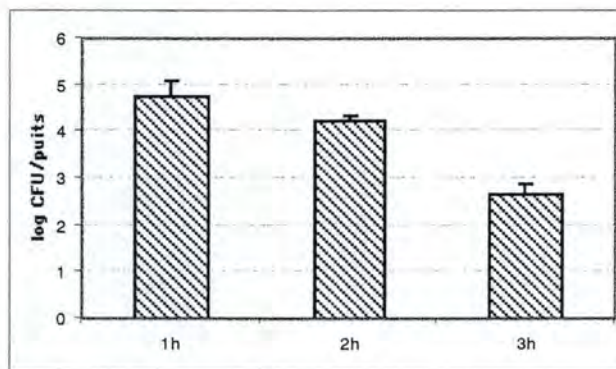
Notre protocole est adapté de celui utilisé par J. Moffat (Moffat et Tompkins, 1992) pour infecter *A. castellanii* par *L. pneumophila* et des protocoles d'infection de cellules en culture par *B. melitensis* utilisés au laboratoire. Nous avons testé l'influence de plusieurs paramètres sur le nombre de *B. melitensis* intracellulaires vivantes :

- le temps de contact entre *B. melitensis* et *A. castellanii*
- le nombre de *B. melitensis* par amibe ou dose infectante (D.I)

- la présence de l'antibiotique gentamycine en cours d'infection
- le milieu de culture des amibes

### III.2.2. Mise au point du temps de contact

En pratique, nous avons infecté les amibes avec *B. melitensis* pendant 1, 2 et 3 heures. Après lavage et incubation pendant une heure avec la gentamycine pour éliminer les bactéries extracellulaires, les cellules sont lavées et lysées pour dénombrer les bactéries intracellulaires vivantes. Les résultats sont exprimés en logarithme de *Brucella* vivantes par puits (fig III.3).



**Figure III.3 :** Influence du temps de contact entre *A. castellanii* et *B. melitensis* lors d'une infection. Les résultats sont exprimés en logarithme de *B. melitensis* intracellulaires vivantes (CFU) par puits. Chaque point correspond à la moyenne de trois puits et l'écart-type est indiqué. Le temps de contact *Brucella*-amibes est de 1, 2 ou 3 h.

On observe que *Brucella* est internalisée efficacement par les amibes ce qui est compatible avec le fait que ces amibes se nourrissent de bactéries (Winiecka-Krusnell et Linder, 2001). De plus, le nombre de *Brucella* intracellulaires vivantes diminue progressivement lorsque le temps de contact augmente. Ce résultat suggère qu'après internalisation, *B. melitensis* est dégradée dans *A. castellanii* au moins pendant les premières heures de l'infection.

Dans la suite des expériences, nous utiliserons 1 h de contact entre *Brucella* et les amibes.

### III.2.3. Effet de la dose bactérienne infectante

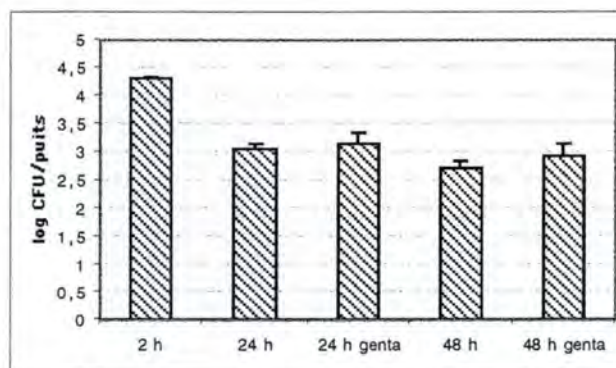
Nous avons testé des doses bactériennes infectantes comprises entre 25 et 12000 *Brucella* par amibe. Le nombre de *Brucella* intracellulaires vivantes après 1 h d'infection reste toujours situé entre 4,2 et 4,98 log par puits. Chaque puits contenant environ  $2.10^5$  amibes, le taux d'infection est compris entre 8 et 45 (avec une moyenne de 25) bactéries pour 100 amibes. Ces résultats sont comparables à ce qui est observé lors d'infection de lignées cellulaires avec *Brucella* (Rittig *et al.*, 2001). À ce stade, nous n'avons pas déterminé le nombre de *Brucella* intracellulaires par amibe infectée.

Nous préconisons d'utiliser la même dose infectante que dans les modèles cellulaires utilisés en laboratoire c'est-à-dire au moins 300 bactéries par cellule pour avoir suffisamment d'évènements de phagocytose (condition saturante).

#### III.2.4. Effet de la présence de la gentamycine en cours d'infection

Une différence entre le protocole d'infection décrit pour les amibes et celui utilisé au laboratoire pour les lignées cellulaires est la période d'utilisation de la gentamycine. Dans le premier cas, après infection, les amibes sont incubées en présence de gentamycine pendant 1h pour tuer les bactéries extracellulaires puis lavées et incubées sans antibiotique pendant 24 à 48 h. Dans le second cas, l'incubation avec la gentamycine est prolongée pendant 24 à 48 h après l'infection.

Nous avons testé si l'incubation prolongée avec la gentamycine influence le résultat de l'infection. En effet, il est nécessaire de vérifier si, à la concentration d'antibiotique utilisée (50µg/ml), une éventuelle diffusion de gentamycine à l'intérieur des amibes entraînerait la mort de certaines *Brucella* intracellulaires (Bavoil, 1997). La figure III.4 montre que l'incubation en présence de gentamycine n'a pas d'effet significatif sur le nombre de *Brucella* intracellulaires vivantes après 24 ou 48 h.



**Figure III.4 :** Influence de la présence de gentamycine sur le nombre de *B. melitensis* intracellulaires dans *A. castellanii*. Les résultats sont exprimés en logarithme des *Brucella* intracellulaires vivantes (CFU) par puits. Chaque point correspond à la moyenne de trois puits et l'écart-type est indiqué.

Cependant, sur la figure III.4, on observe une diminution du nombre de *Brucella* au cours du temps. Cette diminution s'explique soit par la dégradation des *Brucella* intracellulaires soit par la mort des amibes (suite aux conditions de culture ou à l'infection elle-même). En effet, l'infection avec *Pseudomonas aeruginosa* conduit à la mort des amibes (Pukatzki *et al.*, 2002). Nous avons testé ces deux hypothèses.

Concernant les amibes, dans la littérature, *A. castellanii* est placée en condition de famine (tampon Ac) avant de procéder à l'infection avec *L. pneumophila* afin de stimuler la phagocytose (Moffat et Tompkins, 1992). Les infections précédentes ont été réalisées dans ce tampon. Théoriquement, *A. castellanii* est capable de survivre de 72 à 104 heures en condition

de famine dans le tampon Ac (Cirillo *et al.*, 1994). Nous avons testé l'effet du milieu de culture des amibes sur l'infection avec *B. melitensis*. D'autre part, les amibes sont cultivées en suspension mais pour l'infection, on travaille avec des amibes adhérentes.

Les expériences suivantes consisteront à tester l'effet de ces différentes conditions de culture des amibes sur la survie intracellulaire de *Brucella* tout en contrôlant l'état morphologique et la viabilité des amibes.

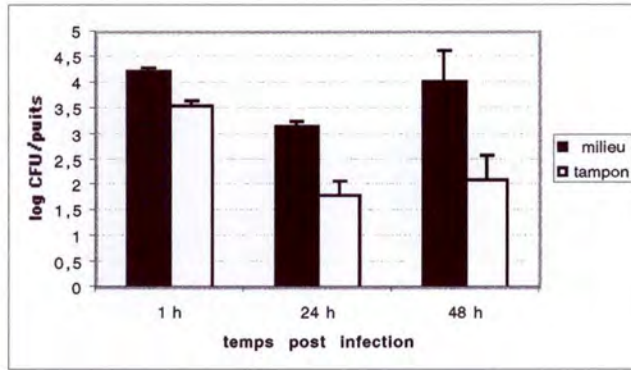
### III.2.5. Effet des conditions de culture des amibes

Les amibes ont été infectées par *Brucella* soit en milieu riche (milieu Ac) soit en condition de famine (tampon Ac) pendant 1 h. Puis, après lavage et traitement à la gentamycine, nous avons incubé les amibes pendant 24 et 48 h avant de procéder au dénombrement des bactéries intracellulaires.

Parallèlement, nous avons évalué la viabilité des amibes par comptage après une coloration vitale et nous avons observé leur morphologie au microscope optique.

Les résultats (fig III.5) indiquent que l'internalisation est efficace dans le milieu et dans le tampon ; le passage en milieu de famine n'améliorant pas l'internalisation. Dans le milieu Ac, le nombre de *Brucella* par puits semble augmenter entre 24 et 48 h. Cependant, l'écart-type calculé est trop élevé pour conclure qu'il s'agit d'une répllication bactérienne intracellulaire. Par contre, en condition de famine, le nombre de *Brucella* chute à 24 h. De plus, après 24 et 48 h de culture en tampon Ac, environ 50% des amibes sont mortes alors qu'après 1 h dans ce tampon, on observe 1% de cellules mortes. L'aspect morphologique des amibes cultivées en tampon Ac est différent des amibes cultivées en milieu Ac. Elles sont plus petites et plus rondes après 24 et 48 h de culture (fig III.6).

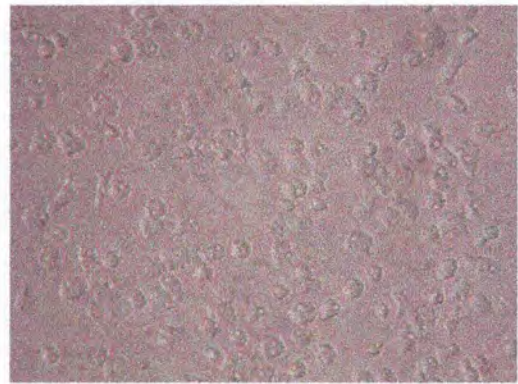
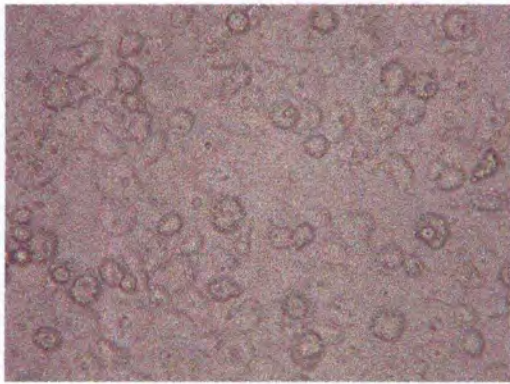
En milieu Ac, après 1, 24 et 48 h de culture, on observe seulement 1% de cellules mortes que les amibes aient été infectées ou non par *Brucella*. Ceci montre que *Brucella* ne semble pas tuer les amibes. De plus, le fait de travailler en conditions d'adhérence des amibes pendant 2 à 48 h ne semble donc pas affecter leur survie. Pour confirmer ce point, nous avons testé un paramètre supplémentaire : comparer la capacité des amibes à phagocyter des *Brucella* après 2, 24 ou 48 h d'adhérence. En pratique, nous avons laissé adhérer *A. castellanii* pendant 2, 24 ou 48 h dans les puits à 37°C avant de procéder à l'infection avec *B. melitensis*. Nous n'observons pas d'effet dramatique de la durée de l'adhérence sur la capacité de phagocytose des amibes (fig III.7).



**Figure III.5 :** Influence du milieu de culture d'*A. castellanii* lors de l'infection avec *B. melitensis*. Les résultats sont exprimés en logarithme des *Brucella* intracellulaires vivantes (CFU) par puits . Chaque point correspond à la moyenne de trois puits et l'écart-type est indiqué. L'infection des amibes est réalisée dans le milieu Ac ou dans le tampon Ac.

