



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude de l'expression de gènes flagellaires chez *Brucella melitensis* 16M

Pierard, Valérie

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

**Etude de l'expression de gènes flagellaires chez *Brucella melitensis*
16M**

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

Valérie PIERARD

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>

Etude de l'expression de gènes flagellaires chez *Brucella melitensis* 16M

PIERARD Valérie

Résumé

Les bactéries du genre *Brucella* sont des organismes pathogènes décrits comme non mobiles. Cependant, d'après les données génomiques, ces bactéries possèdent 28 gènes homologues à des gènes flagellaires. Les conditions d'expression, la régulation et la fonction de ces gènes sont encore inconnues. Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence, chez *B. melitensis*, l'expression des protéines FliC (flagelline) et FlgE (monomère du hook) composant les parties distales des structures flagellaires chez les autres bactéries flagellées. La régulation de l'expression du gène *fliF*, impliqué dans la virulence de *Brucella*, a été étudiée grâce à deux approches : une approche avec *a priori* et une approche sans *a priori*. L'approche réalisée avec *a priori* nous a permis, grâce à un système rapporteur, d'identifier un facteur intervenant dans la régulation du gène *fliF*. Nous avons également testé la reconnaissance de la protéine FliF par des anticorps hétérologues dirigés contre FliF de *Caulobacter crescentus*. Le principe de l'approche réalisée sans *a priori* consistait à évaluer l'induction du promoteur de *fliF* grâce à un système rapporteur dans des souches contenant une banque surexprimant des ORF's de *Brucella*.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2002

Promoteur : J.-J. Letesson

Avant tout, je remercie le Professeur Jean-Jacques Letesson de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Un grand merci à mon vénérable tuteur. On dit que la patience est une vertu ; chez toi c'est une seconde nature. Merci pour ta disponibilité et ton humour décapant ainsi que pour ton calme surhumain devant mon stress démesuré et mon immense incompétence en informatique. Merci pour le temps que tu as consacré à la correction de mon travail. « Faire et défaire, c'est toujours travailler ». Je crois que j'ai compris le sens profond de ce petit dicton pendant mon mémoire ! PS : n'oublie pas notre deal concernant la correction orthographique de ta thèse ! Je sais, je prends des risques.

Je remercie le Professeur Jean Vandenhautte, Maxime Wéry, Jacques Godfroid et Olivier Maudoux pour leur lecture critique de ce travail.

Je remercie particulièrement Valoche (non Valérie !) pour son optimisme quasi pathologique et sa constante bonne humeur. Merci à Amé pour son soutien dans les moments difficiles. Merci à Garçon pour sa bonne humeur et pour ses précieux conseils sur les dosages et leurs affreux calculs (ça y est tu l'as eu ton bébé ! !). Merci à Nat pour son aide (je te dédie le protocole du disrupteur) et pour sa bonne humeur (et bonjour au Nain). Merci à Régis pour son précieux coup de main, à Marie, à Calou, à Stéphanie, à Chantal, à Anne, à Rose-May, à Etienne,... et tous les autres. Merci aussi aux généticiens. Merci à Vincent pour ses réponses à mes quelques rares questions (comme promis, je te dédie mes pages de garde !), à Sophie pour son aide et son soutien lors de la dernière ligne droite, merci à Max pour ses blagues (celle sur les œufs, je la ressortirai !), merci à Ben pour son aide pour mes quelques western blots et à tous les autres généticiens.

Un grand merci au Professeur Xavier De Bolle pour sa disponibilité sans limite et sa bonne humeur coutumière.

Un grand merci à tous mes compagnons de galère. Merci à Marie pour sa disponibilité, son matelat et son soutien dans tous les moments de craquage (oui je sais ça fait beaucoup). Merci à GG, ma sœur de fous rires, de poulet aigre-doux, de cierges (cfr les moments désespérés), de bides (mais là tu me bats à plates coutures), de vendanges et j'en passe. Merci à Caro B.. Il faudra qu'on se refasse une chasse à la mouche ! Merci à tous les autres : Allan (avec deux L sinon il peut pas voler !), Sarah, Gladys, Augustina (on va manger une pitta ?), Caro N., Mélanie et Françoise. Un grand merci à mes amis d'URBC (Fof, Céline, Aline,...et les autres).

Un grand merci à mes parents pour leur soutien (ils en ont vu de toutes les couleurs !), à mes deux sœurs, à mon petit frère, à mon petit fien, à ma marraine et toute sa petite famille.

Un merci tout particulier à mes grands-parents qui m'ont accueillie chez eux pendant quatre ans, qui m'ont supportée avec beaucoup de patience, et tout et tout. Merci à Pituw d'avoir subi mes sautes d'humeur, ma mine de cadavre et tout le reste.

Un grand merci à *Brucella* et à *E. coli* pour leur participation non négligeable à la réalisation de ce travail.

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
bp	Base paire (paire de base)
BSA	Bovine serum albumine
CAP	catabolite activator protein
CAT	chloramphenicol acetyltransferase
dNTP	Désoxyribonucléotide tri-phosphate
DO	Densité optique
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
GFP	green fluorescent protein
IM	inner membrane
IPTG	Isopropyl β -D-Thiogalactoside
Kan	kanamycine
Kb	Kilobase
Kd	Kilodalton
MCS	Multi cloning site (site multiple de clonage)
Nal ^R	résistant à l'acide nalidixique
OM	outer membrane
PCR	Polymerase chain reaction
SPI	Salmonella pathogenicity island
STM	Signature tagged mutagenesis
TBS	Tris buffer saline
Temed	N, N, N', N' tetramethylethyldiamin
Yop	<i>Yersinia</i> outer membran protein

AVANT-PROPOS.....	1
INTRODUCTION.....	2
1. LE FLAGELLE.....	3
1.1. Généralités sur le flagelle.....	3
1.2. Description du système flagellaire.....	3
1.2.1. Le corps basal.....	4
1.2.2. Le hook.....	7
1.2.3. Le filament.....	8
1.3. La biogenèse du flagelle.....	8
1.3.1. Biogenèse proprement dite.....	8
1.3.2. Régulation de la biogenèse.....	10
1.3.3. Le flagelle chez une α -protéobactérie, <i>Caulobacter crescentus</i>	11
1.4. Les rôles du flagelle.....	13
1.4.1. Rôle du flagelle dans la mobilité.....	14
1.4.2. Au cours du cycle infectieux.....	17
2. L'APPAREIL DE SÉCRÉTION DE TYPE III.....	19
2.1. Généralités sur le type III.....	19
2.2. Structure de l'appareil de sécrétion de type III.....	20
2.3. L'appareil de sécrétion proprement dit.....	20
2.4. Les protéines translocatrices.....	23
2.5. Les protéines effectrices.....	23
3. MÉTARÉGULATION DE L'APPAREIL FLAGELLAIRE.....	24
3.1. Régulation de la biogenèse flagellaire par la protéine CAP.....	24
3.2. Régulation de la biogenèse flagellaire par le cycle cellulaire.....	25
3.3. Influence du quorum sensing sur les gènes flagellaires.....	26
3.4. Influence de l'environnement sur les gènes flagellaires.....	26
4. BRUCELLA SPP.....	27
4.1. La brucellose.....	27
4.2. Description de <i>Brucella</i>	27
4.3. Taxonomie.....	27
4.4. Génétique.....	28
4.5. Trafic intracellulaire.....	28
4.6. Les facteurs de virulence.....	29
4.7. Les gènes flagellaires chez <i>Brucella</i>	31
OBJECTIFS.....	33
RÉSULTATS.....	36
1. ÉTUDE DE L'EXPRESSION DE LA FLAGELLINE (FLIC) ET DU MONOMÈRE DU HOOK (FLGE).....	37
1.1. Etude de l'expression de la flagelline (FliC) et du monomère du hook (FlgE) dans une souche de <i>B. melitensis</i> 16M.....	37
1.1.1. Objectifs.....	37
1.1.2. Réalisation des extraits protéiques.....	37
1.1.3. Résultats des western blots.....	38
1.1.4. Conclusions.....	39
1.2. Etude de l'expression de la flagelline et du monomère du hook dans une souche de <i>B. melitensis</i> 16M disruptée dans le gène fliF.....	39
1.2.1. Objectifs.....	39
1.2.2. Résultats du western blots.....	39
1.2.3. Conclusions.....	40

1.3. Conclusions générales	40
2. ETUDE DE L'EXPRESSION DE <i>FLIF</i> AVEC À PRIORI.....	41
2.1. Postulat.....	41
2.2. Le système rapporteur: le plasmide <i>pBBRI-GFP-CAT</i>	43
2.2.1 Description du plasmide.....	43
2.2.2. Objectif	45
2.2.3. Constructions du plasmide <i>pBBRI-GFP-CAT fliFp</i>	45
2.2.4. Evaluation de l'expression des gènes rapporteurs	50
2.3. Détection de la protéine <i>FliF</i> par western blot.....	53
2.3.1. Objectifs.....	53
2.3.2. Souches utilisées.....	53
2.3.3. Résultats du Western Blot.....	54
2.3.4. Conclusions.....	56
3. RECHERCHE D'UN RÉGULATEUR DU GÈNE <i>FLIF</i> SANS A PRIORI	56
3.1 Principe	56
3.2. Description du plasmide <i>pMR10</i>	59
3.3. Constructions du plasmide <i>pMR10-GFP-CAT</i>	59
3.3.1. Constructions	59
3.3.2. Restrictions diagnostiques.....	60
3.4. Les tests sur chloramphénicol	61
3.5. Conclusions	61
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	62
MATÉRIEL ET MÉTHODES	66
1. SOUCHES BACTÉRIENNES ET PLASMIDES.....	67
1.1. Souches bactériennes	67
1.1.1. <i>E.coli</i> DH10B	67
1.1.2. <i>E.coli</i> S17.....	67
1.1.3. <i>Brucella</i> sp.....	67
1.2. Plasmides.....	68
1.2.1. <i>pBBRI-GFP</i>	68
1.2.2. <i>pMR10</i>	68
1.2.3. <i>pGEM-T Easy</i> (Promega)	68
1.2.4. <i>pSK-oriT</i>	69
2. MILIEUX DE CULTURE UTILISÉS ET ANTIBIOTIQUES.....	69
2.1. Milieu <i>Luria Bertani (LB)</i>	69
2.2. Milieu <i>2YT</i>	69
2.3. Les antibiotiques	69
3. MANIPULATIONS RELATIVES À L'ADN.....	70
3.1. Extraction d'ADN plasmidique.....	70
3.1.1. Minipréparations sur <i>E. coli</i>	70
3.1.2. Minipréparations sur <i>Brucella</i>	71
3.1.3. Midipréparations sur <i>E. coli</i>	71
3.2. Purification d'ADN.....	72
3.2.1. Extraction d'ADN au phénol/chloroforme.....	72
3.2.2. Précipitation à l'éthanol	73
3.2.3. Purification de fragments d'ADN extraits d'un gel d'agarose.....	73
3.3. Méthodes d'analyse de l'ADN.....	74
3.3.1. Le séquençage.....	74
3.3.2. Electrophorèse en gel d'agarose	75
3.4. Autres techniques	76
3.4.1. La réaction de ligation.....	76

3.4.2. Amplification de gènes par PCR	76
3.4.3. Restriction d'ADN	77
4. MANIPULATIONS RELATIVES AUX BACTÉRIES	78
4.1. Manipulations relatives à <i>E. coli</i> : transformation $CaCl_2$	78
4.1.1. La préparation de cellules $CaCl_2$ compétentes.....	78
4.1.2. La transformation de cellules compétentes	79
4.2. Manipulations relatives à <i>Brucella</i>	79
4.2.1. La conjugaison.....	79
4.2.2. L'électroporation	80
4.2.3. Observation de <i>Brucella</i> en microscopie à fluorescence.....	81
4.2.4. La coloration de Gram.....	81
4.2.5. Test de séro-agglutination.....	82
4.2.6. Test blanc bleu.....	83
5. MANIPULATIONS RELATIVES AUX PROTÉINES	83
5.1. Préparation d'extraits protéiques totaux	83
5.1.1. Inactivation de bactéries en phase de latence et en phase stationnaire	83
5.1.2. Disruption de cellules.....	84
5.1.3. Dosage protéique.....	85
5.2. Le western blot	86
5.2.1. Electrophorèse en gel polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE).....	86
5.2.2. Transfert sur membrane de nitrocellulose (Western-Blot).....	88
5.2.3. Immunodétection.....	89
BIBLIOGRAPHIE	92

Avant-propos

La mobilité bactérienne fut observée pour la première fois en 1676 par Antonie Van Leeuwenhoek. Beaucoup d'espèces bactériennes sont capables de déplacement orienté. Il existe 2 types de modalité de locomotion:

- La locomotion dépendante de flagelles. Elle dépend d'appendices pariétaux nommés flagelles. Notons aussi que certaines bactéries (spirochètes) possèdent plusieurs filaments axiaux situés entre la paroi et la membrane plasmique et s'enroulant autour de la cellule.
- La locomotion indépendante du flagelle. Des bactéries sécrètent des substances tensioactives et se déplacent grâce à un mouvement de glissement provoqué par des corpuscules basaux semblables à ceux du flagelle (gliding/twitching motility).

Dans notre étude, nous nous intéresserons uniquement aux bactéries flagellées. Celles-ci utilisent leur appendice flagellaire pour se déplacer vers des niches favorables ou pour s'éloigner des niches défavorables.

Chez les bactéries pathogènes, le flagelle joue un rôle dans le cycle infectieux de la bactérie et intervient donc dans la virulence de celle-ci.

Dans notre laboratoire, nous étudions les mécanismes moléculaires impliqués dans la virulence des bactéries du genre *Brucella*. Cette bactérie est décrite comme non mobile. Cependant, différentes études ont démontré la présence de gènes flagellaires dans son génome. D'autres analyses ont montré l'implication d'un de ces gènes (*fliF*) dans la virulence de *Brucella*. Dans cette étude, nous nous intéresserons donc à l'expression et à la régulation de ces gènes flagellaires.

Introduction

1. Le flagelle

1.1. Généralités sur le flagelle

Le flagelle est une structure hélicoïdale ancrée dans la membrane bactérienne. Cet appendice, animé de mouvements rotatoires, permet à la bactérie de se mouvoir en réponse à la perception d'un stimulus chimique. Ce processus est appelé chémotactisme.

Beaucoup de bactéries, qu'elles soient commensales, pathogènes ou symbiotiques sont flagellées. En fonction du nombre et de la localisation du flagelle, on distingue les bactéries monotriches qui ne disposent que d'un appendice flagellaire souvent situé à l'extrémité de la cellule, comme c'est le cas pour *Caulobacter crescentus* et *Campylobacter jejuni*. La flagellation péritriche caractérise les bactéries portant des flagelles répartis sur tout leur pourtour, comme c'est le cas pour *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli*. Les bactéries lophotriches possèdent une touffe de flagelles à l'une ou l'autre extrémité cellulaire, comme c'est le cas pour *Spirillum* spp. (Moens, 1996).

Dans les paragraphes suivants, nous décrirons la structure complète du flagelle, les différentes étapes de sa biogenèse, sa régulation ainsi que les rôles de cette structure. La structure flagellaire est la mieux décrite et la plus étudiée chez la bactérie gram négative péritriche *E. coli* (Macnab, 1996). C'est pourquoi nous nous focaliserons sur l'appareil flagellaire de cette bactérie pour décrire les points précités.

1.2. Description du système flagellaire

Le flagelle est composé de plusieurs parties : un corps basal inséré dans les différentes enveloppes bactériennes, un hook et un filament (figure 1).

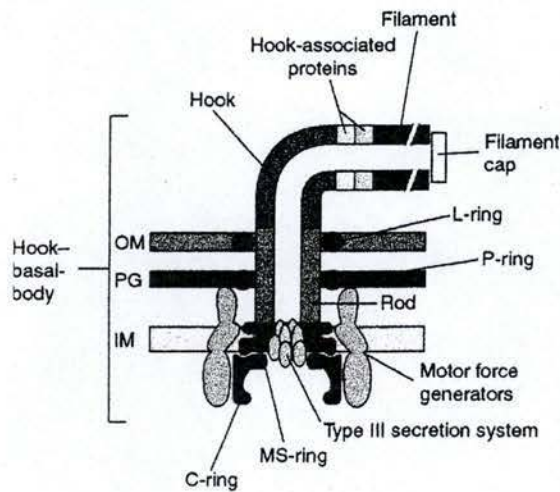


Figure 1 : représentation schématique de la structure flagellaire.
 Le flagelle est composé de plusieurs parties : le corps basal, le hook et le filament.
 (d'après Aldridge, 2002)

1.2.1. Le corps basal

Le corps basal comprend une tige centrale, quatre anneaux protéiques et un appareil de sécrétion.

1.2.1.1 La tige centrale

La tige centrale est une structure creuse de nature protéique qui traverse la membrane interne et la membrane externe. Elle est constituée d'une partie distale résultant de l'assemblage d'un monomère (FlgG) et d'une partie proximale, composée de trois protéines différentes (FlgB, FlgC et FlgF). Le rôle de cette structure est de transmettre le mouvement rotatoire généré par les protéines MotA et MotB (décrites ci-dessous) jusqu'aux structures externes, c'est-à-dire le hook et le filament (Macnab, 1996).

1.2.1.2. Les anneaux MS et C

Parmi les quatre anneaux protéiques, un se trouve au niveau de la membrane cytoplasmique (anneau MS), un au niveau de la face cytoplasmique de la membrane bactérienne (anneau C), un au niveau de la couche de peptidoglycane (anneau P) et un au niveau de la membrane externe (anneau L).

L'anneau MS résulte de l'assemblage d'un monomère (la protéine FliF). En microscopie électronique, cette structure semble constituée de deux anneaux distincts qui ne sont en réalité que les domaines d'une seule et même protéine (FliF) (figure 2).

Comme mentionné précédemment, l'anneau MS se trouve ancré dans la membrane interne de la bactérie. Il joue un rôle de support pour les composants de l'anneau C, situé au niveau de la face cytoplasmique de la membrane bactérienne, et pour les autres composants du flagelle. Cet anneau C comprend les protéines responsables du sens de rotation du flagelle (FliG, FliM et FliN). Ces trois protéines interagissent avec FliF. Leur rôle sera décrit ultérieurement (Macnab, 1996).

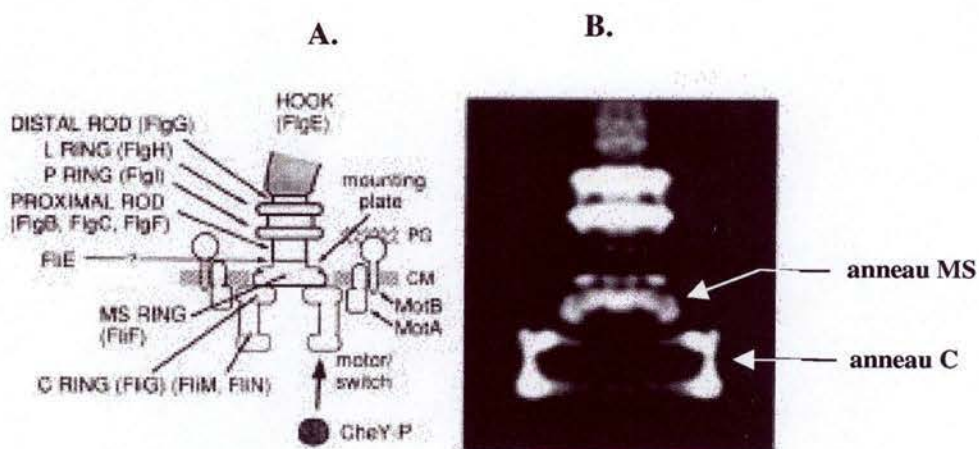


Figure 2 A. représentation schématique du corps basal.

B. image du corps basal prise en microscopie électronique. Cette structure semble constituée de deux anneaux distincts qui ne sont en réalité que les domaines d'une seule et même protéine (FliF). (d'après Macnab, 1996)

1.2.1.3. Les protéines Mot

Au niveau de la membrane interne se trouvent MotA et MotB qui sont les protéines motrices du flagelle. En effet, une mutation dans un de ces deux gènes a pour conséquence la paralysie du flagelle (Macnab, 1996). L'énergie qui permet la rotation de cette structure provient d'une force proton motrice, générée par ces deux protéines.

1.2.1.4. L'appareil d'exportation

L'anneau MS possède en son centre un pore d'environ 10 nm dans lequel se loge un système de sécrétion dont le rôle est d'exporter les composants du reste de la structure (tige centrale, anneaux P et L, hook et filament). Les protéines qui composent ce système possèdent des homologies de séquence avec celles composant l'appareil de sécrétion de type III qui permet aux bactéries pathogènes d'exporter des facteurs de virulence.

Cet appareil de sécrétion flagellaire se compose de huit protéines différentes (figure 3) :

- FlhA et FlhB sont deux protéines intégrées en membrane jouant un rôle dans la spécificité des substrats exportés de manière séquentielle par l'appareil de sécrétion flagellaire. FlhA possède un domaine cytoplasmique interagissant avec l'anneau C.
- FliI est une ATPase fournissant l'énergie nécessaire à l'exportation des protéines flagellaires. Cette protéine est associée à FlhA.
- FliO, FliP, FliQ et FliR sont des protéines membranaires, étroitement associées au corps basal. Les substrats traversent la membrane à travers un complexe formé par ces quatre protéines et par les domaines transmembranaires des protéines FlhA et FlhB (Minamino and Macnab, 1999).