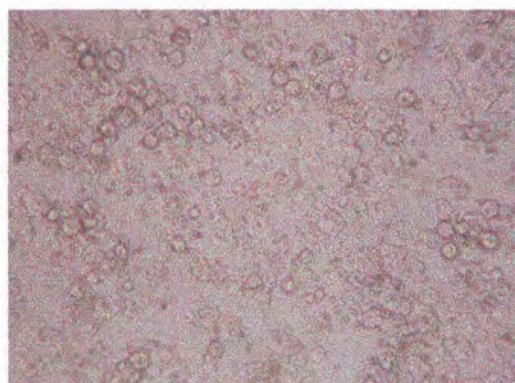
(A) Milieu Ac

(B) Tampon Ac

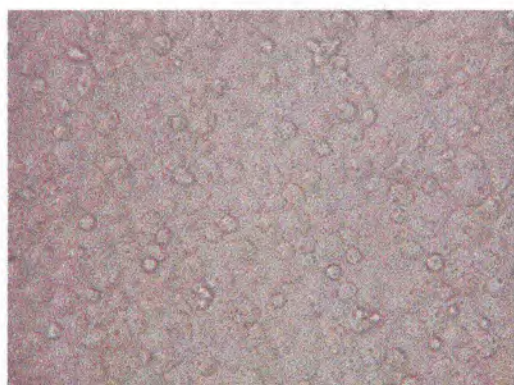


(C)

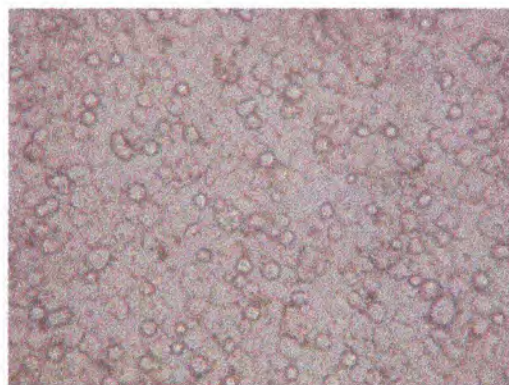
(D)



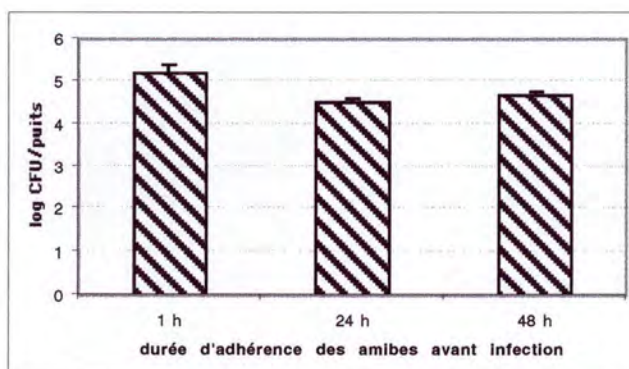
(E)



(F)



**Figure III.6 :** photos au microscope inversé d'*A. castellanii* dans le milieu Ac (A, C et E) et dans le tampon Ac (B, D et F) après 1 (A et B), 24 (C et D) et 48 h (E et F) de culture. Le grossissement est de 1500x.



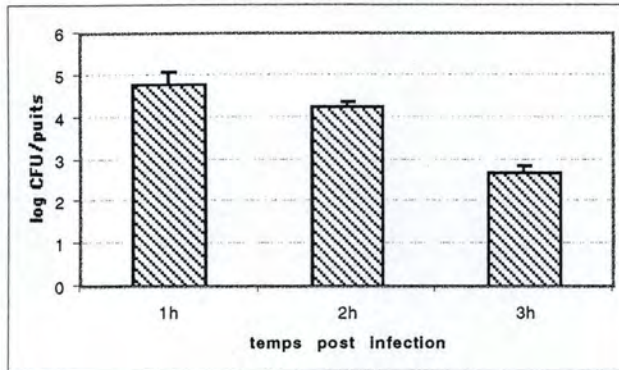
**Figure III.7 :** Influence de la durée d'adhérence d'*A. castellanii* au fond des puits avant infection avec *Brucella*. Les résultats sont exprimés en logarithme de *Brucella* intracellulaires vivantes (CFU) par puits. Chaque point correspond à la moyenne de trois puits et l'écart-type est indiqué.

### III.2.6. Cinétique de l'infection d'*A. castellanii* par *B. melitensis*

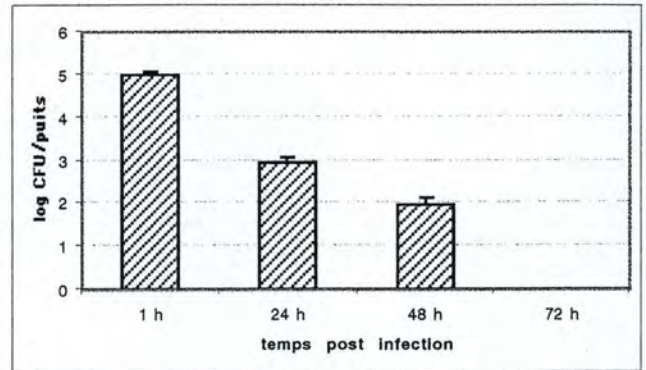
Nous avons par conséquent choisi d'infecter des amibes cultivées en milieu Ac riche pour évaluer la survie ou la réplication de *Brucella* à temps court et long (de 24 à 72 h).

En pratique, nous avons infecté *A. castellanii* par *B. melitensis* et nous avons dénombré les bactéries après 1, 2 et 3 heures (figure III.8.A) et après 1, 24, 48 et 72 heures (fig III.8.B).

(A)



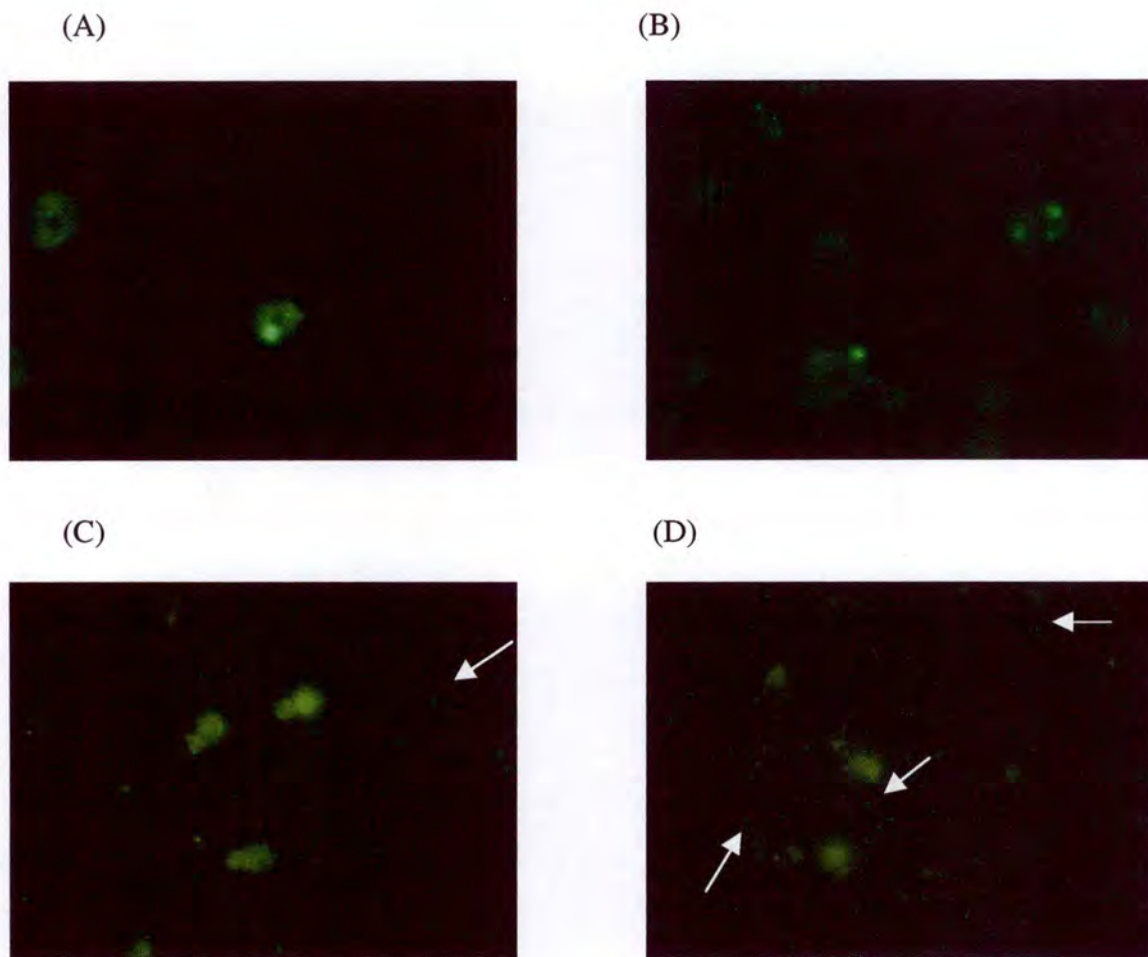
(B)



**Figure III.8. A et B :** Cinétique d'infection d'*A. castellanii* par *B. melitensis*. Les résultats sont exprimés en logarithme de *Brucella* intracellulaires vivantes (CFU) par puits. Chaque point correspond à la moyenne de trois puits. Les écart-types sont indiqués.

Dès la seconde heure d'infection, on observe une diminution progressive des *Brucella* au cours du temps comme observé précédemment (fig III.3). Après 72 h, on ne détecte plus de *Brucella*. Nous en concluons que les *Brucella* sont internalisées par les amibes puis digérées. *Brucella* ne semble donc pas capable ni de résister ni de se répliquer dans l'amibe *A. castellanii*.

Nous avons confirmé ces résultats par microscopie à fluorescence. Dans ce but, nous avons procédé à une infection des amibes avec une souche de *B. melitensis* 16M exprimant constitutivement la GFP (« Green Fluorescent Protein ») et donc visible en fluorescence. Nous avons fixé les amibes avec du paraformaldéhyde après 1, 24, 48 et 72 heures d'infection puis visualisé les cellules en fluorescence (fig III.9).



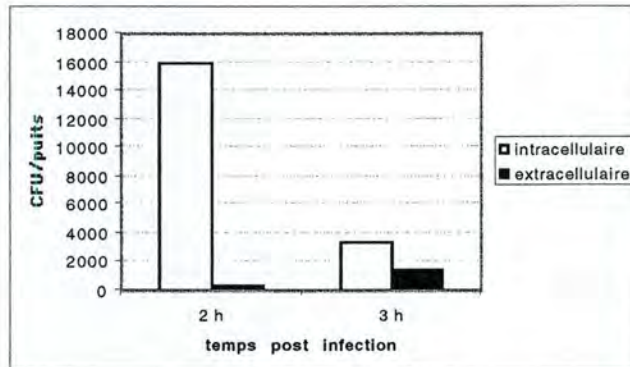
**Figure III.9 :** photos au microscope à fluorescence d'*A. castellanii* infectées par *B. melitensis* 16M GFP après 1 (A), 24 (B), 48 (C) et 72 h (D) d'infection. Le grossissement est de 4000x. Les flèches indiquent les bactéries extracellulaires.

On constate que les observations microscopiques confirment les résultats obtenus lors du dénombrement des bactéries intracellulaires vivantes (fig III.8 et 9). Après une heure, on observe de grandes vacuoles intracellulaires gorgées de *Brucella*. Au fur et à mesure du temps, les vacuoles contiennent de moins en moins de bactéries. Par contre, on voit de plus en plus de bactéries extracellulaires. Après 72 heures d'infection, on ne voit que des bactéries extracellulaires.

Afin d'évaluer si les bactéries extracellulaires fluorescentes observées sont vivantes ou mortes, nous avons dénombré les bactéries extra- et intra-cellulaires à temps court après infection.

En pratique, nous avons infecté *A. castellanii* avec des *Brucella* pendant une heure. Ensuite, nous avons lavé et incubé avec de la gentamycine pendant une heure pour éliminer les bactéries extracellulaires. Après lavage pour éliminer la gentamycine, l'infection est prolongée pendant 1 ou 2 h puis les bactéries sont dénombrées dans le surnageant (bactéries extracellulaires) et dans les amibes (bactéries intracellulaires). Ce dénombrement s'est fait à temps court (2 et 3 h) après l'infection afin de détecter une éventuelle « exocytose » de

bactéries intracellulaires et pas une répllication des bactéries extracellulaires dans le milieu de culture.



**Figure III.10 :** Nombre de *Brucella* extracellulaires et intracellulaires vivantes après 2 et 3 h d'infection d'*A. castellanii*. Les résultats sont exprimés en nombre des bactéries vivantes (CFU) par puits. Chaque point correspond à la moyenne de deux puits.

On constate qu'après 2 h d'infection, une très faible proportion de bactéries est extracellulaire (fig III.10). Une heure plus tard, la majorité des *Brucella* a été dégradée par les amibes mais une proportion importante des survivantes est extracellulaire. Le protocole expérimental utilisé (lavages et incubation avec la gentamycine) devrait éliminer la majorité des bactéries extracellulaires après 1 h d'infection. De plus, l'augmentation du nombre de bactéries extracellulaires entre les points 2 et 3 h post infection est trop élevée (facteur 10) pour correspondre à la répllication de bactéries extracellulaires.