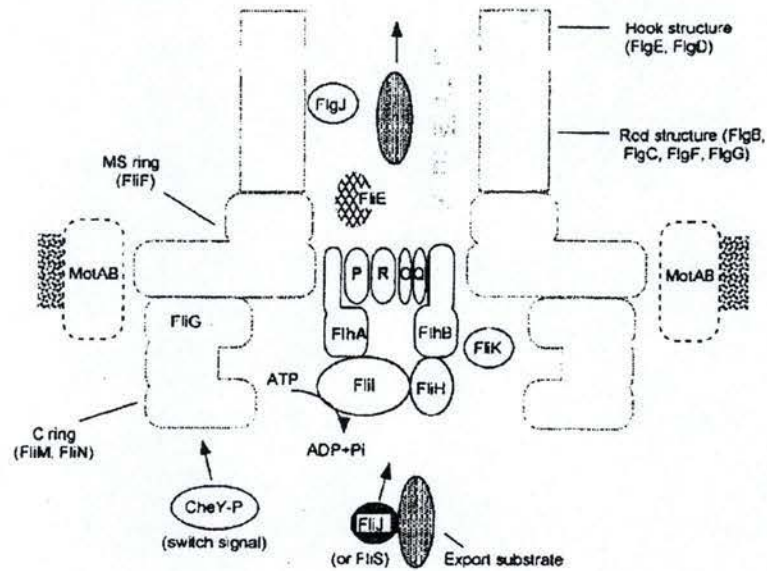


Figure 3 : représentation schématique de l'appareil d'exportation flagellaire (D'après Minamio, 1999)

1.2.1.5. Les anneaux P et L

Au niveau de la couche de peptidoglycane se trouve l'anneau P résultant de l'assemblage d'un monomère (FlgI). On pense que ces molécules sont capables de générer des ponts disulfures entre elles. Elles auraient donc en plus d'un rôle structural une activité enzymatique.

Enfin, au niveau de la membrane externe se trouve l'anneau L résultant de l'assemblage d'un monomère (FlgH) (Macnab, 1996).

1.2.2. Le hook

Le hook est une structure hélicoïdale résultant de l'assemblage d'un monomère : FlgE. Il permet de faire une articulation entre le corps basal et le filament. La transition entre la tige du corps basal et le hook nécessite une protéine : FlgD. La connexion du hook au filament se fait via une zone de jonction composée de deux protéines : FlgK et FlgL (Macnab, 1996).

1.2.3. Le filament

Le filament a une forme d'hélice à pas gauche. Il s'agit d'une structure très rigide, qualité essentielle pour sa fonction de propulseur de la cellule. Le filament est constitué de l'assemblage de 20000 sous-unités d'une protéine appelée flagelline (FliC). Certaines espèces bactériennes possèdent plusieurs types de flagelline. Le filament mesure 5 à 10 μm selon les espèces et se termine par une coiffe composée de monomères de la protéine FliD .

On pense que l'anneau MS, C, le hook, le filament et la tige centrale sont des éléments rotatifs tandis que les anneaux L et P sont des éléments statifs.

Certaines protéines de l'appareil flagellaire sont encore soit de localisation inconnue (FliE), soit de fonction inconnue (FliL, FliJ, ...) chez *E. coli* (Macnab, 1996).

1.3. La biogenèse du flagelle

1.3.1. Biogenèse proprement dite

Le flagelle étant une structure complexe, il est capital que sa biogenèse soit un processus séquentiel bien régulé. Plus de 20 gènes codent pour des protéines de structure tandis que 30 autres gènes sont impliqués dans le processus d'assemblage du flagelle, dans la fonction, la maintenance et la réception sensorielle de cette structure (Shapiro, 1995). L'ensemble de ces gènes représente approximativement 1% des gènes bactériens (Sockett, 1998). La synthèse flagellaire et la mobilité sont également très coûteuses au point de vue énergétique. En effet, le fonctionnement et la biogenèse requièrent 2% de l'énergie totale d'une cellule bactérienne (Otteman, 1997).

Les gènes flagellaires font partie d'un même régulon. Ce régulon est composé de plusieurs opérons répartis sur différentes régions du chromosome bactérien.

Les gènes flagellaires sont répartis en trois classes hiérarchisées en fonction de leur intervention chronologique séquentielle :

- les gènes de classe I, codant pour des protéines régulatrices contrôlant l'expression du régulon entier,
- les gènes de classe II, codant pour les composants structuraux du hook et du corps basal ainsi que pour des protéines régulatrices de l'expression des gènes de classe III,

- les gènes de classe III, codant pour les composants structuraux du filament, les protéines génératrices de force motrice, la machinerie des chémosenseurs.

La figure 4 illustre le processus de la biogenèse flagellaire décrite ci-dessous.

Dans un premier temps interviennent deux facteurs (FlhC et FlhD) codés par des gènes de classe I. Ces molécules activent les gènes de classe II, ce qui permet la mise en place des premières structures. La première pièce à être mise en place est l'anneau MS (Macnab, 1996). Ensuite sont assemblées les protéines responsables du changement de sens de la rotation du flagelle : FliG, FliM et FliN citées précédemment. La structure suivante à prendre place est le système de sécrétion protéique, qui vient se loger au niveau du pore central de l'anneau MS. La tige centrale est ensuite assemblée, en commençant par l'exportation de la partie proximale (FlgB, FlgC et FlgF) via l'appareil de sécrétion, suivi de son assemblage.

Suit le transport des protéines de la partie distale (FlgG) jusqu'au périplasme, suivi de leur assemblage.

L'étape suivante est l'exportation des protéines de l'anneau P (FlgI) jusque la couche de peptidoglycane et leur assemblage autour de la tige centrale.

Les protéines de l'anneau L sont exportées jusqu'en membrane externe toujours par le système de sécrétion. Elles sont ensuite assemblées autour de la tige centrale.

La transition de la tige au hook requiert la production d'une protéine appelée FlgD qui forme une coiffe au sommet de la tige centrale, permettant aux monomères du hook de s'assembler au niveau de l'extrémité distale de la structure naissante. Ainsi, si l'anneau L est manquant, le hook ne peut pénétrer dans la membrane externe. Dès lors, l'assemblage du flagelle est interrompu (Macnab, 1996).

Les monomères du hook (FlgE) sont exportés et s'assemblent pour former une structure hélicoïdale. C'est à ce stade que sont placées les protéines motrices MotA et MotB qui s'insèrent dans la membrane interne.

Une fois cette structure terminée, les protéines HAP1 (hook associated protein 1 : FlgK) sont sécrétées et déplacent la coiffe du hook (FlgD) afin de former une première zone de jonction avec le filament.

La formation de la zone FlgK est suivie par l'assemblage, à l'extrémité distale, d'une deuxième zone de jonction composée d'un monomère : FlgL (HAP 3). Finalement, une troisième zone de jonction, composée de sous-unités d'une protéine FliD (HAP 2), est mise en place, formant une coiffe pour le futur filament. Cette structure permet aux sous-unités de la flagelline (FliC) de s'insérer à l'extrémité distale du filament naissant. Le filament assemblé,

la structure flagellaire est terminée. Chez les entérobactéries, le principal point de contrôle pour la transcription des gènes s'effectue lorsque le corps basal et le hook sont assemblés.

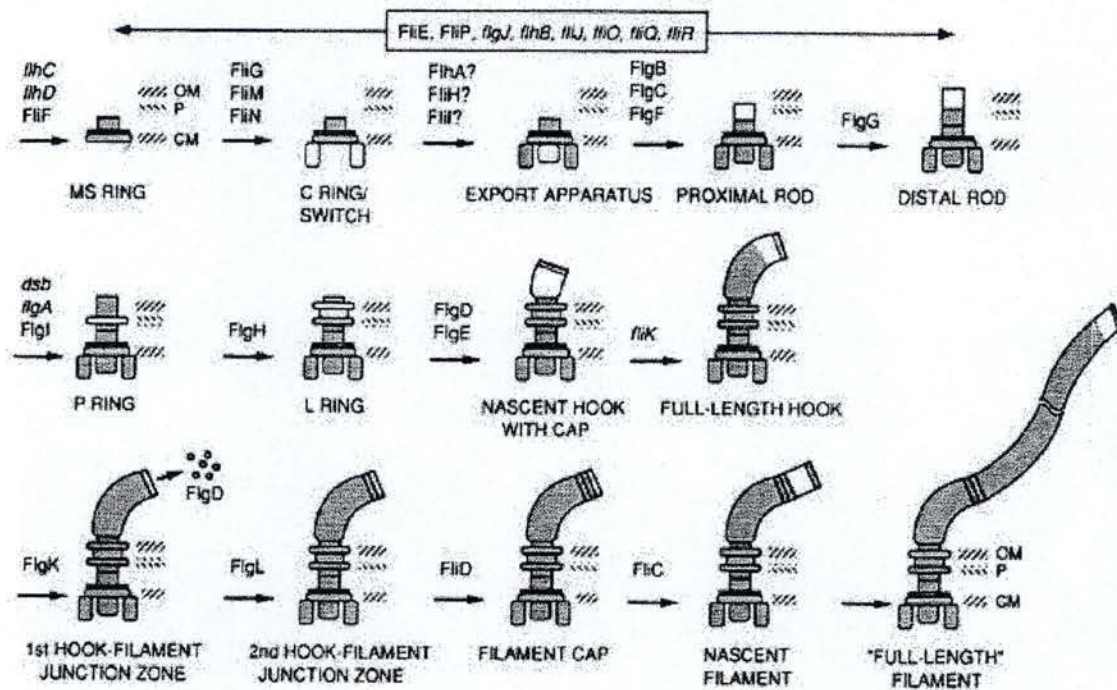


Figure 4 : représentation schématique de la biogenèse flagellaire chez *E. coli* (d'après Macnab, 1996)

1.3.2. Régulation de la biogenèse

La biogenèse du flagelle est un processus complexe et séquentiel. Il est donc important que l'expression des gènes soit rigoureusement régulée. Il existe deux niveaux de régulation :

- une régulation intrinsèque au processus de la biogenèse que nous décrivons dans ce paragraphe,
- une régulation faisant intervenir des facteurs internes (par exemple le cycle cellulaire) et externes (par exemple le quorum sensing) à la bactérie. Cette régulation sera décrite ultérieurement.

Chez les entérobactéries, l'opéron *flhDC* (gènes de classe I) est au sommet de la hiérarchie de régulation de la biogenèse. Les protéines FlhC et FlhD qu'ils encodent sont absolument requises pour l'expression des autres gènes du régulon flagellaire. En effet, l'expression des gènes de classe II est directement dépendante de cet opéron. De plus, celui-ci est également responsable de l'expression du gène *fliA*, codant pour un facteur sigma. Ce facteur est un activateur des gènes de classe III. Lors de la formation de l'anneau MS jusque la mise en place du hook, ce facteur se lie à un facteur anti-sigma (FlgM) qui l'inactive. Dès que le hook est formé, FlgM est exporté via l'appareil de sécrétion flagellaire ; FliA peut alors activer les gènes de classe III (Aldridge and Hughes, 2002), (Karlinsky, 1998).

Une des conséquences du caractère séquentiel de la biogenèse est que la mutation d'une pièce du flagelle entraîne l'interruption de l'assemblage du reste de la structure.

1.3.3. Le flagelle chez une α -protéobactérie, *Caulobacter crescentus*

Bien que l'appareil flagellaire soit structurellement conservé dans le monde bactérien, des divergences apparaissent au niveau de la régulation de la biogenèse des différentes classes de bactéries.

Caulobacter crescentus fait partie de la classe des α -protéobactéries comme *Brucella* spp. qui fait l'objet de notre étude. *C. crescentus* se divise de manière asymétrique et génère ainsi deux cellules filles différentes : une cellule mobile possédant un flagelle polaire et une cellule non mobile pédonculée (figure 5) (Gober and Marques, 1995).

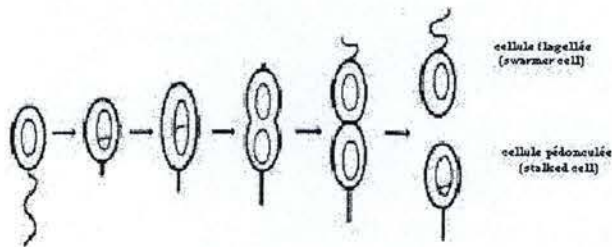


Figure 5: Cycle cellulaire de *C. crescentus* (d'après Gober & Marques, 1995). Une cellule pédonculée, compétente pour la réplication et la septation, se divise en deux cellules-fille asymétriques: une cellule pédonculée semblable à la cellule-mère et une cellule flagellée, incompétente pour la réplication. Cette dernière devra perdre son flagelle et synthétiser un pédoncule avant de pouvoir se diviser.

L'organisation et la régulation des gènes flagellaires de *C. crescentus* diffèrent de celles des entérobactéries.

Chez cet organisme, deux points de contrôle sont nécessaires : un après l'assemblage des anneaux MS et C et un après l'assemblage du hook.

C'est pourquoi, chez cette bactérie, les gènes sont classés en quatre catégories également en fonction de leur intervention chronologique séquentielle. Les gènes de classe I codent pour les régulateurs ; les gènes de classe II pour les composants structuraux des anneaux MS et C ; les gènes de classe III pour les composants structuraux de la tige centrale, pour les protéines associées au hook et pour les protéines de la coiffe du filament et les gènes de classe IV pour la flagelline (Aldridge and Hughes, 2002).

La régulation ne se fait pas via les facteurs sigma FliA et anti-sigma FlgM (Shapiro, 1995).

L'initiation de la biogenèse flagellaire chez cette bactérie est amorcée lors de la dernière étape du cycle cellulaire (figure 6). Cette régulation se fait via un facteur apparenté à un système à deux composants appelé CtrA. (Shapiro, 1995). Celui-ci, codé par un gène de classe I, active la transcription des gènes de classe II dont l'expression est absolument nécessaire à l'expression des gènes de classe III et IV (Gober and Marques, 1995).

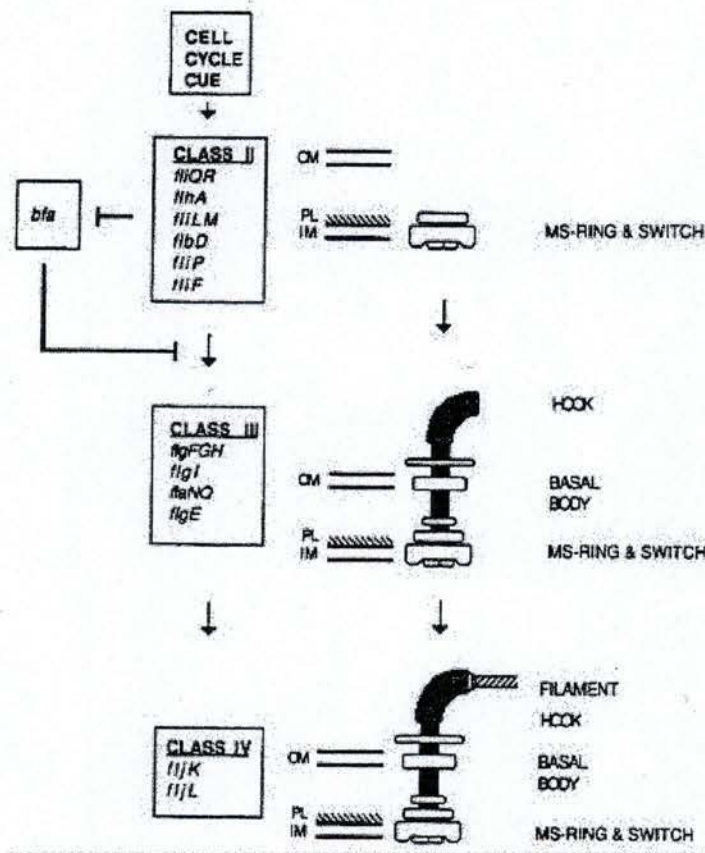


Figure 6 : représentation schématique de la hiérarchie de la régulation de la biogenèse flagellaire chez *Caulobacter crescentus* (d'après Gobes & Marques, 1995)

Un deuxième niveau de régulation chez *Caulobacter* fait intervenir le facteur FlbT. Dans un premier temps, FlbT inhibe la production de flagelline en déstabilisant les transcrits des gènes de classe IV avant l'achèvement du corps basal et du hook. Dès que le hook et les différentes zones de jonction sont assemblées, les transcrits de classe IV sont stabilisés. La flagelline peut alors être produite puis immédiatement exportée et assemblée. Le mécanisme moléculaire par lequel FlbT déstabilise les transcrits de classe IV n'est pas connu (Aldridge and Hughes, 2002).

1.4. Les rôles du flagelle

Les bactéries utilisent leur flagelle pour se déplacer. Elles peuvent ainsi se diriger vers des niches favorables et s'éloigner des niches défavorables.

Chez les bactéries pathogènes, l'appendice flagellaire intervient également à différents niveaux du cycle infectieux (recherche de l'hôte, adhérence, sécrétion de facteurs de virulence).

1.4.1. Rôle du flagelle dans la mobilité

1.4.1.1. La mobilité

Les bactéries utilisent leur flagelle pour se déplacer. Elles peuvent soit nager (*swimming*), soit rester sur place, animées de petits mouvements aléatoires (*tumbling*) (figure 7).

En absence d'un gradient de substance attractive ou répulsive, les bactéries se déplacent de manière aléatoire. Elles nagent avec une trajectoire rectiligne ou légèrement courbe puis elles s'arrêtent en bougeant de manière aléatoire. Elles se remettent ensuite à nager dans une autre direction.

En présence d'un gradient de substance attractive, le microorganisme aura tendance à nager plus longtemps en diminuant la fréquence de ses arrêts à mesure que la concentration en substance attractive augmente. En présence d'un gradient de substance répulsive, le microorganisme aura tendance à nager plus longtemps en diminuant la fréquence de ses arrêts à mesure que la concentration en substance répulsive diminue (Macnab, 1996). Leur stratégie peut se résumer par « des grands pas dans la bonne direction et des petits pas dans les autres directions ».

Pour nager, les bactéries font tourner leur flagelle dans le sens contraire des aiguilles d'une montre. Cette rotation génère une onde qui se propage de la partie proximale à la partie distale du flagelle, propulsant la cellule vers l'avant.

Grâce aux protéines FliM, FliG et FliN responsables du *switching*, les bactéries peuvent changer le sens de rotation de leur flagelle. Celui-ci tourne alors dans le sens des aiguilles d'une montre. La cellule arrête alors de nager et est animée de petits mouvements aléatoires. Ce processus permet à la bactérie de se réorienter. Elle recommence ensuite à nager dans une autre direction (Bren, 2000), (Macnab, 1996).

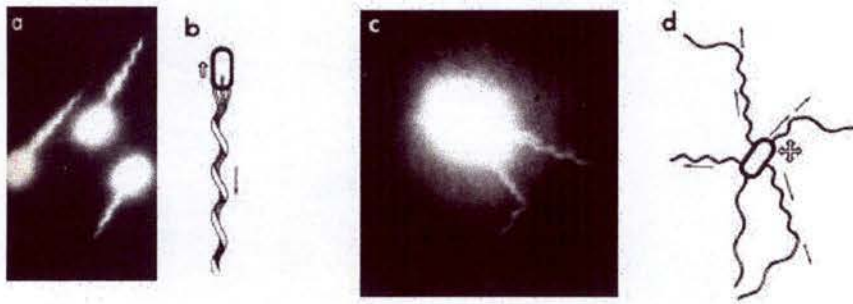


Figure 7 : comportement du flagelle de *E. coli* et *S. typhimurium* lorsque la bactérie nage (swimming) et lorsqu'elle s'arrête; animée de petits mouvements aléatoires (tumbling).

a et b : swimming. Le flagelle de la bactérie tourne dans le sens contraire des aiguilles d'une montre ; la bactérie nage.

c et d : tumbling. Le flagelle de la bactérie tourne dans le sens des aiguilles d'une montre ; la bactérie s'arrête animée de petits mouvements aléatoires pour se réorienter (d'après Macnab, 1996).

1.4.1.2. Le chémotactisme

Dans un milieu relativement homogène, les bactéries flagellées se déplacent au hasard. Dans un milieu hétérogène par contre, de nombreuses bactéries sont capables de taxie. La taxie est une réaction de locomotion orientée par laquelle la bactérie se rapproche ou s'éloigne d'un stimulus quelconque. Il existe différents types de taxie : les bactéries mobiles capables de photosynthèse manifestent un comportement de phototaxie positive, c'est-à-dire un mécanisme qui leur permet de chercher la lumière en discriminant les différentes longueurs d'onde. Certains procaryotes se déplacent le long d'un champ magnétique dans un processus appelé magnétotactisme.

Les bactéries peuvent également se mouvoir, grâce à leur flagelle, vers des niches favorables ou s'éloigner des niches défavorables et ce en percevant les substances attractives et répulsives du milieu dans un processus appelé chémotactisme (Lengeler *et al.*, 1999).

Chez les entérobactéries, deux complexes protéiques interviennent dans le chémotactisme : le complexe contenant le récepteur et celui contenant le moteur flagellaire (Bren, 2000). Le moteur flagellaire contient, entre autres, les protéines responsables du changement de sens de rotation du flagelle (FliM, FliN et FliG). Il existe différents types de récepteurs répondant chacun à plusieurs substances (glucose, acides aminés,...).

Le fonctionnement du chémotactisme est basé sur un système de phosphorylation /méthylation (figure 9).

Plusieurs acteurs interviennent dans ce mécanisme :

- la protéine CheR qui méthyle constitutivement le récepteur.
- La protéine CheA, une histidine kinase associée au récepteur. Cette enzyme a la capacité de s'autophosphoryler puis de transférer son phosphate à deux autres protéines :
 - CheY, une protéine cytoplasmique. La forme phosphorylée de cette protéine interagit avec FliM. Cette interaction conduit à une rotation du flagelle dans le sens des aiguilles d'une montre. La bactérie s'arrête pour se réorienter.
 - CheB, une méthylestérase. La forme phosphorylée de cette enzyme déméthyle le récepteur.

La figure 8 illustre le processus du chémotactisme décrit ci-dessous.