Notre hypothèse est qu'une proportion importante des bactéries extracellulaires au point 3 h sont passées par un stade intracellulaire et ont été « libérées » par les amibes. Cette hypothèse est confortée par le fait que dans le cas de *D. discoïdeum*, le matériel non-digéré ressort de l'amibe via des vacuoles neutres post-lysosomales (Journet *et al.*, 1999). On pourrait donc imaginer un processus identique dans le cas d'*A. castellanii*.

### III.2.7. Discussion et perspectives

Les expériences nous montrent que *B. melitensis* est capable d'entrer dans *A. castellanii* mais n'est pas capable de s'y répliquer. *Brucella* se fait digérer par *Acanthamoeba*. Ce résultat est compatible avec le fait que ces amibes se nourrissent de bactéries.

Rappelons que plusieurs bactéries parviennent à se répliquer dans *A. castellanii*.

*L. pneumophila* est une bactérie qui possède une large gamme d'hôtes dont plus de treize espèces d'amibes comprenant *Dictyostelium discoïdeum*, *A. castellanii* et *Hartmannella vermiformis* et deux espèces de protozoaires ciliés. De plus, il faut savoir que les bactéries isolées à partir des amibes expriment divers phénotypes (comme des flagelles ou d'autres facteurs de virulence) qui augmentent l'incidence et les complications liées à la maladie provoquée chez l'homme par *L. pneumophila* (pneumonie). La répllication de *L. pneumophila*

dans les amibes augmente non seulement le nombre de bactéries mais aussi leur virulence et leur résistance aux agents antimicrobiens (Swanson et Hammer, 2000). Le trafic intracellulaire de *L. pneumophila* est similaire dans les amibes et dans les macrophages humains ce qui permet d'utiliser les amibes comme modèle pour mieux comprendre la pathogénie de *L. pneumophila*.

*Chlamydia pneumoniae* et *L. pneumophila* partagent beaucoup de propriétés cliniques et bactériologiques, Essig (Essig et al., 1997) a donc proposé et démontré que *A. castellanii* est un hôte intermédiaire de *C. pneumoniae*.

*Mycobacterium avium* est une bactérie pathogène opportuniste rencontrée dans l'eau et dans le sol. *A. castellanii* peut servir d'hôte dans l'environnement pour *M. avium*. La croissance de *M. avium* dans des amibes augmente ses capacités à envahir et à se répliquer dans des macrophages humains ainsi que sa virulence chez la souris indiquant que les amibes de l'environnement pourraient participer à la pathogénie de *M. avium*. De plus, cette croissance en amibes réduit l'efficacité des agents antimicrobiens (Miltner and Bermudez, 2000).

La levure encapsulée *Cryptococcus neoformans* est un organisme du sol qui est un pathogène intracellulaire facultatif bien qu'il ne dépende pas d'un hôte animal pour sa répllication. *C. neoformans* se réplique dans *A. castellanii* et échappe à la dégradation par *A. castellanii* par un mécanisme similaire à celui qu'il utilise pour survivre dans les macrophages. Cette répllication conduit à la mort de l'amibe.

Les résultats (Steenbergen et al., 2001) suggèrent que certains aspects de la virulence de ce champignon pour les cellules mammifères dérivent de mécanismes qu'il utilise pour survivre dans l'environnement en présence de prédateurs comme les amibes.

Par ailleurs, des levures comme *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae* sont tuées par *A. castellanii*. La première est un commensal humain qui n'a pas de réservoir dans l'environnement et la seconde est une souche de laboratoire (Steenbergen et al., 2001).

D'autres microorganismes pathogènes ont été isolés à partir d'amibes de l'environnement et appartiennent aux genres *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Burkholderia*, *Listeria* ou encore *Francisella* (Swanson and Hammer, 2000). Donc, les amibes de l'environnement ont un impact sur l'efficacité de la prophylaxie antimicrobienne et constituent une source de pathogènes opportunistes émergents.

Nos résultats indiquent que les protozoaires amibiens, du moins *A. castellanii*, ne semblent pas être des réservoirs naturels pour *Brucella*. Durant le cycle de vie de *Brucella*, l'étape au cours de laquelle *Brucella* est sous forme libre dans l'environnement est mal connue. On sait qu'elle peut y survivre (Garin-Bastuji, 1993) mais à notre connaissance, sa multiplication n'y a pas encore été étudiée.

Nos résultats indiquent également que le trafic intracellulaire de *Brucella* dans les cellules eucaryotes supérieures est différent de celui dans les amibes ou du moins dans *A.*

*castellanii* où *Brucella* ne semble pas capable d'échapper à la fusion phagolysosomale. Ceci peut s'expliquer par le fait que soit *Brucella* ne rencontre pas les signaux inducteurs indispensables à l'expression de ces gènes de virulence soit il n'y a pas de reconnaissance entre les facteurs de virulence de *Brucella* et les protéines ou autres constituants amibiens avec lesquels *Brucella* doit interagir pour échapper à la voie d'endocytose classique (constituants absents ou séquences/structures de ces derniers non conservées).

Cependant, d'autres candidats amibiens pourraient être testés puisque nous avons mis au point le protocole d'infection à suivre. Nous pensons à *D. discoïdeum* qui est une amibe très intéressante car elle est facilement manipulable d'un point de vue génétique. Cependant, il y a peu de chance que *Brucella* puisse s'y répliquer car sa machinerie phagocytaire serait plus agressive que celle d'*A. castellanii* (communication personnelle de M. Steinert, Würzburg, Institut für Molekulare Infektionsbiologie). Nous pouvons aussi tester la réplication de *Brucella* dans *H. vermiformis* qui est maintenant disponible au laboratoire.

Actuellement, les modèles utilisés pour étudier le trafic intracellulaire de *Brucella* sont :

- monocytes du sang périphérique humain ou bovin ainsi que les macrophages qui en dérivent
- les lignées de cellules phagocytaires professionnelles (macrophages bovins ou murins)
- les lignées de cellules phagocytaires non professionnelles (cellules HeLa ou Véro)
- une lignée de trophoblastes humains dans lesquels *Brucella* se réplique (résultat obtenu au laboratoire)
- les souris BALB/c

D'autres modèles pourraient être testés comme le nématode *Caenorhabditis elegans* ou une plante (*Arabidopsis thaliana* ou une plante hôte de *Rhizobium spp*) d'autant plus que *Brucella* appartient à la famille des *Rhizobiaceae* qui contient des microorganismes pathogènes et des symbiontes de plantes et que le génome de *Brucella*, comme nous l'avons décrit dans l'introduction, présente de nombreuses homologies avec celui de *Mesorhizobium loti*.

Dans le cadre de ce mémoire, nos résultats nous conduisent à interrompre les expériences avec le modèle amibien qui aurait pu permettre d'identifier des protéines eucaryotes intervenant dans le trafic intracellulaire de *Brucella*.

La dernière partie de ce travail est associée à l'étude d'un facteur bactérien nécessaire au trafic intracellulaire de *Brucella* dans les cellules eucaryotes supérieures.

### **III.3. Etude du rôle de VjbR dans la réplication intracellulaire**

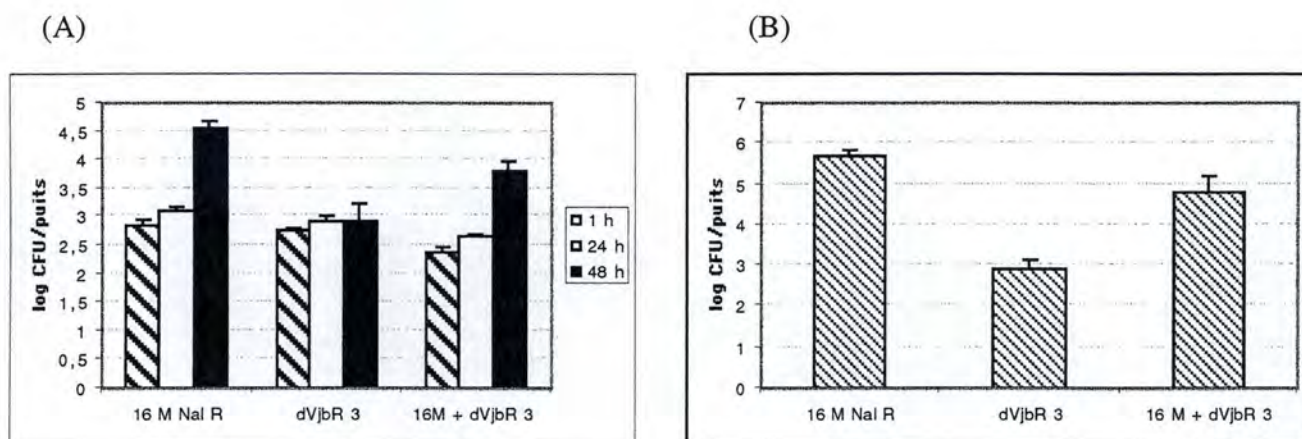
#### **III.3.1. Complémentation du délétant $\Delta vjbR3$ par la souche sauvage de *B. melitensis***

Le régulateur transcriptionnel VjbR a été identifié lors du criblage d'une banque de mutants transpositionnels à la recherche de mutants atténués dans les cellules HeLa (Delrue *et al.*, 2001). Le mutant *vjbR* est internalisé dans les cellules phagocytaires professionnelles et non professionnelles mais ne s'y réplique pas. L'étude du trafic intracellulaire de ce mutant dans les cellules HeLa montre qu'il n'atteint pas la vacuole de réplication de *B. melitensis* mais qu'il reste localisé dans un compartiment sec61 $\beta$  positif et LAMP1 positif qui aurait les caractéristiques d'un autophagosome (Delrue, 2002; Delrue *et al.*, 2001 ).

Le mutant  $\Delta vjbR3$  a été obtenu par délétion du gène *vjbR* dans la souche *B. melitensis* 16M. La séquence codante du gène *vjbR* est remplacée par un marqueur conférant la résistance à la kanamycine.

En réalisant une co-infection dans les macrophages bovins avec la souche sauvage et le délétant  $\Delta vjbR3$ , nous avons testé si la présence de la souche sauvage restaure la capacité de réplication du mutant dans les cellules.

En pratique, les macrophages bovins ont été infectés par la souche sauvage seule, par le mutant seul et par un mélange des deux souches en quantité égale. Les bactéries intracellulaires vivantes ont été dénombrées après 1, 24 et 48 heures d'infection (fig III.11.A). Dans les puits issus de la co-infection, afin de quantifier à la fois les bactéries mutantes et sauvages, on étale les dilutions en absence et en présence de kanamycine. Les deux types de clones poussent en absence d'antibiotique alors que seul le mutant est capable de croître en présence de kanamycine.



**Figure III.11** : Réplication intracellulaire de *B. melitensis* dans des macrophages bovins après 1, 24 et 48 heures d'infection en plaque 96 puits (A) et après 48 h d'infection en plaque 24 puits (B) par *B. melitensis* 16M NalR, le délétant *vjbR* (dVjbR3) ou un mélange en quantité égale de ces deux souches. Les résultats sont exprimés en logarithme de *Brucella* vivantes (CFU) par puits. Chaque point représente la moyenne de 4 ou 5 puits et l'écart-type est indiqué. Afin d'identifier les bactéries dVjbR3 dans les puits issus de la co-infection, les dilutions sont étalées en présence de kanamycine car seul le mutant est résistant à la kanamycine. Les colonnes 16M + dVjbR3 représentent le nombre de mutants obtenus après co-infection.

Comme R.-M. Delrue l'a décrit, on constate qu'après une heure d'infection, on dénombre autant de mutants que de sauvages, indiquant que le mutant  $\Delta vjbR3$  entre efficacement dans les cellules. Par contre, on n'observe pas de réplication de ce mutant après 48 heures.

Si on compare cette donnée avec les résultats obtenus en infectant les macrophages bovins avec un mélange des souches mutante et sauvage en quantité égale, on observe une réplication importante (1,4 log entre 1 h et 48 h) du mutant  $\Delta vjbR3$  en présence de la souche sauvage.

Ces résultats indiquent que la présence de la souche sauvage restaure la capacité de réplication du mutant  $\Delta vjbR3$  et donc complémente ce mutant.

### III.3.2. Discussion et perspectives

Comme cela a été décrit précédemment, nous avons observé que le mutant  $\Delta vjbR3$  est atténué en macrophages bovins. En effet, ce dernier est capable d'entrer dans les cellules phagocytaires mais est incapable de s'y répliquer car il n'atteint pas sa niche de réplication. Donc, le régulateur VjbR est essentiel à la maturation du phagosome contenant *Brucella* en une vacuole de réplication. Nous avons montré que la souche sauvage *B. melitensis* 16M sauve le délétant  $\Delta vjbR$  lors d'une co-infection.