La fixation d'une substance attractive sur le récepteur entraîne l'inhibition de l'autophosphorylation de CheA. La protéine CheY n'est donc plus phosphorylée et n'interagit plus avec FliM. Ceci a pour conséquence l'induction d'une rotation du flagelle dans le sens contraire des aiguilles d'une montre. La bactérie nage.

L'absence d'activité de CheA entraîne également une diminution du taux de CheB phosphorylé dans la cellule. Le récepteur n'est donc plus déméthylé.

CheR étant une méthylase constitutive, la méthylation du récepteur devient très élevée. Ceci restaure la capacité du récepteur à activer la protéine CheA qui peut à nouveau s'autophosphoryler et transférer son phosphate aux protéines CheY et CheB. CheY interagit alors avec FliM (Bren, 2000), (Manson *et al.*, 1998). En présence de substance attractive, la bactérie nage jusqu'au moment où ses récepteurs sont méthylés. A ce moment, la bactérie s'arrête de nager et est animée de petits mouvements aléatoires (tumbling). Ceci lui permet de se réorienter dans le gradient pour se diriger vers les concentrations plus grandes en nutriments. Le microorganisme adapte donc son comportement grâce à une perception des changements de concentration en nutriments dans le milieu.

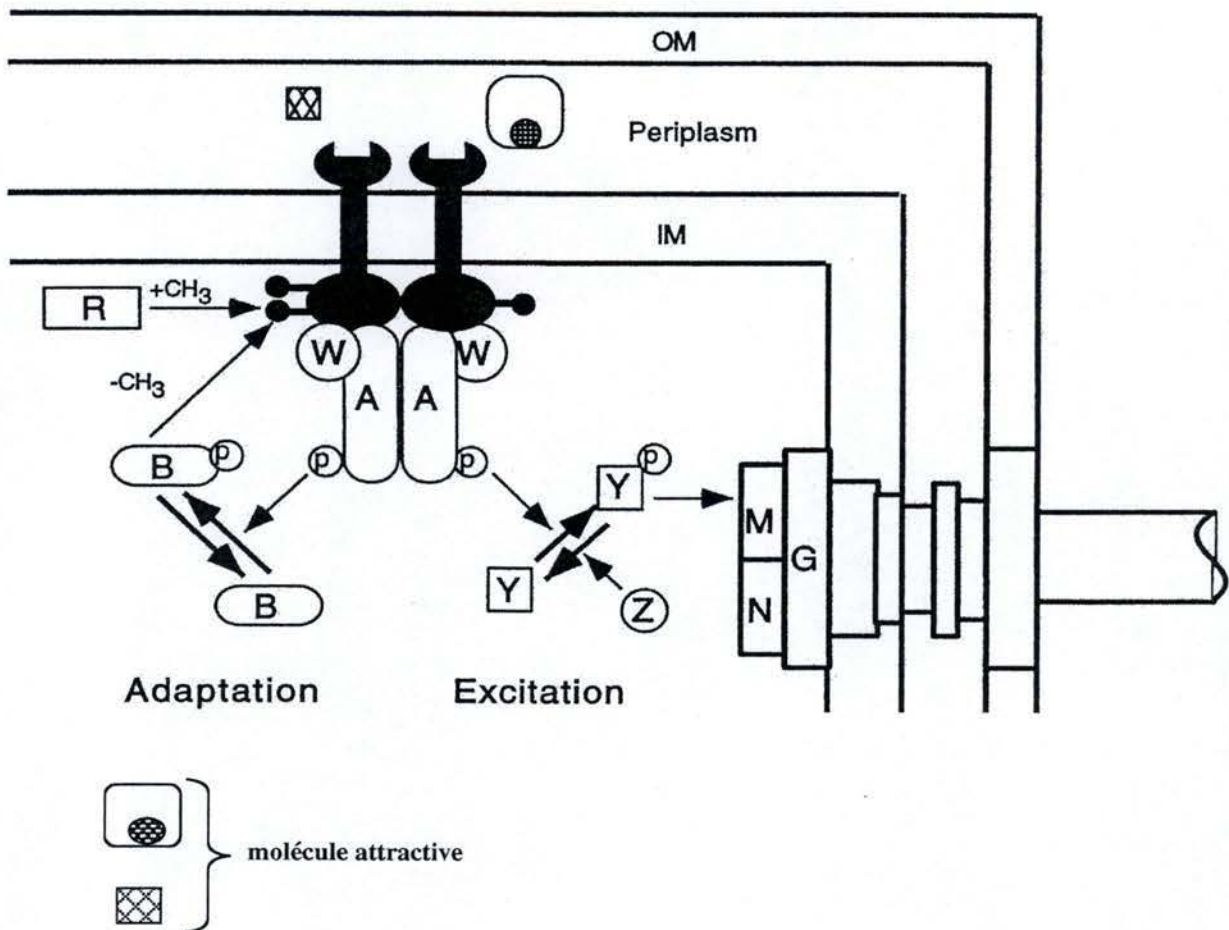


Figure 8 : représentation schématique du processus du chémotactisme.

Abréviations : OM : outer membrane, IM : inner membrane, R : CheR, A : CheA, B : CheB, W : CheW, Z : CheZ, G : FliG, M : FliM, N : FliN, p : groupement phosphate. (d'après Manson, 1998).

1.4.2. Au cours du cycle infectieux

Le flagelle bactérien peut intervenir dans le cycle infectieux au niveau :

- de la survie à l'extérieur de l'hôte,
- de la recherche de l'hôte,
- de la colonisation de l'hôte et l'invasion des tissus cibles,
- de la sécrétion de facteurs de virulence.

1.4.2.1. Rôle de la mobilité dans la virulence

Pour certaines bactéries, le flagelle et la mobilité sont surtout importantes à l'extérieur de l'hôte, notamment pour la recherche de nutriments et pour la transmission d'un hôte à l'autre.

C'est le cas pour *Bordetella pertussis*. Cet organisme possède deux phases : une phase aflagellée et une phase flagellée. Il est flagellé lorsqu'il se trouve à l'extérieur de l'hôte et devient aflagellé après infection de l'hôte, phase pendant laquelle il réprime l'expression de ses gènes flagellaires (Moens, 1996).

La forme flagellée de cet organisme survit mieux dans un environnement limitant en nutriments que la forme aflagellée. Chez cette bactérie, le flagelle joue également un rôle dans la transmission d'un hôte à l'autre (Moens, 1996).

Il existe chez *Bordetella* spp. une corégulation des gènes flagellaires et des gènes codant pour des facteurs de virulence. Cette régulation dépend d'un système appelé BvgAS.

Ce système comporte un senseur transmembranaire et un activateur transcriptionnel. A l'intérieur de l'hôte, la répression des gènes flagellaires s'accompagne de l'expression des gènes codant pour des facteurs de virulence. Plusieurs raisons peuvent être prises en compte quant à la répression des gènes flagellaires. D'abord le coût métabolique et énergétique que représentent la biogenèse et le fonctionnement d'un flagelle est important.

Ensuite cette structure présente une cible polymérique et très antigénique pour le système immunitaire. Cette bactérie a donc intérêt à réprimer ses gènes flagellaires une fois à l'intérieur de l'hôte au profit de l'expression des facteurs de virulence (Ottoman, 1997).

La mobilité bactérienne intervient également dans la colonisation de l'hôte.

Chez *Rhizobium* spp., une α 2-protéobactérie péritriche, la mobilité est importante pour faciliter le contact avec l'hôte. Elle augmente également l'efficacité de l'initiation de l'infection et de la nodulation. En effet, un mutant non mobile montrera un retard dans la formation des nodules par rapport à la souche sauvage. La mobilité est également un facteur de compétition dans la formation des nodules. Si on infecte une plante avec un mélange de souches sauvages et de souches mutantes non mobiles, on observe que les souches mobiles forment plus de nodules que les mutants (Moens, 1996), (Malek, 1992).

1.4.2.2. Rôle du flagelle dans l'adhérence

Le flagelle joue un rôle dans l'adhérence de certains pathogènes aux cellules et aux tissus cibles.

C'est le cas de *Pseudomonas aeruginosa*, pathogène colonisant le mucus des patients atteints de maladie chronique du poumon par un mécanisme impliquant un système adhésine-récepteur (Ramphal *et al.*, 1996). La flagelline intervient dans le mécanisme d'adhésion au mucus. En effet, une bactérie prétraitée avec des anticorps dirigés contre la flagelline perd sa faculté d'adhésion au mucus. Des cellules CHO, qui ne produisent pas de mucus, sont transfectées avec de l'ADNc de *mucl*, un composant du mucus. *Pseudomonas aeruginosa* adhère à ces cellules. Si celles-ci sont préalablement traitées avec de la flagelline purifiée, les bactéries n'adhèrent plus à la surface cellulaire (Lillehoj *et al.*, 2002).

1.4.2.3. Rôle dans la sécrétion

Chez *Yersinia* spp., un facteur de virulence, la phospholipase, est exporté via l'appareil d'exportation flagellaire. C'est à ce jour le seul exemple connu (Young *et al.*, 1999) mais ce type d'exportation est évoqué chez d'autres espèces.

2. L'appareil de sécrétion de type III

L'appareil d'exportation des composants flagellaires présente des homologies de séquence avec l'appareil de sécrétion de type III, utilisé par les bactéries pathogènes gram négatives pour injecter des protéines bactériennes dans la cellule eucaryote (Aizawa, 2001). Nous allons brièvement décrire cet appareil de sécrétion.

2.1. Généralités sur le type III

Le système de sécrétion de type III peut être comparé à une seringue que le microorganisme utilise afin d'injecter dans la cellule eucaryote des protéines qui détournent son

fonctionnement ou détruisent son système de communication. Ce système est présent chez *Yersinia* spp, *Shigella* spp, *E. coli* entéropathogène, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*,...

Les systèmes de sécrétion de type III se retrouvent également chez les $\alpha 2$ -protéobactéries, classe à laquelle appartient *Brucella* spp. *Rhizobium* spp. possède un système de sécrétion de type III (Cornelis, 2000).

2.2. Structure de l'appareil de sécrétion de type III

L'appareil de sécrétion de type III a été découvert et est le mieux décrit chez *Yersinia* spp. Tous les gènes codant pour l'appareil de sécrétion et pour les protéines sécrétées se trouvent sur un seul et même plasmide non conjugatif (pYV) très conservé chez les bactéries du genre *Yersinia* (Cornelis, 1995). Trois éléments interviennent dans cet appareil de sécrétion :

- l'appareil de sécrétion lui-même situé au niveau de la membrane bactérienne
- l'appareil de translocation construit par la bactérie au niveau de la membrane de la cellule eucaryote
- et enfin, les protéines sécrétées appelées protéines effectrices (figure 9).

2.3. L'appareil de sécrétion proprement dit

Les protéines injectées par la bactérie à l'intérieur de la cellule eucaryote doivent dans un premier temps traverser les deux membranes bactériennes (Cornelis, 2000).