Nos résultats pourraient être complétés par des expériences de microscopie à fluorescence. La co-infection serait réalisée avec la souche sauvage et le mutant  $\Delta vjbR3$

exprimant constitutivement la GFP. Après 48 h d'infection, les bactéries sauvages et mutantes sont marquées par immunofluorescence (anticorps primaire anti-LPS et anticorps secondaire couplé au Texas-Red), puis après fixation, les cellules sont observées au microscope. Il faut chercher les cellules contenant des amas de bactéries GFP (correspond au mutant  $\Delta vjbR3$  qui s'est répliqué) et vérifier la présence dans la même cellule de bactéries uniquement marquées au Texas-Red (correspond aux bactéries sauvages).

Nous constatons que la restauration de la réplication n'est pas totale. Au moins deux facteurs l'expliquent :

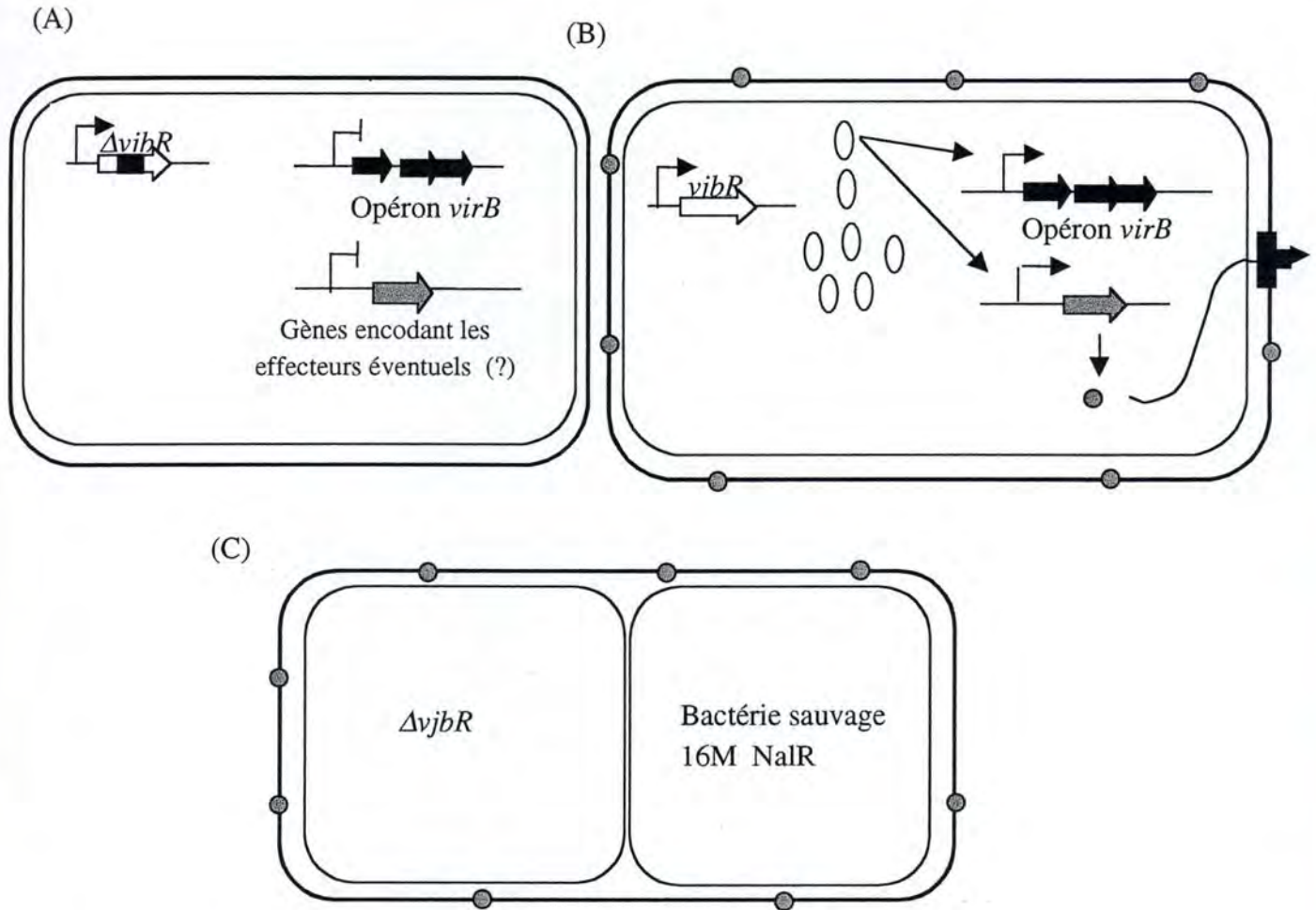
- L'internalisation d'au moins deux *Brucella* par cellule est un événement rare (Pizarro-Cerda *et al.*, 1998). Or, pour observer la restauration de la réplication, il faut qu'au moins une bactérie mutante et une bactérie sauvage se retrouvent dans la même cellule.
- De plus, pour pouvoir expliquer la complémentation, il faudrait que les deux bactéries soient dans le même phagosome. En effet, selon Naroeni (Naroeni *et al.*, 2001), l'inhibition de la fusion entre le phagosome contenant *Brucella* et le lysosome est due à la présence de facteurs inconnus dans la membrane de ce phagosome. Cette inhibition serait donc un phénomène local n'interférant pas avec le trafic intracellulaire normal. Dans ce contexte, la complémentation d'une souche mutante par la souche sauvage implique que les deux bactéries soient dans le même phagosome.

Après la co-infection, il faudrait visualiser les bactéries sauvages et mutantes GFP en microscopie à fluorescence afin de vérifier si le mutant se réplique dans un compartiment contenant aussi des bactéries sauvages. Une autre façon de faire est de vérifier si une internalisation synchrone du mutant et de la souche sauvage est nécessaire pour sauver le mutant (Coers *et al.*, 1999). Il serait également intéressant de caractériser par immunofluorescence le compartiment où se réplique le mutant et la souche sauvage par rapport à celui ne contenant que la souche sauvage.

Notre résultat est complémentaire de celui obtenu dans le cadre du mémoire de Sandrine Léonard (Léonard, 2000) ; elle a observé que la souche sauvage *B. melitensis* 16M sauve un mutant *virB2* de l'appareil de sécrétion de type IV. Rappelons que *VjbR* est un activateur transcriptionnel de l'opéron *virB* et que les mutants  $\Delta vjbR3$ , *virB2*, 4 et 9 ont le même trafic intracellulaire : ils évitent la voie d'endocytose classique et se localisent dans un compartiment qui a les propriétés d'un autophagosome. Ils ne savent pas « transformer » ce compartiment en vésicule de réplication (voir point I.3.5.1. b et c).

Pour expliquer que le mutant  $\Delta vjbR3$  soit sauvé par la souche sauvage, nous proposons l'hypothèse suivante (fig III.12). Le délétant  $\Delta vjbR3$  se retrouvant dans le même phagosome qu'une bactérie sauvage *B. melitensis* 16M profiterait, de manière passive, de l'établissement de la niche de réplication. En effet, dans la souche sauvage, le régulateur transcriptionnel

VjbR est opérationnel et activerait donc la transcription de l'opéron *virB*. La présence de l'appareil VirB dans l'enveloppe de la bactérie sauvage agirait de façon directe ou indirecte sur la membrane du phagosome pour en assurer la maturation en vésicule de réplication de *Brucella*.



**Figure III.12 :** Représentation schématique de la co-infection avec *ΔvjbR* et la souche sauvage *B. melitensis* 16M NalR. En (A), on représente le phagosome contenant *ΔvjbR*. L'opéron *virB* n'est pas transcrit car le régulateur VjbR est absent. Le délétant est donc incapable d'établir sa niche de réplication. En (B), on représente le phagosome contenant la souche sauvage *B. melitensis* 16M NalR. L'opéron *virB* et ces effecteurs hypothétiques sont transcrits par le régulateur VjbR. L'appareil de sécrétion de type IV est présent, l'hypothétique effecteur est représenté dans la membrane du phagosome et le compartiment contenant la bactérie peut maturer en vacuole de réplication. En (C), le délétant et la souche sauvage se retrouvent dans le même phagosome. Le délétant profite de l'expression de l'opéron *virB* et de ces effecteurs de la souche sauvage. Le délétant se retrouve donc dans une vacuole de réplication ; le délétant est sauvé par la souche sauvage.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement de cette niche via VirB sont inconnus mais nous suggérons que soit un composant de l'appareil VirB lui-même (VirB1, VirB2 ou VirB5 qui sont exposées en surface de la bactérie ou la lipoprotéine VirB12) soit un effecteur non identifié sécrété par VirB interagisse avec un constituant

cellulaire au niveau de la membrane du phagosome de *Brucella*. Nous envisageons quelques expériences pour tester ces hypothèses.

1- Tester la complémentation du mutant *vjbR3* par une souche morte. Si le passage du phagosome sec61 $\beta$  positif LAMP1 positif vers la vacuole de réplication nécessite l'activation d'un système comme VirB par exemple, la présence d'une bactérie morte ne devrait pas sauver le mutant.

2- Tester la complémentation du mutant *vjbR3* par un mutant *virB*. Si le mutant *virB* sauve le mutant *vjbR* alors la complémentation de *vjbR* par la souche sauvage implique un (des) autre(s) gène(s) régulés par *vjbR*, indépendants de VirB et à identifier. Si le mutant *virB* ne sauve pas le mutant *vjbR*, cela étayera notre hypothèse : *vjbR* et *virB* font partie du même processus qui intervient dans le passage du phagosome sec61 $\beta$  positif LAMP1 positif où sont bloqués les mutants vers la vacuole de réplication.

3- Tester la complémentation du mutant *vjbR* par un plasmide exprimant l'opéron *virB*. Nous avons, à cet effet, reçu de D. O'Callaghan un plasmide pBBR1MCS contenant la totalité de l'opéron *virB* de *B. suis* et exprimé sous la dépendance de son promoteur (plasmide pBBvirB ; (O'Callaghan *et al.*, 1999). Nous avons introduit ce plasmide dans le délétant  $\Delta vjbR3$  et réalisé des infections de macrophages bovins. D'après nos résultats préliminaires, la présence de ce plasmide ne semble pas sauver le mutant *vjbR*. Signalons ici que R. -M. Delrue a montré que le mutant *vjbR* est partiellement complémenté par un plasmide encodant le gène *vjbR* (Delrue, 2002). Dans notre expérience de complémentation, nous devons vérifier si l'opéron *virB* s'exprime grâce à des anticorps anti-VirB. Si les protéines VirB sont exprimées et que le mutant *vjbR* reste incapable de se répliquer, cela impliquera qu'il manque encore au moins un autre composant du système VjbR-VirB : il pourrait s'agir d'un effecteur sécrété par VirB. En effet, d'après la littérature, le régulateur d'un appareil de sécrétion régule également les effecteurs sécrétés par ce système. Dans ce cas, VjbR régulerait l'expression de VirB et de son (ses) éventuel(s) effecteur(s).

Pour en savoir plus sur les éventuels facteurs sécrétés par le système de sécrétion de type IV encodé par l'opéron *virB*, on pourrait réaliser deux types d'expériences :

- comparer les facteurs sécrétés (surnageant de culture) *in vitro* par la souche sauvage et par les mutants *virB* et *vjbR* dans des conditions d'expression de *virB* *in vitro* (par exemple phase stationnaire en milieu riche)

- isoler la vacuole de réplication contenant *Brucella* et procéder à des études protéomiques pour déterminer les protéines caractérisant cette vacuole. Ceci pourrait aussi conduire à l'identification de protéines de la cellule hôte avec lesquelles interagissent les effecteurs.

## IV. Conclusion

Nous présentons ici un court récapitulatif des différents résultats obtenus dans le cadre de ce mémoire.

Dans la première partie concernant l'influence du cholestérol sur l'internalisation de *B. melitensis*, la technique de dosage du cholestérol que nous avons utilisée ne permet pas de montrer une diminution du taux de cholestérol dans le lysat cellulaire suite au traitement avec la MCD. Cependant, dans la littérature, il est clairement démontré que la MCD séquestre le cholestérol membranaire (Christian et al., 1997; Ohtani et al., 1989; Kilsdonk et al., 1995). Dans nos expériences, nous avons montré que le traitement des macrophages bovins avec la MCD diminue l'internalisation de *B. melitensis* et que cet effet est réversible après 16 h d'incubation avec du milieu contenant du sérum.

La deuxième partie est la mise au point d'un modèle amibien, *A. castellanii*, pour l'étude du trafic intracellulaire de *Brucella*. Nous avons montré qu'*A. castellanii* n'est pas utilisable comme modèle de réplication intracellulaire de *B. melitensis*. En effet, les résultats de nos expériences montrent que *B. melitensis* est digérée par *A. castellanii*.

Pour terminer, nous avons étudié le rôle du régulateur transcriptionnel VjbR dans la réplication intracellulaire de *Brucella*. Nous observons une complémentation du délétant  $\Delta vjbR3$  par la souche sauvage de *B. melitensis* 16M NaIR lors d'une co-infection de macrophages bovins. Nous proposons que lorsque le délétant et la souche sauvage se retrouvent dans le même phagosome, le délétant profiterait passivement de l'établissement de la niche de réplication par la souche sauvage *B. melitensis* 16M grâce à un facteur activé par VjbR (fig III.12).

Les études concernant le trafic intracellulaire de *Brucella* sont très hétérogènes. En effet, les diverses équipes travaillent avec différentes espèces de *Brucella*, n'utilisent pas les mêmes modèles cellulaires (monocytes ou macrophages humains frais ou lignées de macrophages bovins, murins ou humains, cellules HeLa, ...), ni les mêmes méthodes (marqueurs et techniques différents, ...). Chaque équipe obtient donc des données différentes, parfois complémentaires mais parfois contradictoires de celles trouvées par les autres. Un travail de récapitulation des différents résultats obtenus serait le bienvenu.

Rittig (Rittig et al., 2001) a commencé ce travail en comparant l'entrée de *Brucella* dans les cellules phagocytaires professionnelles et non professionnelles (voir point I.3.4.2.). Pour cela, il applique les mêmes méthodes d'études et utilise la même souche de *Brucella* sur les différents types cellulaires.

Reprenons les différentes étapes de l'interaction de *Brucella* avec la cellule hôte en posant certaines questions non élucidées à l'heure actuelle.

Lors de l'internalisation de *Brucella*, quels sont les récepteurs et les ligands impliqués? Par quel(s) mécanisme(s) *Brucella* entre-t-elle dans les cellules phagocytaires professionnelles et non professionnelles ? Comment les « lipid rafts »/le cholestérol sont-ils impliqués ? Quels sont les facteurs bactériens utilisés pour envahir les cellules ? Quel composant de l'enveloppe impliqué dans l'invasion est régulé par BvrR/S ?

Lors des premières heures du trafic intracellulaire de *Brucella*, pourquoi survit-elle dans les phagosomes étroits et pas dans les phagosomes spacieux ? Comment fait-elle pour éviter la fusion phagolysosomale ? Quels sont les facteurs bactériens intervenant à ces différentes étapes ? Quel est l'effecteur sécrété par VirB qui intervient à cette étape et quelle est sa cible ? VjbR intervient-il à cette étape ? Comment les  $\beta$ -glucans cycliques interviennent-ils ?

Lors de l'établissement de la niche de réplication, quelles sont les caractéristiques morphologiques et biochimiques de cette niche ? Cette niche de réplication est-elle la même dans tous les types cellulaires ? Quelles sont les étapes précises de maturation du phagosome en niche de réplication ? Quel signal active le régulateur VjbR : le stress nutritionnel, le pH acide, la densité bactérienne ? Est-ce que VjbR régule aussi d'autres facteurs de virulence ? Quels sont les effecteurs de VirB intervenant à cette étape ? VirB12 est-il un de ces effecteurs ? Quelles sont la ou les cibles cellulaires des facteurs bactériens ?

Par rapport à la pertinence physiologique, en quoi ces résultats sont-ils représentatifs de la vie intracellulaire de *Brucella* en cas de brucellose humaine chronique ou d'infection du placenta chez une génisse gestante, par exemple ?

## V. Matériel et méthodes

### V.1. Souches bactériennes et cellules eucaryotes

#### V.1.1. les souches bactériennes

##### V.1.1.1. E. coli S17-1

La souche d'*E. coli* S17-1 est résistante à la streptomycine (SmR), à la spectinomycine (SpR) et au triméthoprim (TpR) et est cultivée dans du milieu LB. Cette souche d'*E. coli* possède notamment la caractéristique intéressante suivante ;

RP4+ : les gènes du plasmide RP4 intégré dans le chromosome bactérien permettent le transfert conjugatif d'un plasmide mobilisable (contenant une origine de transfert) de la bactérie S17-1 vers une bactérie receveuse.

##### V.1.1.2. Brucella melitensis 16M

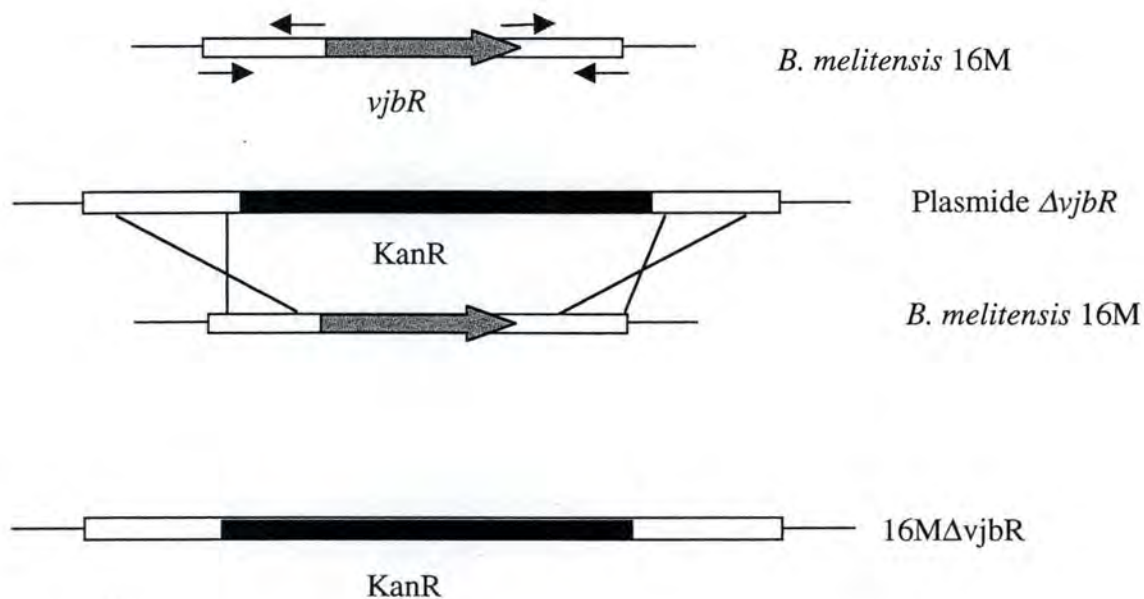
La souche de *B. melitensis* 16M est représentative de l'espèce *B. melitensis* et appartient au biovar 1 de cette espèce. Cette souche *B. melitensis* 16 M NalS a été isolée et stockée en 1955.

Il existe aussi une souche *B. melitensis* 16M NalR qui est un mutant spontané résistant à l'acide nalidixique (Nal<sup>R</sup>) obtenu au laboratoire.

Ces deux souches ont un phénotype lisse et l'agglutination se produit en présence d'un sérum anti-M.

Toutes les souches de *Brucella* ont été cultivées sur milieu solide ou liquide 2YT.

Dans ce mémoire, nous utilisons le délétant  $\Delta vjbR$  qui est construit suite au remplacement du gène encodant VjbR par une cassette de résistance à la kanamycine (fig V.1).



**Figure V.1 :** schéma du génome du délétant  $\Delta vjbR3$ . Le gène encodant le régulateur transcriptionnel VjbR dans le génome de *B. melitensis* 16M est remplacé par une cassette de résistance à la kanamycine.

## V.1.2. les cellules eucaryotes

### V.1.2.1. lignée de macrophages bovins

Cette lignée de macrophages bovins péritonéaux immortalisés a été fournie par le laboratoire de Adams, Texas, USA (R. Stabel, 1995).

Les macrophages bovins sont cultivés dans du RPMI + 10% de Fœtal Calf Serum (FCS) ou dans du DMEM + 10% FCS.

### V.1.2.2. Acanthamoeba castellanii

Les *Acanthamoeba* sont des amibes c'est-à-dire des protozoaires regroupés sous le terme de « free-living amoeba ». Cette dénomination n'a rien à voir avec la taxonomie, il s'agit simplement de former un groupe hétérogène d'organismes partageant les mêmes biotopes. Ces organismes sont reliés sur la base d'une ressemblance morphologique et comportementale plus que sur la base d'un lien phylogénétique.

Dans ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressées à *Acanthamoeba castellanii*. Ces amibes colonisent les milieux terrestres et aquatiques. On les retrouve dans les piscines, les réserves d'eau, les conduits de ventilation, le sol, l'air, ...

Il a été démontré que de nombreuses amibes de type « free-living » sont associées à des bactéries. Certaines de ces bactéries sont strictement inféodées au milieu intracellulaire

amibien et ne peuvent donc pas être cultivées en dehors de ces amibes (Winiecka-Krusnell et Linder, 2001; Niederkorn et al., 1999). Les *A. castellanii* sont cultivées dans du milieu Ac.

## **V.2. le plasmide pBB4**

L'introduction de ce plasmide dans la souche *B. melitensis* y entraîne l'expression constitutive de la GFP (« Green Fluorescent Protein »). En effet, ce plasmide contient le gène de la *gfpmut3a* sous le contrôle du promoteur *plac*.

La GFP est une protéine qui adopte une structure en tonneau  $\beta$  renfermant un chromophore, excité par une longueur d'onde de 395nm et émettant à une longueur d'onde d'environ 510nm. Elle est encodée par le gène *gfp*, présent naturellement chez certains animaux marins tels que les Cnidaires.

Au laboratoire, nous disposons d'une forme mutée de ce gène, *gfpmut3a*, qui a pour différence majeure par rapport à la forme sauvage d'encoder une protéine excitable à une longueur d'onde plus élevée, soit 488nm, et pour laquelle le chromophore se forme plus rapidement (Cormack *et al.*, 1996). Ces caractéristiques nous permettent d'utiliser la GFP comme marqueur visualisable au microscope confocal et au microscope à fluorescence.

## **V.3. les milieux de culture**

### **V.3.1. Milieu Luria Bertani (LB)**

Forme liquide : - Hydrolysate de caséine (peptone) 10g/L.

- NaCl 5g/L.

- Yeast extract 5g/L.

Le milieu est autoclavé 20 minutes à 120°C.

Forme solide : LB liquide additionné de 12g/L d'agar avant autoclavage.

### **V.3.2. Milieu 2YT**

Forme liquide : - mix pour LB liquide 20g/L

- Hydrolysate de caséine (peptone) 6g/L

- Yeast extract 5g/L

Le milieu est autoclavé 20 minutes à 120°C.

Forme solide : 2YT liquide additionné de 1g/L d'agar avant autoclavage.

### **V.3.3. Solutions stocks d'antibiotiques**

On peut compléter les milieux liquides ou solides (LB ou 2YT) avec des antibiotiques. Dans ce cas, il faut attendre que le milieu autoclavé refroidisse de manière à pouvoir le prendre en main avant d'ajouter les antibiotiques voulus.

Antibiotique	Concentration solution stock (mg/ml)	A suspendre dans	Concentration standard utilisée (µg/ml)
Acide nalidixique/ Nal	25	Eau	25
Ampicilline/Amp	50	Eau	50
Chloramphénicol/Cm	30	Ethanol	30
Gentamycine	50	Eau	50
Kanamycine/Kan	25	Eau	25

#### V.3.4. Milieu RPMI 1640

Milieu riche (RPMI 1640 + 25mM Hepes buffer + L-glutamine) pour culture de cellules eucaryotes commercialisé par Invitrogen life technologies (Cat n° 52400-025). Nous y ajoutons 10% de Fœtal Calf Serum (FCS) dont le complément est inactivé (30 min à 56°C) suivant l'expérience réalisée.

#### V.3.5. Milieu DMEM

Milieu riche (DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) + 0,11g/L Na Pyr pyridoxine) pour culture de cellules eucaryotes commercialisé par Invitrogen life technologies (Cat n° 41966-029). Nous y ajoutons 10% de FCS dont le complément est inactivé (30 min à 56°C) suivant l'expérience réalisée.

#### V.3.6. Milieu Ac

Ce milieu s'appelle ATCC Culture Medium 712 PYG.