Pour ce faire, les protéines formant l'appareil de sécrétion de type III se répartissent dans la membrane interne, la membrane externe et le périplasm du microorganisme.

Au niveau de la membrane externe, on retrouve une protéine (YscC) appartenant à la famille des sécrétines. Les sécrétines sont un groupe de protéines de membrane externe impliquées dans le transport de différentes macromolécules et de phages filamenteux. Il s'agit d'une structure en forme d'anneau ayant un pore central de 50 Å.

Un ensemble de protéines (YscD, -R, -U, -V, -S, -T) forme un pore qui traverse la membrane interne. On trouve également des protéines au niveau du périplasm (YscW). Toutes ces molécules forment un pore à travers les deux membranes bactériennes et l'espace périplasmique qui permettra le passage des protéines translocatrices et effectrices (figure 10) (Cornelis, 2000).

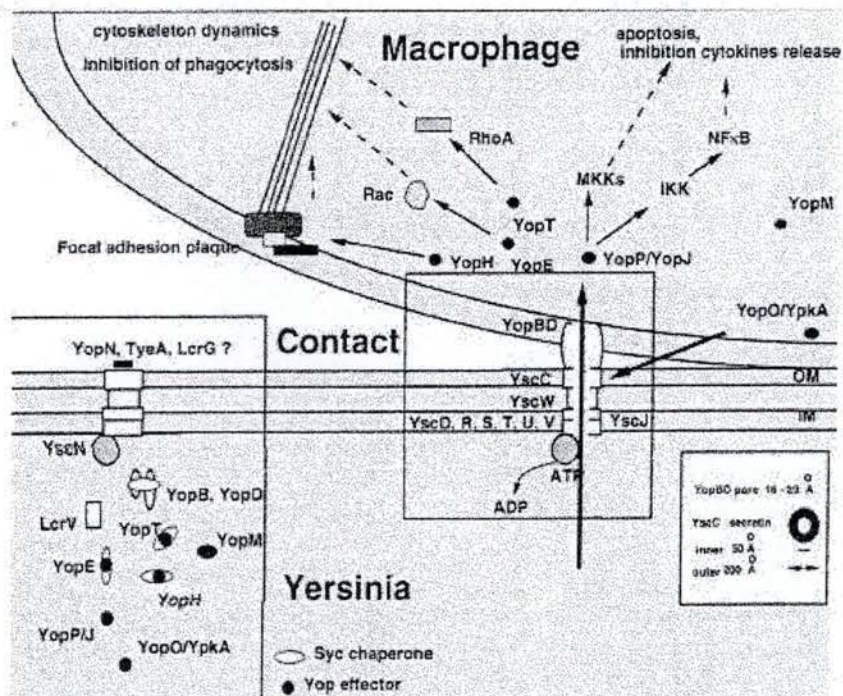


Figure 9 : représentation schématique de l'appareil de sécrétion de type III chez *Yersinia* spp.
(d'après G.R. Cornelis & F. Van Gijsegem, 2000)

Dans l'appareil flagellaire, il n'y a pas de sécrétine. En revanche, 10 protéines du système flagellaire appartenant à la partie interne du corps basal du flagelle (incluant les anneaux MS, C et l'ATPase) possèdent des homologies de séquence avec des protéines de l'appareil de sécrétion de type III (YscD, -J, -N, -O, -Q, -R, -S, -T, -U et -V) (Cornelis, 2000). De plus les propriétés physicochimiques des composants des deux appareils sont conservées (figure 10) (Aizawa, 2001).

	1		2		3		4		5		6		7	
Function	SALTY ^a		YEREN ^b		SHIFL		EPEC		PSEAE		RALSO		Flagella	
	SPI-1	SPI-2	Ysc	Ysa										
Proto-channel components (exporter/secretion)														
1	SpaP	SsaR	YscR	YsaR	Spa24		EscR	PscR		HrcR			FliP	
2	SpaQ	SsaS	YscS	YsaS	Spa9		EscS	PscS		HrcS			FliQ	
3	SpaR	SsaT	YscT	YsaT	Spa29		EscT	PscT		HrcT			FliR	
4	SpaS	SsaU	YscU	YsaU	Spa40		EscU	PscU		HrcU			FliB	
5	InvA	SsaV	LcrD	YsaV	MxiA		EscV	PerD		HrcV			FliA	
6	InvC	SsaN	YscN	YsaN	Spa47		EscN	PscN		HrcN			FliI	
Basal components														
1	PrgK	SsaJ	YscJ	YsaJ	MxiJ		EscJ	PscJ		HrcJ			FliF	
2	PrgH	SsaK?	YscL? YscD?	?	MxiG		SepL	?		?			FliM?	
3	SpaO ^c	SsaQ	YscQ	YsaQ	Spa33		EscQ	PscQ		HrcQ			FliY (FliN+FliM)	
4	InvE ^c	Spib?	LcrE? (YopN)	YsaW	MxiC, MxiN?		SepQ?	PscD?		HrpW?			FliG?	
Outer ring components (secretin)														
1	InvG	SpiaA?	YscC	YsaC	MxiD		EscC	PscC		HrcC			FliJ?	
2	InvH ^d	SsaO?	YscW? YscO?	?	MxiM		Orf15?	PscI?		?			FliH	
Needle components														
1	PrgI	SsaG?	YscF?		MxiH		EscF?	PscF?		HrpX?			FliE?	
2	PrgJ ^e	SsaP?	YscI?	YsaI	MxiI		Orf12?	PscI?		HrpY or K?			FliD?	
3	InvJ ^f	SsaK? SseI?	YscP?	?	Spa32?		?	PscP?		HrpF?			FliK	
Chaperones ^h														
1	PipC	SseD	YscY	YsaH	IpgF		Orf12	PscB		HrpD?			FliT?	
2	InvI	SsaO SseE	YscB YscO	?	Spa13?		Orf15?	PscO?		HrcP?			FliJ?	
3	SicA	SscB?	LcrH?	?	IpgC?		Orf27?	PscB PscH?		HrpP?			FliS?	
4	?	SsaK?	YscL?	?	MxiN?		?	PscL?		HrpF?			FliH?	
5	InvB	?	YscG?	YsaK?	Spa15?		?	?		?			?	
6	?	SsaA?	YscK	?	MxiK		?	?		?			?	
Effector proteins ^b (exoprotein/translocator)														
1	SipA	SseJ?	LcrV?	?	IpaA		EspA?	PepA?		HrpK?			FliC?	
2	SipB	SscC?	YopB?	?	IpaB		EspD?	PepB?		HrpV?			FliK?	
3	SipC	SseG?	YopD?	?	IpaC		EspB?	?		HrpJ?			?	
4	SipD	SseI?	YopH?	?	IpaD		EspB?	?		HrpL?			FliL?	
5	SptP	?	YopE?	?	?		?	?		?			?	

Figure 11 : liste des composants de l'appareil de sécrétion de type III chez différentes espèces et des composants flagellaires chez *E. coli*.

- Gènes codant pour les composants de l'appareil de sécrétion de type III répartis sur deux îlots de pathogénicité chez *Salmonella typhimurium* (SPI-1 et SPI-2).
 - Gènes codant pour les composants de l'appareil de sécrétion de type III répartis sur un plasmide (gènes *ysc*) et sur le chromosome (gènes *ysa*) chez *Yersinia enterocolitica*.
 - Gènes codant pour les composants de l'appareil de sécrétion de type III chez *S. flexneri*.
 - Gènes codant pour les composants de l'appareil de sécrétion de type III chez *E. coli* entéropathogène.
 - Gènes codant pour les composants de l'appareil de sécrétion de type III chez *Pseudomonas aeruginosa*.
 - Gènes codant pour les composants de l'appareil de sécrétion de type III chez *Ralstonia solanacearum*.
 - Gènes codant pour les composants flagellaires chez *E. coli*.
- (d'après Aizawa, 2001)

Deux hypothèses sont émises quant à l'évolution de ces deux systèmes. La première hypothèse est que l'appareil flagellaire est l'ancêtre du type III. Ce dernier aurait donc évolué à partir du système flagellaire. En effet, l'appareil de sécrétion de type III se retrouve chez un nombre limité de bactéries pathogènes gram négatives tandis que l'appareil flagellaire se retrouve dans une gamme plus étendue d'organismes bactériens.

La deuxième hypothèse est que les deux systèmes ont un ancêtre commun et ont divergé pour assurer deux fonctions différentes (Aizawa, 2001).

2.4. Les protéines translocatrices

Lorsque les protéines effectrices (voir paragraphe suivant) ont traversé les membranes du procaryote, elles doivent encore franchir celle de la cellule hôte (phénomène de translocation) afin d'arriver dans le cytoplasme de celle-ci. Pour ce faire, la bactérie forme, à l'aide des protéines YopB et YopD, un pore dans la membrane de la cellule eucaryote, par lequel les protéines effectrices accéderont au cytoplasme de la cellule cible. D'autres protéines telles que LcrV et LcrG interviennent dans la translocation des protéines effectrices dans la cellule eucaryote.

Les protéines translocatrices peuvent également être exportées dans le cytoplasme de la cellule hôte (Cornelis, 2000).

2.5. Les protéines effectrices

Les protéines dites effectrices sont les protéines exportées via l'appareil de sécrétion de type III, et sont appelées protéines Yop chez *Yersinia* spp..

On dénombre 11 protéines Yop qui représentent des facteurs essentiels de la virulence de *Yersinia* spp.. Cependant ces molécules ne sont pas des toxines au sens strict du terme. Elles n'ont aucun effet toxique sur les cellules en culture. Ces protéines ne sont cytotoxiques que lorsqu'elles sont injectées directement dans la cellule cible (Cornelis, 1995).

Les protéines Yop peuvent exercer une activité enzymatique au sein de la cellule cible à différents niveaux. Une des cibles les plus fréquentes des effecteurs de type III est le cytosquelette de la cellule eucaryote. *Yersinia* peut ainsi bloquer la phagocytose en réorganisant le cytosquelette. Cette réorganisation se fait de manière séquentielle, ce qui

suggère une hiérarchie dans le relargage des effecteurs comme c'est le cas pour l'exportation des composants flagellaires. Les effecteurs de *Yersinia* agissent également au niveau de la modulation de la réponse inflammatoire et la transduction du signal dans la cellule eucaryote. Cette bactérie diminue la réponse inflammatoire à l'aide du facteur YopP. Ce dernier inhibe le facteur NF- κ B empêchant ainsi la production de TNF α par le macrophage. YopP provoque également l'apoptose du macrophage ciblé (Cornelis, 2000).

L'appareil de sécrétion de type III est un système conservé dans le monde bactérien. Cependant, la nature des effecteurs est différente selon les espèces.

Shigella spp., par exemple, agit elle aussi sur le cytosquelette mais pour provoquer une macropinocytose par des cellules non phagocytaires, ce qui lui permet d'entrer dans la cellule eucaryote. Les effecteurs de cette bactérie agissent également sur la modulation de la réponse inflammatoire via le facteur NF- κ B. Mais, contrairement à *Yersinia*, *Shigella* induit volontairement une réponse inflammatoire. Cette inflammation exacerbée va conduire à un flux de phagocytes permettant l'ouverture des jonctions intercellulaires de l'épithélium intestinal, ce qui favorise la progression de l'infection (Cornelis, 2000).