Milieu de base : - proteose peptone (Difco 0120), 20,0g  
 - extrait de levures, 1,0g  
 - agar, 20,0g (si l'on désire un milieu solide)

Eau distillée, 950,0ml

Il faut préparer et stériliser les constituants suivants séparément et les ajouter au milieu de base indiqué ci-dessus pour éviter des problèmes de précipitation ;

- 0,4 M MgSO<sub>4</sub>. 7 H<sub>2</sub>O, 10,0ml
- 0,05 M CaCl<sub>2</sub>, 8,0ml
- 0,1 M Sodium citrate. 2H<sub>2</sub>O, 34,0ml
- 0,005 M Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O, 10,0ml
- 0,25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 10,0ml
- 0,25 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10,0ml

Ajuster le pH à 6,5 et autoclaver pendant 25 minutes à 121°C.

Ajouter du glucose 2 M, 50,0ml de manière stérile.

Dans ce mémoire, nous avons aussi utilisé le tampon Ac qui provoque une condition de famine chez *Acanthamoeba*. Cette dernière est tout de même capable de survivre 72 à 104 h dans ce tampon (Cirillo *et al.*, 1994).

Le tampon Ac est constitué de sels : il s'agit de milieu Ac dépourvu du milieu de base et de glucose.

#### **V.4. Transformation**

La transformation de bactéries compétentes consiste à faire entrer de l'ADN exogène (plasmide) dans le microorganisme.

##### **V.4.1. Préparation de cellules *E. coli* compétentes**

- A partir d'une colonie d'*E. coli*, ensemencer 10ml de LB + antibiotique. Agiter fortement la préculture à 37°C pendant une nuit.

- A partir de cette préculture, ensemencer 100ml de LB + antibiotique. Incuber à 37°C sous agitation jusqu'à une absorbance d'environ 0,3 à 550nm (début de phase de croissance exponentielle).

- Arrêter la croissance dans la glace pendant 10 minutes.

- Centrifuger la culture 15 minutes à 3000 rpm à 4°C (JOUAN). Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 1/2 volume de CaCl<sub>2</sub> 50 mM. Répéter cette étape une seconde fois.

- Laisser la solution 20 minutes sur glace puis centrifuger 15 minutes à 3000 rpm (JOUAN) à 4°C.

- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de solution froide de CaCl<sub>2</sub> 50 mM glycérol 15% équivalent au dixième du volume initial.

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

##### **V.4.2. Transformation des cellules compétentes**

- A 100µl de cellules compétentes, ajouter <1 à 10ng d'ADN plasmidique.

- Déposer 30 min sur glace.

- Choc thermique de 2 minutes à 42°C.

- Ajouter 500µl de LB liquide (sans antibiotique).

- Incuber de 30 min. à 1 heure à 37°C.

- Etaler la suspension bactérienne sur milieu sélectif et incuber une nuit à 37°C.

- Mettre à 4°C

#### **V.5. Conjugaison**

La conjugaison entre bactéries Gram-négatives est un transfert horizontal de matériel génétique. La bactérie donneuse (*E. coli*) transfère un plasmide conjugatif vers la bactérie receveuse (*Brucella*). La conjugaison se fait grâce à un contact entre bactéries. La souche donneuse (*E. coli* S17-1) code pour les protéines nécessaires au transfert conjugatif.

### Jour -2

- Ensemencer, dans 5ml de 2YT, une préculture de la souche de *Brucella* receveuse à partir d'une culture fraîche sur milieu solide. Agiter à 37°C pendant 1 jour.

- idem pour *E. coli*

### Jour -1

- Prendre 1ml de préculture de *Brucella* pour ensemencer 9ml de 2YT liquide contenant de l'acide nalidixique.

- Ensemencer 10ml de LB liquide avec les souches d'*E. coli* S17.

- Laisser pousser sous agitation à 37°C pendant 1 jour

### Jour 0

-Avant la conjugaison, laver les bactéries pour éliminer les antibiotiques du milieu de culture en centrifugeant 15 minutes à 2500 rpm (JOUAN) et resuspendre le culot bactérien dans 1/10 du volume de la culture de départ dans du milieu sans antibiotique.

-Placer un filtre stérile 0,22µm de 40mm de diamètre sur une boîte de pétri contenant du 2YT, y déposer 100µl de culture de *B. melitensis* et 100µl d'*E. coli* S17 lavées et resuspendues.

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

-Incuber au moins 1 heure à 37°C.

-Récupérer les bactéries sur le filtre dans 1ml de milieu et réaliser des dilutions de 10<sup>-1</sup> et 10<sup>-2</sup> si le plasmide est répliatif chez *Brucella*.

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

-Incuber 3-4 jours à 37°C.

## **V.6. Electroporation**

L'électroporation est une méthode de transformation des bactéries, où le taux de survie et le taux de transformation bactérienne dépendent de l'intensité et de la durée du choc électrique.

### Jour -3

-Ensemencer les souches de *Brucella* à électroporer dans 5ml de 2YT liquide et les mettre sous agitation à 37°C.

### Jour -2

-Etaler les différentes souches impliquées sur des boîtes 2YT agar.

### Jour 0

-Déposer 1,5ml d'eau stérile froide sur les boîtes contenant les bactéries et racler avec une anse de manière à solubiliser la culture bactérienne dans cette eau.

-Récupérer la suspension bactérienne avec un tips et la mettre dans un falcon de 50ml.

- Centrifuger 15 minutes à 4000 rpm à 4°C (JOUAN).
- Retirer délicatement le surnageant avec un tips et resuspendre le culot dans 1ml d'eau stérile froide et centrifuger 15 minutes à 4000 rpm à 4°C (JOUAN). Réaliser cette étape 3 fois.
- Retirer le surnageant et mettre 100µl d'eau stérile froide/électroporation à réaliser.
- Placer dans une cuvette d'électroporation (0,2cm) stérile et froide (sur glace), 3µg d'ADN plasmidique et y ajouter 100µl de cellules compétentes.
- Placer la cuvette dans l'électroporateur (BIO RAD Gene Pulser<sup>TM</sup>).
- Régler l'appareil sur:
  - \* capacitance 25 µF
  - \* résistance 200 Ohms
  - \* différence de potentiel 22,5 Kv/cm
- Faire le choc électrique.
- Ajouter rapidement 500µl de 2YT liquide et homogénéiser avec un tips.
- Transférer le contenu de la cuvette dans un tube de 50ml sous agitation à 37°C et incubé 3 h.
- Etaler sur milieu sélectif (100 à 250 µl/boîte) et incubé à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

### **V.7. Infection de macrophages bovins avec Brucella**

Les macrophages bovins sont cultivés soit dans du DMEM + FCS 10% soit dans un milieu RPMI 1640 + FCS 10%. La culture est réalisée à 37°C dans des flasques F75 (Nunc) .

#### Jour -1

\*Pour les cellules eucaryotes:

- Éliminer le milieu (DMEM + FCS 10% ou le milieu RPMI + FCS10%).
- Rincer.
- Détacher le tapis cellulaire en ajoutant 7ml de trypsine-EDTA diluée 3x dans du PBS stérile. Laisser agir 5 à 10 minutes à 37°C. Utiliser la solution suivante :
  - trypsine 5g/L
  - EDTA 2g/L
  - NaCl 8,5g/L
- Stopper la réaction en ajoutant du milieu additionné de FCS.
- Centrifuger à 1000 rpm pendant 10 minutes (JOUAN).
- Éliminer le surnageant et resuspendre le culot cellulaire dans 1ml de milieu.
- Effectuer un comptage du nombre de cellules grâce à une cellule de Thoma.
- Diluer la suspension cellulaire de façon à obtenir 1,5.10<sup>5</sup> cellules /ml.
- 100µl de cette dilution soit 1,5.10<sup>4</sup> cellules, sont déposés par puits d'une plaque multipuits ( 96 puits, Nucleon).

\*Pour les bactéries:

-Ensemencer les souches de *Brucella* à tester dans 5ml de 2YT, mettre à 37°C sous agitation.

#### Jour 0

-Déterminer le nombre de bactéries par mesure de la DO ( $DO_{600nm} 1=1,8.10^9$  bactéries/ml).

-Amener à une dose infectante (DI) de 300 bactéries par cellule eucaryote, soit  $4,5.10^7$  bactéries/ml dilué dans le milieu de culture des cellules.

-Eliminer le milieu des puits à infecter et remplacer par 100µl de la dilution bactérienne. Infecter au moins 3 puits par souche.

-Centrifuger 10 minutes à 1200 rpm (JOUAN).

-Incuber 1 heure à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

-Laver 2 fois avec 100µl du milieu.

-Eliminer le milieu et ajouter 200µl de milieu + gentamycine (50µg/ml) afin d'éliminer les bactéries extracellulaires (correspond au temps 0).

-Incuber 1 h à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

\*dénombrement des bactéries intracellulaires :

-Eliminer le milieu de culture.

-Laver 2 fois avec 200µl de PBS.

-Au temps post-infection désiré (1, 24 ou 48 h), les cellules eucaryotes sont lysées en ajoutant 200µl de PBS + TritonX100 0,1% pendant 10 minutes.

-Le lysat est dilué de 10 en 10 jusqu'à la dilution  $10^{-3}$  à  $10^{-5}$  en fonction du temps p.i. 20µl de chaque dilution est étalée sur milieu 2YT agar.

-Après 3 jours d'incubation à 37°C, les colonies sont dénombrées et correspondent au CFU (« colony forming unit »). On réalise un calcul de moyenne pondérée pour quantifier le nombre de CFU/puits.

\*quantification de la DI (dose infectante) :

-La solution bactérienne utilisée pour l'infection est diluée de 10 en 10 et 20µl des dilutions  $10^{-3}$  à  $10^{-6}$  sont déposés sur milieu 2YT agar (on laisse couler les gouttes sur les grandes boîtes carrées).

-Incuber à 37°C pendant 3-4 jours.

-Dénombrer les CFU.

En cas de co-infection, il faut que chacune des deux souches impliquées soit à une D.I. de 300 bactéries/cellules et le dénombrement se fait à la fois sur milieu non sélectif et sur milieu contenant de la kanamycine (pour différencier les souches sauvage et mutante).

## V.8. Cholestérol : dosage et effet sur l'internalisation de *B. melitensis*

### V.8.1. La méthyl- $\beta$ -cyclodextrine

La méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (MCD) est un oligosaccharide cyclique constitué de sept unités  $\beta$ -1,4-glucopyranoses. La surface externe de cette molécule est hydrophile tandis que l'intérieur est hydrophobe. Cette cavité interne possède la capacité d'enfermer des composés insolubles et de les rendre solubles en solution aqueuse.

Il faut savoir que les  $\beta$ -cyclodextrines possèdent une grande affinité pour les stérols par rapport à d'autres lipides. La MCD est capable de séquestrer le cholestérol membranaire en l'enfermant à l'intérieur de sa « cage » hydrophile en surface et hydrophobe en son centre (Christian et al., 1997; Neufeld et al., 1996; Ohtani et al., 1989).

La toxicité due à l'exposition à la MCD ne se marque qu'après de long temps d'incubation (8 h) à des concentrations en MCD élevées (20 mM) (Kilsdonk *et al.*, 1995).

Dans ce mémoire, nous avons utilisé la MCD dans le but de diminuer la quantité de cholestérol au niveau de la membrane plasmique des cellules à infecter et d'examiner l'effet de cette diminution sur l'internalisation de *Brucella*. Pour cela, nous utilisons un stock de MCD 500 mM dilué dans de l'eau ( produit SIGMA n°C-4555 ).

### V.8.2. Effet du traitement à la MCD sur la quantité de cholestérol

Le dosage du cholestérol se fait au moyen d'un kit de dosage commercialisé par Sigma diagnostics (Kit 1 est le n°352 et Kit 2 est le n°352-7).

- Falcon de 75cm<sup>2</sup> de cellules à confluence (au moins 8.10<sup>6</sup> cellules par ml) car ce test est peu sensible.

- 2 lavages avec 20ml pour les essais n°1 et 2 et 15ml pour l'essai n°3 de DMEM sans FCS (=foetal calf serum).

- Mettre 15ml de MCD à 0, 2,5, 5 ou 10 mM (les dilutions sont préparées dans du DMEM sans FCS).

- Incuber 1 h à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub>.

- 2 lavages avec 15ml de DMEM sans FCS.

- Détacher les cellules avec un policeman et mettre dans un falcon de 50 ml.

- Ajouter du PBS 1 fois pour obtenir 50ml au total.

- Centrifuger 10 min à 1200 rpm (JOUAN), vider le surnageant et resuspendre doucement dans 50 ml de PBS. Répéter deux fois cette étape.

- Centrifuger 10 min à 1200 rpm (JOUAN).

- Vider le surnageant et resuspendre doucement dans 500 $\mu$ l de PBS-0,1 % Triton-X-100 pour l'essai n°1 et dans 500 $\mu$ l de PBS pour les essais n°2 et 3 et mettre les eppendorfs sur glace.