3. Métrarégulation de l'appareil flagellaire

3.1. Régulation de la biogenèse flagellaire par la protéine CAP

La protéine CAP (catabolite activator protein) est une protéine se liant à l'AMP cyclique. Le complexe ainsi formé se lie à des séquences d'ADN consensus situées sur des promoteurs de différents opérons, comme par exemple l'opéron *lac* responsable du métabolisme du lactose chez *E. coli*, et active la transcription de cet opéron. L'opéron *flhDC*, qui contient des gènes de classe I et est donc au sommet de la hiérarchie de régulation de la biogenèse flagellaire, est activé par la liaison du complexe CAP-AMP cyclique sur une région située en amont du promoteur de l'opéron (Macnab, 1996).

3.2. Régulation de la biogenèse flagellaire par le cycle cellulaire

Chez certains organismes, l'initiation de la biogenèse se fait en réponse à un stade du cycle cellulaire. C'est le cas de *Caulobacter crescentus* cité précédemment (figure 11).

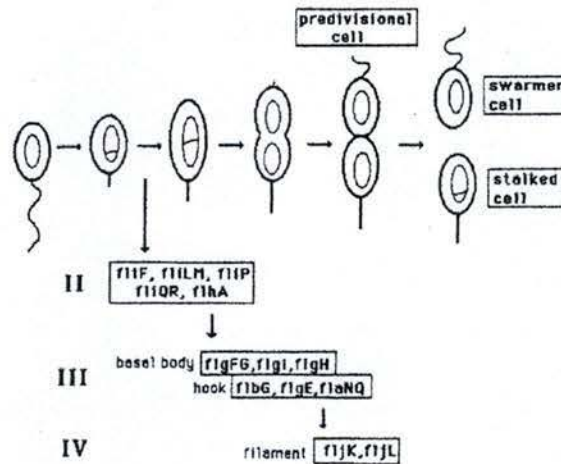


Figure 11 : représentation schématique de la régulation de la biogenèse flagellaire chez *Caulobacter crescentus*.

Le chromosome est représenté par un ovale dans la cellule. La cellule élabore un pédoncule puis réplique son ADN. C'est pendant la croissance cellulaire que le flagelle est synthétisé puis assemblé au pôle opposé au pédoncule. (d'après Gober & Marques, 1995).

L'initiation de la biogenèse flagellaire est régulée par la dernière étape du cycle cellulaire via un facteur appelé CtrA (cell cycle transcriptional regulator A). Ce facteur joue un rôle pléiotropique chez *Caulobacter crescentus*, il contrôle directement et indirectement l'expression de plus d'une centaine de gènes impliqués dans divers processus cellulaires. CtrA reconnaît un motif de liaison sur l'ADN situé en amont de ses gènes cibles. Parmi ceux-ci se trouvent les gènes flagellaires de classe II. Ce facteur régule à la fois la biogenèse du flagelle et la division cellulaire chez *C. crescentus*. CtrA fait partie d'un phosphorelais qui régule l'expression spatio-temporelle du flagelle et couple cela à la division ainsi qu'à la réplication de l'ADN (Jenal and Shapiro, 1996), (Bellefontaine, 2001).

3.3. Influence du quorum sensing sur les gènes flagellaires

Le quorum sensing est un phénomène de communication bactérienne, densité dépendante, médié par une ou plusieurs phéromones (aussi appelées autoinducteurs) (Miller, 2001). La présence d'une certaine concentration de cet autoinducteur dans le milieu extracellulaire conduit à une modification allostérique d'un activateur transcriptionnel qui coordonnera l'expression d'opérons cibles. Chez les bactéries gram négatives, ces activateurs transcriptionnels forment une famille de régulateurs appelés LuxR. Le quorum sensing régule divers processus tels que la virulence ou la symbiose (Whitehead *et al.*, 2001)

Parmi les gènes régulés par le quorum sensing se trouvent les gènes flagellaires. Chez *E. coli* entéropathogène, le gène *luxS*, responsable de la synthèse d'un autoinducteur, régule non seulement les protéines flagellaires mais aussi les protéines impliquées dans l'appareil de sécrétion de type III. Le gène *fliF* est notamment régulé par *luxS* chez cette bactérie (Sperandio *et al.*, 2001)

Chez les α -protéobactéries, *Sinorhizobium meliloti* possède deux gènes, *visN* et *visR* présentant des homologies avec des régulateurs transcriptionnels de la famille LuxR. Ces deux gènes, situés au milieu du régulon flagellaire, régulent la biosynthèse flagellaire, la mobilité et le chémotactisme. Des souches mutées dans ces deux gènes sont aflagellées. En fait, ces souches n'expriment ni protéines flagellaires et ni protéines intervenant dans le chémotactisme. Ces deux gènes ne font donc pas partie d'un point de contrôle mais de l'opéron maître du régulon flagellaire (Sourjik *et al.*, 2000).

3.4. Influence de l'environnement sur les gènes flagellaires

L'environnement dans lequel se trouve la bactérie conditionne également l'expression des gènes flagellaires.

Salmonella typhimurium est une entérobactérie pathogène. Cette bactérie est flagellée en dehors de l'hôte et est aflagellée à l'intérieur de l'hôte. Un environnement acide, comme l'intérieur de l'estomac, active un système à deux composants PhoP/PhoQ. Ce système est composé d'un senseur (PhoQ) et d'un régulateur transcriptionnel (PhoP) qui active certains gènes et en inhibe d'autres. Parmi les gènes réprimés se trouvent les gènes flagellaires (Manhan, 1995).

4. Brucella spp

4.1. La brucellose

Les bactéries du genre *Brucella* sont des agents pathogènes causant la brucellose. La brucellose est une maladie répandue à travers le monde. Il s'agit d'une anthroponose. La brucellose animale touche les animaux domestiques et sauvages. Elle provoque l'avortement chez les femelles gestantes et des problèmes de fertilité chez le mâle (O'Callaghan, 2001). Cette maladie est responsable de pertes économiques importantes.

Elle touche également les hommes, provoquant la fièvre de Malte, et cause une morbidité importante dans les régions où la maladie est endémique.

4.2. Description de Brucella

Il s'agit de petits coccobacilles gram négatifs isolés et décrits jusqu'à présent comme immobiles. Ils ne possèdent ni capsule, ni endospore, ni plasmide naturel connu.

4.3. Taxonomie

Sur base de la comparaison de séquences d'ARNr 16S et de lipides membranaires ainsi que sur base de résultats d'hybridation ADN/ARN, on classe *Brucella* dans la sous-classe $\alpha 2$ des protéobactéries. Cette catégorie comprend des pathogènes intracellulaires d'animaux tels que *Rickettsia* spp., péricellulaires de plantes tels que *Agrobacterium* et des symbiontes de plantes tels que *Rhizobium*. De nombreuses homologues de séquences ont été mises en évidence entre *Brucella* et *Rhizobium*.

La taxonomie classique divise le genre *Brucella* en six espèces (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* et *B. canis*). Cependant, selon Verger, le genre de *Brucella* ne contiendrait qu'une seule espèce : *B. melitensis*. Les autres espèces ne seraient que des biovars (Verger *et al.*, 1985).

4.4. Génétique

Les génomes de *B. melitensis* (DelVecchio *et al.*, 2002) et *B. suis* (<http://tigrblast.tigr.org/ufm/index.cgi?database=b-suisPseq>) ont tous deux été séquencés.

B. melitensis possède un génome de 3.2 Mb constitué de deux chromosomes circulaires, un de 1.1 Mb et l'autre de 2.2 Mb, encodant chacun des gènes essentiels. Les autres espèces de *Brucella* possèdent également deux chromosomes, de taille légèrement variable selon les espèces et selon les biovars, excepté le biovar 3 de *B. suis* qui ne possède qu'un chromosome circulaire de 3.3 Mb (O'Callaghan, 2001)

4.5. Trafic intracellulaire

Brucella est un pathogène intracellulaire facultatif. Cet organisme est capable d'infecter des cellules phagocytaires (neutrophiles et macrophages) et des cellules non phagocytaires (cellules de l'épithélium trophoblastique).

Le mécanisme par lequel *Brucella* infecte les cellules non phagocytaires n'est pas encore clairement établi (Corbel, 1997).

Pour survivre dans les phagocytes non-professionnels, *Brucella* évite la fusion avec les lysosomes et atteint un compartiment similaire au réticulum endoplasmique et qui autorise sa réplication. Un modèle du trafic intracellulaire a été proposé : *Brucella* pénétrerait par phagocytose de type "zipper". Elle se retrouve dans un phagosome qui interagirait avec les endosomes précoces. *Brucella* inhiberait ensuite l'interaction de ce phagosome avec les endosomes tardifs et interagirait avec la voie d'autophagie pour atteindre sa niche de réplication. Le système de sécrétion de type IV serait impliqué dans ce détournement de la voie d'endocytose (figure 12).

Brucella parvient à survivre dans des cellules phagocytaires telles que les neutrophiles et les macrophages. Dans les macrophages, sa niche de réplication ne comporte pas de marqueurs du réticulum endoplasmique, mais ces modèles sont à l'heure actuelle controversés (Pizzaro-Cerdà *et al.*, 1999).

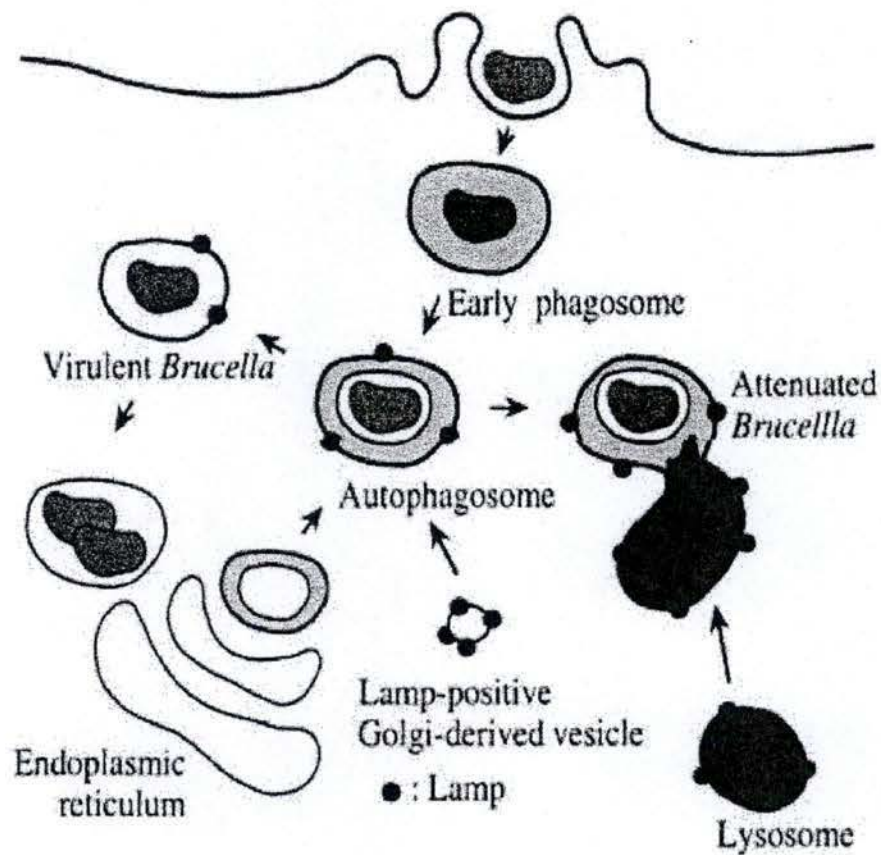


Figure 12: Modèle proposé pour le trafic intracellulaire de *B. abortus* dans les cellules HeLa. Après invasion, les *Brucella* sont localisées dans un phagosome précoce capable de fusionner avec un autophagosome provenant du réticulum endoplasmique. Elles détournent la voie de la maturation de l'autophagosome et utilise le transport rétrograde pour accéder au réticulum endoplasmique, où la réplication a lieu (d'après Pizzaro-Cerda *et al*, 1998).