- Soniquer 3 fois 15 sec à 4°C.

- Préparer les tubes pour le dosage :

\* 1ml de réactif + 10 $\mu$ l de PBS = BLANC

\* 1ml de réactif + 10 $\mu$ l d'étalon = ETALON

\* 1ml de réactif + 50µl d'essai

- Mélanger doucement en inversant les eppendorfs.
- Incuber 5 min à 37°C.
- Lire la densité optique (D.O.) au spectrophotomètre à 500nm.
- Appliquer la formule suivante pour déterminer la concentration du cholestérol dans

l'échantillon

$$[\text{cholestérol}] = (\text{Atest} - \text{Ablanc} / \text{Aétalon} - \text{Ablanc}) \times [\text{étalon}]$$

### V.8.3. Effet du traitement à la MCD sur l'infection par *Brucella*

#### Jour -1

\*Pour les cellules eucaryotes: Procéder comme au point V. 7. Mais les cellules sont cultivées en plaques 24 puits à raison de  $7,5 \cdot 10^4$  cellules/puits.

\*Pour les bactéries: Ensemencer la souche de *B. melitensis* 16M NaIS dans 5ml de 2YT, mettre à 37°C sous agitation.

#### Jour 0

-Déterminer le nombre de bactéries par mesure de la DO ( $DO_{600nm} 1 = 1,8 \cdot 10^9$  bactéries/ml).

-Amener à une dose infectante (DI) de 300 bactéries par cellule eucaryote, soit  $9 \cdot 10^7$  bactéries/ml dilué dans du milieu DMEM sans FCS.

-Laver 2 fois les cellules avec 1ml de DMEM sans FCS.

-Remplacer par 250µl de DMEM sans FCS + MCD à 0, 2,5, 5 ou 10 mM (3 puits par condition).

-Incuber 30 ou 60 minutes à 37°C et de 5% de CO<sub>2</sub>.

-Laver 2 fois les cellules avec 1ml de DMEM sans FCS.

-Infecter avec 250µl de la dilution bactérienne.

-Centrifuger 10 minutes à 1200 rpm (JOUAN).

-Incuber 1 heure à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

- Laver 2 fois avec 1ml de DMEM sans FCS ou de PBS.

-Éliminer le milieu et ajouter 500µl de DMEM + FCS 10% + gentamycine (50mg/ml) afin d'éliminer les bactéries extracellulaires (correspond au temps 0).

-Incuber 1 h à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> et dénombrer les bactéries intracellulaires vivantes comme indiqué au point V.7. avec un volume de lyse de 500µl par puits.

Pour la quantification de la DI procéder comme au point V.7.

## V.9. Infection d'*A. castellanii* avec *Brucella*

### Jour -1

\*Pour les cellules eucaryotes:

-La culture des amibes se fait dans du milieu Ac dans des Flacon F80 sous agitation lente pour éviter que les amibes n'adhèrent au flacon et à température ambiante (environ 25°C).

-Procéder à 2 passages par semaine dont un la veille de l'infection.

\*Pour les bactéries:

-Ensemencer les souches de *B. melitensis* 16M dans 5ml de 2YT, mettre à 37°C sous agitation.

### Jour 0

Pour *A. castellanii* :

-Récupérer les amibes du Falcon 75cm<sup>2</sup> dans lequel elles sont cultivées en les vidant dans un falcon de 50ml.

-Centrifuger 10 minutes à 1200 rpm (JOUAN).

-Vider le surnageant et resuspendre le culot dans 5ml de tampon Ac ou de milieu Ac.

-Compter le nombre d'amibes à l'aide de la cellule de Thoma.

-Diluer dans le tampon Ac ou le milieu Ac de manière à obtenir 2.10<sup>5</sup> amibes /ml.

-Distribuer dans une plaque 24 puits à raison de 1ml par puits.

-Incuber pendant 2 h à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

Pour l'infection :

-Déterminer le nombre de bactéries par mesure de la DO (DO<sub>600nm</sub> 1=1,8.10<sup>9</sup> bactéries/ml).

-Amener à une dose infectante (DI) de 300 bactéries par cellule eucaryote, soit 3.10<sup>8</sup> bactéries/ml dilué dans du tampon Ac ou du milieu Ac.

-Éliminer le milieu et infecter les amibes avec 200µl de bactéries par puits.

-Centrifuger 10 minutes à 1200 rpm (JOUAN).

-Incuber 1 heure à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

-Laver 2 fois avec 1ml de tampon Ac ou de milieu Ac chaud (mis à 37°C).

-Éliminer le milieu et ajouter 1ml de tampon Ac + gentamycine (50mg/ml) ou 1ml de milieu Ac + gentamycine afin d'éliminer les bactéries extracellulaires (correspond au temps 0).

-Incuber 1 h à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> et dénombrer les bactéries intracellulaires vivantes comme indiqué au point V.7. avec un volume de lyse de 500µl par puits.

Pour la quantification de la DI, procéder comme au point V.7.

### **V.10. Coloration Rouge Congo d'*A. castellanii***

Cette coloration permet de différencier les amibes mortes des autres. C'est donc une coloration vitale (John, 1997)

- Gratter et détacher les amibes d'un puits à l'aide d'un tips.
- Mettre 40  $\mu$ l de surnageant de ce puits et 40  $\mu$ l de Rouge Congo dans un eppendorf.
- Laisser incuber 10 min à température ambiante.
- Compter les amibes mortes (rougeâtre) et les amibes vivantes (bleuâtre).

### **V.11. Observation de l'émission de la fluorescence par la protéine GFP en microscopie à fluorescence**

L'infection des cellules se fait comme au point V.7. Les cellules sont, cependant, cultivées sur des coverslips (stérilisés 20 min à 180°C) en plaque 24 puits.

Les cellules sont fixées (et les bactéries sont inactivées) avec du paraformaldéhyde 4%.

-Enlever le milieu des puits de la plaque 24 puits et ajouter 500 $\mu$ l de PBS paraformaldéhyde 4% pendant 20 minutes à température ambiante.

-Remplacer par 500 $\mu$ l de PBS (on peut sortir du P.3).

-Remplacer par 500 $\mu$ l d'une solution de PBS-TritonX100 0,1%-BSA 2% pendant 5 à 10 minutes à température ambiante.

-Déposer 25 $\mu$ l d'anticorps anti-LPS de *Brucella* (anticorps de chèvre) dilué 2000 fois dans PBS-TritonX100 0,1%-BSA 2% sur un parafilm se trouvant dans une chambre noire et humidifiée avec la solution de PBS-TritonX100 0,1%-BSA 2%.

-Retourner les coverslips (c'est-à-dire cellules vers le bas) sur les gouttes d'anticorps et attendre 45 minutes.

-Laver 3 fois avec du PBS.

-Déposer 25 $\mu$ l d'anticorps secondaire (anti-anticorps de chèvre couplé au Texas-red) dilué 200 fois dans PBS-TritonX100 0,1%-BSA 2% sur un parafilm se trouvant dans une chambre noire et humidifiée avec la solution de PBS-TritonX100 0,1%-BSA 2%.

- Retourner les coverslips (c'est-à-dire cellules vers le bas) sur les gouttes d'anticorps et attendre 45 minutes.

- Laver 3 fois avec du PBS.

-Monter les coverslips (cellules vers le bas) sur des lames avec du Mowiol chauffé.

-Incuber une nuit à l'obscurité et à température ambiante.

Les lames sont observées au microscope à fluorescence avec une lumière d'excitation de 488nm, longueur d'onde d'excitation optimale pour la GFPmut3a.

*Solution de paraformaldéhyde 4%*

-Faire chauffer 80ml de PBS puis y ajouter 4g de paraformaldéhyde sous hotte.

-Chauffer jusqu'à dissolution puis ajouter 100 $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub> 100mM et 100 $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 100mM.

-Laisser refroidir.

-Mettre à pH 7,5 et ajuster le volume à 100ml avec du PBS.

-Aliquoter par 5ml et stocker à -20°C. Une fois décongelé, la solution de paraformaldéhyde ne peut pas être recongelée.

## Bibliographie

- Aderem, A., et Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17, 593-623.
- Allen, C. A., Adams, L. G., et Ficht, T. A. (1998). Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infect Immun* 66, 1008-16.
- Anderson, R. G. (1998). The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67, 199-225.
- André, I. (1995). Conformation and dynamics of a cyclic (1-2)-b-d-glucan. *Int. J; Biol. Macromol.* 17, 189-198.
- Arenas, G. N., Staskevich, A. S., Aballay, A., et Mayorga, L. S. (2000). Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect Immun* 68, 4255-63.
- Bavoil, V. C. C. a. P. M. (1997). Measurement of invasion by gentamycine resistance. In *Bacterial pathogenesis*, A. press, ed.
- Boschioli, M. L., Foulongne, V., et O'Callaghan, D. (2001). Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* 4, 58-64.
- Boschioli, M. L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Allardet-Servent, A., Cazevieille, C., Liautard, J. P., Ramuz, M., et O'Callaghan, D. (2002). The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1544-9.
- Braun, L., et Cossart, P. (2000). Interactions between *Listeria monocytogenes* and host mammalian cells. *Microbes Infect* 2, 803-11.
- Brees (1996). Alpha 5/béta 1 integrin mediates *Brucella abortus* strain RB51 adhesion on bovine trophoblastic cells. *Vet. pathol.* 33, 615.
- Briones, G., Inon de Iannino, N., Roset, M., Vigliocco, A., Paulo, P. S., et Ugalde, R. A. (2001). *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect Immun* 69, 4528-35.
- Campbell. (1995). *Biologie: De boeck université*.
- Chen, Y. A., et Scheller, R. H. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 98-106.
- Christian, A. E., Haynes, M. P., Phillips, M. C., et Rothblat, G. H. (1997). Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res* 38, 2264-72.
- Christie, P. J., et Vogel, J. P. (2000). Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol* 8, 354-60. \_00001792 \_00001792.
- Cirillo, J. D., Cirillo, S. L., Yan, L., Bermudez, L. E., Falkow, S., et Tompkins, L. S. (1999). Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 67, 4427-34.
- Cirillo, J. D., Falkow, S., et Tompkins, L. S. (1994). Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect Immun* 62, 3254-61.
- Coers, J., Monahan, C., et Roy, C. R. (1999). Modulation of phagosome biogenesis by *Legionella pneumophila* creates an organelle permissive for intracellular growth. *Nat Cell Biol* 1, 451-3.
- Comerci, D. J., Martinez-Lorenzo, M. J., Sieira, R., Gorvel, J. P., et Ugalde, R. A. (2001). Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol* 3, 159-68.

Cormack, B. P., Valdivia, R. H., et Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-8.

D.A.Brown (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual reviews Cell Dev. Biol.* 14, 111-136.

Delrue, R. M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J. P., et Letesson, J. J. (2001). Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol* 3, 487-97.

Delrue, R.-M. (2002). Contribution à l'analyse de mécanismes moléculaires impliqués dans le trafic intracellulaire de *B. melitensis* 16M. In URBM (Namur: Facultés universitaires Notre-Dame de la paix).

DelVecchio, V. G., Kapatral, V., Redkar, R. J., Patra, G., Mujer, C., Los, T., Ivanova, N., Anderson, I., Bhattacharyya, A., Lykidis, A., Reznik, G., Jablonski, L., Larsen, N., D'Souza, M., Bernal, A., Mazur, M., Goltsman, E., Selkov, E., Elzer, P. H., Hagius, S., O'Callaghan, D., Letesson, J. J., Haselkorn, R., Kyrpides, N., et Overbeek, R. (2002). The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 443-8.

Dermine, J. F., Duclos, S., Garin, J., St-Louis, F., Rea, S., Parton, R. G., et Desjardins, M. (2001). Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J Biol Chem* 276, 18507-12.

Desjardin, M. (1995). Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. *Trends in cell biology* 5, 183-186.

Desjardins, M., Huber, L. A., Parton, R. G., et Griffiths, G. (1994). Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol* 124, 677-88.

Detilleux, P. G., Deyoe, B. L., et Cheville, N. F. (1990). Entry and intracellular localization of *Brucella* spp. in Vero cells: fluorescence and electron microscopy. *Vet Pathol* 27, 317-28.

Detilleux, P. G., Deyoe, B. L., et Cheville, N. F. (1991). Effect of endocytic and metabolic inhibitors on the internalization and intracellular growth of *Brucella abortus* in Vero cells. *Am J Vet Res* 52, 1658-64.

Duclos, S. (2000). Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens. *Cellular Microbiology* 2, 365-377.

Ernst, J. D. (2000). Bacterial inhibition of phagocytosis. *Cell Microbiol* 2, 379-86.

Essig, A., Heinemann, M., Simnacher, U., et Marre, R. (1997). Infection of *Acanthamoeba castellanii* by *Chlamydia pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* 63, 1396-9.

Fielding, C. J., et Fielding, P. E. (2001). Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol. *Adv Drug Deliv Rev* 49, 251-64.

Finlay, B. B., et Cossart, P. (1997). Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 276, 718-25.

Garin-Bastuji, B. (1993). Brucelloses bovine, ovine et caprine: contrôle et prévention. *Point vétérinaire* 25, 107-114.

Garner, M. J., Hayward, R. D., et Koronakis, V. (2002). The *Salmonella* pathogenicity island 1 secretion system directs cellular cholesterol redistribution during mammalian cell entry and intracellular trafficking. *Cell Microbiol* 4, 153-65.

Gatfield, J., et Pieters, J. (2000). Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science* 288, 1647-50.

Godfroid, F., Taminau, B., Danese, I., Denoel, P., Tibor, A., Weynants, V., Cloeckert, A., Godfroid, J., et Letesson, J. J. (1998). Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella*

melitensis 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. *Infect Immun* 66, 5485-93.

Gorvel, J. P., et Meresse, S. (2001). Maturation steps of the *Salmonella*-containing vacuole. *Microbes Infect* 3, 1299-303.

Gruenberg, J. (2001). The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 721-30.

Gruenberg, J., et Maxfield, F. R. (1995). Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol* 7, 552-63.

Guzman-Verri, C., Chaves-Olarte, E., von Eichel-Streiber, C., Lopez-Goni, I., Thelestam, M., Arvidson, S., Gorvel, J. P., et Moreno, E. (2001). GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes: direct activation of Cdc42. *J Biol Chem* 276, 44435-43.

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

Halling, S. M. (1998). On the presence and organization of open reading frames of the nonmotile pathogen *Brucella abortus* similar to class II, III, and IV flagellar genes and to LcrD virulence superfamily. *Microb Comp Genomics* 3, 21-9.

Henderson, B. (1999). Cellular microbiology. Bacterial host interaction in health and disease, J. W. a. Sons, ed. (New-York).

Hong, P. C., Tsolis, R. M., et Ficht, T. A. (2000). Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infect Immun* 68, 4102-7.

Howe, D., et Mallavia, L. P. (2000). *Coxiella burnetii* exhibits morphological change and delays phagolysosomal fusion after internalization by J774A.1 cells. *Infect Immun* 68, 3815-21.

Ikonen, E. (2001). Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 13, 470-7.

Inon, N. (1998). Molecular cloning and characterization of *cgs*, the *Brucella abortus* cyclic b(1-2) glucan synthetase gene: genetic complementation of *Rhizobium meliloti* *ndvB* and *Agrobacterium tumefaciens* *chvB* mutants. *Journal of bacteriology* 180, 4392-4400.

Jadot, M., Andrianaivo, F., Dubois, F., et Wattiaux, R. (2001). Effects of methylcyclodextrin on lysosomes. *Eur J Biochem* 268, 1392-9.

John, D. T. J. a. R. A. (1997). Mortality of mice inoculated with cryopreserved *Naegleria fowleri*. *Proc. Okla. Acad. Sci.* 77, 35-38.

Journet, A., Chapel, A., Jehan, S., Adessi, C., Freeze, H., Klein, G., et Garin, J. (1999). Characterization of *Dictyostelium discoideum* cathepsin D. *J Cell Sci* 112, 3833-43.

Kilsdonk, E. P., Yancey, P. G., Stoudt, G. W., Bangerter, F. W., Johnson, W. J., Phillips, M. C., et Rothblat, G. H. (1995). Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem* 270, 17250-6.

Kohler, S., Layssac, M., Naroeni, A., Gentschev, I., Rittig, M., et Liautard, J. P. (2001). Secretion of listeriolysin by *Brucella suis* inhibits its intramacrophagic replication. *Infect Immun* 69, 2753-6.

Kurzchalia, T. V. (1999). Membrane microdomains and caveolae. *Current opinion in cell biology* 11, 424-431.

Lauer, S., VanWye, J., Harrison, T., McManus, H., Samuel, B. U., Hiller, N. L., Mohandas, N., et Haldar, K. (2000). Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. *Embo J* 19, 3556-64.

Léonard, S. (2000). Etude de l'implication du système de sécrétion de type IV de *Brucella melitensis* dans son trafic intracellulaire. In URBM (Namur: Facultés universitaires Notre-Dame de la paix).

Liautard, J. P., Gross, A., Dornand, J., et Kohler, S. (1996). Interactions between professional phagocytes and *Brucella* spp. *Microbiologia* 12, 197-206.

Matveev, S. (2001). The role of caveolae and caveolin in vesicle-dependent and vesicle-independent trafficking. *Advanced drug delivery reviews* 49, 23250.

May, R. C., et Machesky, L. M. (2001). Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 114, 1061-77.

Mayer, A. (2001). What drives membrane fusion in eukaryotes? *Trends Biochem Sci* 26, 717-23.

Meresse, S., Steele-Mortimer, O., Moreno, E., Desjardins, M., Finlay, B., et Gorvel, J. P. (1999). Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death. *Nat Cell Biol* 1, E183-8.

Miltner, E. C., et Bermudez, L. E. (2000). *Mycobacterium avium* grown in *Acanthamoeba castellanii* is protected from the effects of antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1990-4.

Moffat, J. F., et Tompkins, L. S. (1992). A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun* 60, 296-301.

Moreno, E., et Moriyon, I. (2002). *Brucella melitensis*: A nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1-3.

Naroeni, A., et Porte, F. (2002). Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infect Immun* 70, 1640-4.

Naroeni, A., Jouy, N., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J. P., et Porte, F. (2001). *Brucella suis*-impaired specific recognition of phagosomes by lysosomes due to phagosomal membrane modifications. *Infect Immun* 69, 486-93.

Neufeld, E. B., Cooney, A. M., Pitha, J., Dawidowicz, E. A., Dwyer, N. K., Pentchev, P. G., et Blanchette-Mackie, E. J. (1996). Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin. *J Biol Chem* 271, 21604-13.

Nichols, B. J., et Lippincott-Schwartz, J. (2001). Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* 11, 406-12.

Niederhorn, J. Y., Alizadeh, H., Leher, H., et McCulley, J. P. (1999). The pathogenesis of *Acanthamoeba keratitis*. *Microbes Infect* 1, 437-43.

Nishi, T., et Forgac, M. (2002). The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 94-103.

O'Callaghan, D., Cazeville, C., Allardet-Servent, A., Boschioli, M. L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y., et Ramuz, M. (1999). A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol Microbiol* 33, 1210-20.

Ohtani, Y., Irie, T., Uekama, K., Fukunaga, K., et Pitha, J. (1989). Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur J Biochem* 186, 17-22.

P.Cossart, G. T. V. N. (2001). Détournement de fonctions cellulaires clés par les bactéries pathogènes. *médecine/sciences* 17, 701-11.

Parton, R. G. (2001). Cell biology. Life without caveolae. *Science* 293, 2404-5.

Pieters, J. (2001). Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect* 3, 249-55.

Pieters, J. (2001). Evasion of host cell defense mechanisms by pathogenic bacteria. *Curr Opin Immunol* 13, 37-44.

Pieters, J., et Gatfield, J. (2002). Hijacking the host: survival of pathogenic mycobacteria inside macrophages. *Trends Microbiol* 10, 142-6.

Pizarro-Cerda, J., Meresse, S., Parton, R. G., van der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goni, I., Moreno, E., et Gorvel, J. P. (1998). *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* 66, 5711-24.

Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., et Gorvel, J. P. (2000). Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microbes Infect* 2, 829-35.

Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., Sanguedolce, V., Mege, J. L., et Gorvel, J. P. (1998). Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect Immun* 66, 2387-92.

Porte, F., Liautard, J. P., et Kohler, S. (1999). Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun* 67, 4041-7.

Pukatzki, S., Kessin, R. H., et Mekalanos, J. J. (2002). The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3159-64.

R.Stabel, J. (1995). Immortalisation and characterisation of bovine peritoneal macrophages transfected with SV 40 plasmid DNA. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 45, 211-220.

Rittig, M. G., Alvarez-Martinez, M. T., Porte, F., Liautard, J. P., et Rouot, B. (2001). Intracellular survival of *Brucella* spp. in human monocytes involves conventional uptake but special phagosomes. *Infect Immun* 69, 3995-4006.

Rittig, M. G., Wilske, B., et Krause, A. (1999). Phagocytosis of microorganisms by means of overshooting pseudopods: where do we stand? *Microbes Infect* 1, 727-35.

Robibaro, B., Stedman, T. T., Coppens, I., Ngo, H. M., Pypaert, M., Bivona, T., Nam, H. W., et Joiner, K. A. (2002). *Toxoplasma gondii* Rab5 enhances cholesterol acquisition from host cells. *Cell Microbiol* 4, 139-52.

Rosenberger, C. M., Brumell, J. H., et Finlay, B. B. (2000). Microbial pathogenesis: lipid rafts as pathogen portals. *Curr Biol* 10, R823-5.

Samuel, B. U., Mohandas, N., Harrison, T., McManus, H., Rosse, W., Reid, M., et Haldar, K. (2001). The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection. *J Biol Chem* 276, 29319-29.

Sanchez, D. O., Zandomeni, R. O., Cravero, S., Verdun, R. E., Pierrou, E., Faccio, P., Diaz, G., Lanzavecchia, S., Agüero, F., Frasch, A. C., Andersson, S. G., Rossetti, O. L., Grau, O., et Ugalde, R. A. (2001). Gene discovery through genomic sequencing of *Brucella abortus*. *Infect Immun* 69, 865-8.

Shin, J. S., et Abraham, S. N. (2001). Caveolae as portals of entry for microbes. *Microbes Infect* 3, 755-61.

Shin, J. S., et Abraham, S. N. (2001). Cell biology. Caveolae--not just craters in the cellular landscape. *Science* 293, 1447-8.

Shin, J. S., et Abraham, S. N. (2001). Co-option of endocytic functions of cellular caveolae by pathogens. *Immunology* 102, 2-7.

Shin, J. S., et Abraham, S. N. (2001). Glycosylphosphatidylinositol-anchored receptor-mediated bacterial endocytosis. *FEMS Microbiol Lett* 197, 131-8.

Sieira, R., Comerci, D. J., Sanchez, D. O., et Ugalde, R. A. (2000). A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *J Bacteriol* 182, 4849-55.

Smith, L. D. (1990). Pathogenesis of *Brucella*. *Microbiology* 17.

Sola-Landa, A., Pizarro-Cerda, J., Grillo, M. J., Moreno, E., Moriyon, I., Blasco, J. M., Gorvel, J. P., et Lopez-Goni, I. (1998). A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol* 29, 125-38.

Solomon, J. M., et Isberg, R. R. (2000). Growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*: a novel system for genetic analysis of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol* 8, 478-80.

Steenbergen, J. N., Shuman, H. A., et Casadevall, A. (2001). *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15245-50.

Swanson, M. S., et Hammer, B. K. (2000). *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol* 54, 567-613.

Taminiau, B., Daykin, M., Swift, S., Boschioli, M. L., Tibor, A., Lestrade, P., De Bolle, X., O'Callaghan, D., Williams, P., et Letesson, J. J. (2002). Identification of a Quorum-Sensing Signal Molecule in the Facultative Intracellular Pathogen *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 70, 3004-3011.

Tibor, A. (1999). Caractérisation de trois protéines de la membrane externe de *Brucella abortus*. In *Facultés des sciences vétérinaires (Namur: Facultés universitaires Notre-Dame de la Paix)*.

Tilney, L. G., Harb, O. S., Connelly, P. S., Robinson, C. G., et Roy, C. R. (2001). How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *J Cell Sci* 114, 4637-50.

Ugalde, R. A. (1999). Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. *Microbes Infect* 1, 1211-9.

Underhill, D. M., et Ozinsky, A. (2002). PHAGOCYTOSIS OF MICROBES: Complexity in Action. *Annu Rev Immunol* 20, 825-52.

Winiecka-Krusnell, J., et Linder, E. (2001). Bacterial infections of free-living amoebae. *Res Microbiol* 152, 613-9.

Xu, S., Cooper, A., Sturgill-Koszycki, S., van Heyningen, T., Chatterjee, D., Orme, I., Allen, P., et Russell, D. G. (1994). Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-infected macrophages. *J Immunol* 153, 2568-78.

Zerial, M., et McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 107-17.