4.6. Les facteurs de virulence

Brucella utilise différents facteurs de virulence au cours de son cycle infectieux.

Plusieurs de ces facteurs de virulence sont connus. Parmi ceux-ci, on peut citer la chaîne O du lipopolysaccharide, le système de sécrétion de type IV (VirB), un système de régulation à deux composants BvrR/BvrS ou encore un homologue d'un gène flagellaire (*fliF*).

Différentes études basées sur l'observation de mutants rugueux caractérisés ont démontré l'implication de la chaîne O du lipopolysaccharide dans la virulence de *Brucella*. Ces mutants ne sont pas atténués en macrophages bovins. En revanche, ils sont atténués en souris. Ceci montre que la chaîne O est impliquée dans la résistance aux défenses de l'hôte (Godfroid *et al.*, 1998).

Un autre facteur impliqué dans la virulence de *Brucella* est l'homologue d'un système de sécrétion de type IV (Delrue, 2001), (O'Callaghan *et al.*, 1999). La nature et le rôle des molécules exportées n'ont pas encore été définis. Des souches mutées dans ce système présentent une atténuation de leur virulence en cellules HeLa et en macrophages bovins. Ce système de sécrétion serait impliqué dans la capacité de *Brucella* à dévier le trafic intracellulaire des cellules non phagocytaires. Ce système serait régulé par l'expression d'un gène *vjbR* présentant des homologies de séquences avec des régulateurs de la famille LuxR, intervenant dans le quorum sensing (R-M Delrue, thèse en cours).

Un autre système intervenant dans la virulence de *Brucella* est le système de régulation à deux composants BvrR/BvrS. Ces deux protéines sont homologues au système ChvI/ExoS de *Rhizobium meliloti* jouant un rôle essentiel dans les interactions entre l'hôte et la bactérie. Des mutants dans le système BvrR/BvrS montrent une sensibilité exacerbée vis-à-vis des peptides cationiques tels que la polymyxine A. Ce phénotype suggère qu'il contrôle l'expression de protéines de la paroi bactérienne. Ils sont également affectés dans leur capacité à pénétrer dans les cellules HeLa. De plus, ils sont incapables d'inhiber la fusion phagolysosomiale et sont donc incapables de se répliquer en cellules phagocytaires et non phagocytaires. Ces mutants sont avirulents en souris. Le ou les signaux environnementaux perçus par ce système ne sont pas encore connus (Sola-Landa *et al.*, 1998).

Le gène *fliF* est un des premiers gènes flagellaires mis en évidence chez *Brucella* (Halling, 1998). Une étude par STM (signature-tagged mutagenesis) a été réalisée pour identifier les gènes requis dans la pathogénie de cette bactérie *in vivo*. Une banque de mutants transpositionnels a été criblée dans un modèle d'infection murin (Lestrade *et al.*, 2000). Un des mutants atténués est muté dans le gène *fliF* (A. Dricot, mémoire de licence). Ce gène joue un rôle dans la virulence de la bactérie.

Une deuxième étude, basée sur la technique DFI (expression différentielle de la fluorescence) a permis de confirmer l'implication du gène *fliF* dans la virulence de la bactérie.

Jubier-Maurin a développé un outil génétique contenant le gène codant pour la GFP (green fluorescent protein) comme gène rapporteur. Une banque d'ADN a été construite en utilisant ce vecteur et 1330 clones ont été étudiés. Cette étude a permis de déterminer les fragments de la banque correspondant à un promoteur induit après une infection en macrophages. Les clones exprimant la GFP et donc possédant un vecteur avec un de ces promoteurs induits sont sélectionnés et caractérisés. Un de ces clones sélectionnés contient le promoteur du gène *fliF* (Jubier-Maurin, 2001).

Le gène *fliF* joue donc un rôle important dans la pathogénie de la bactérie. La régulation de l'expression de ce gène sera étudiée au cours de ce travail.

4.7. Les gènes flagellaires chez *Brucella*

Comme cité précédemment, *Brucella* spp. est décrite comme étant une bactérie non mobile. En effet, cet organisme ne possède pas de flagelle connu. Néanmoins, des phases ouvertes de lecture (ORF) codant pour des homologues de protéines intervenant dans le système flagellaire ont été découvertes.

Dans un premier temps, Halling a mis en évidence trois homologues de gènes flagellaires (*fliC*, *fliF* et *flgE*) chez *B. abortus*. Ces gènes se retrouvent chez toutes les souches de *Brucella* et tous les biovars de chaque espèce (Halling, 1998).

Après la découverte de ces trois gènes par Halling, des études ont été réalisées afin de mettre en évidence d'autres gènes flagellaires chez *Brucella*. En général, les gènes flagellaires sont physiquement liés sur le chromosome. Se basant sur cette observation, le criblage d'une banque génomique de *B. abortus* en utilisant une amplification PCR de *flgE* comme sonde a été réalisé au laboratoire. Grâce à cette technique, huit autres homologues de gènes flagellaires en aval de *flgE* ont été mis en évidence tandis que cinq autres homologues de gènes flagellaires (*flgC*, *fliE*, *flgG*, *flgA* et *flgI*) étaient découverts (S.M.Halling, communication personnelle). La disponibilité de la séquence complète de *B. melitensis* (DelVecchio *et al.*, 2002) et de *B. suis* (<http://tigrblast.tigr.org/ufm/index.cgi?database=b-suisPseq>) a permis de faire l'inventaire complet des gènes homologues de gènes flagellaires chez *Brucella*. 28 gènes flagellaires ont ainsi été trouvés chez *Brucella*. Ces gènes présentent des homologies de séquences avec les gènes flagellaires chez *Mesorhizobium meliloti*. De plus l'organisation chromosomique des gènes flagellaires chez cet organisme est très proche de celle de *Brucella* (figure 13). On remarque que tous les gènes structuraux intervenant dans

la construction d'un flagelle sont présents, ainsi que des gènes flagellaires typiques des α -protéobactéries (par exemple *motC/D* ou *flbT*). En revanche, on ne détecte aucun gène codant pour les récepteurs ou les transducteurs du chémotactisme.

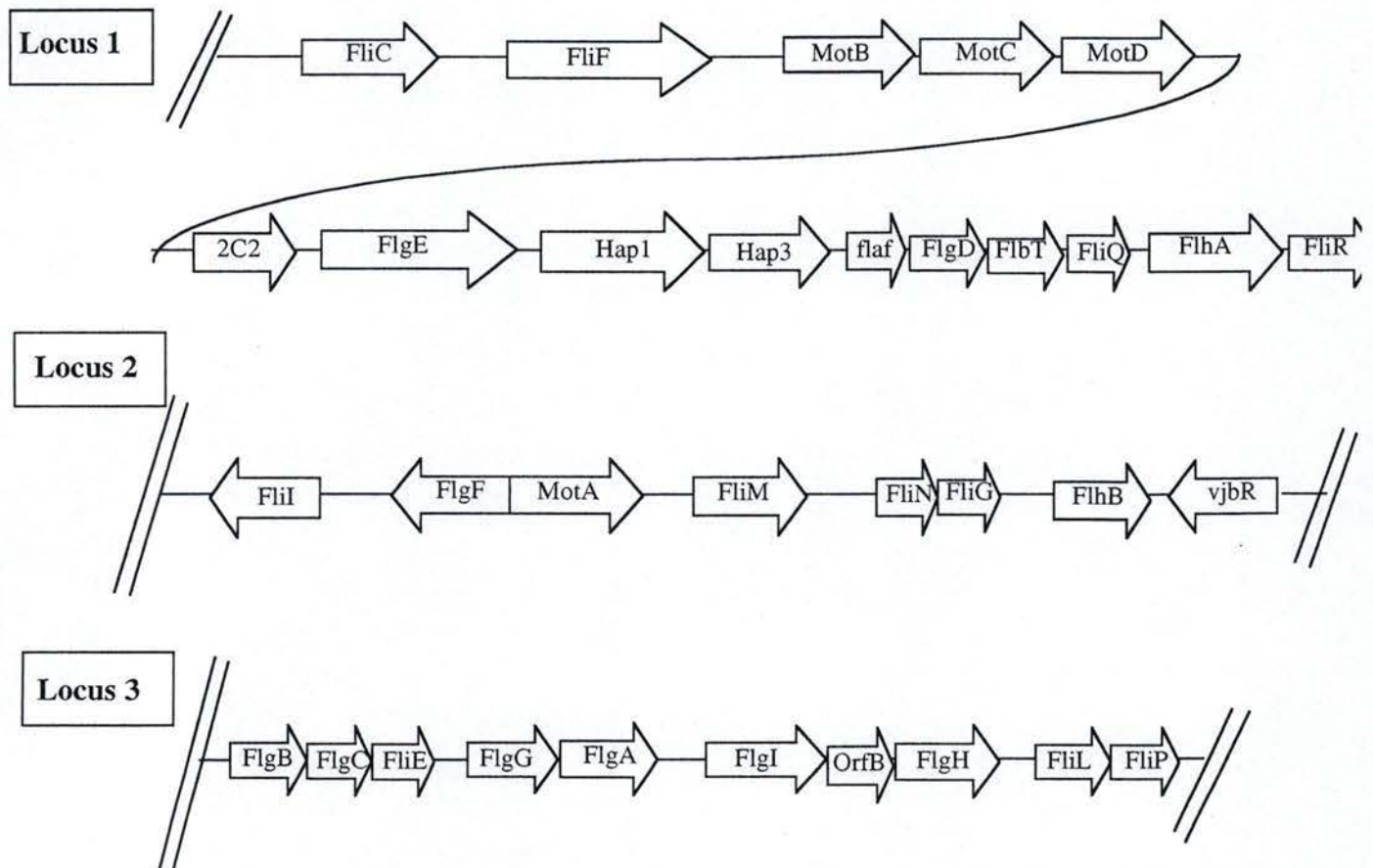


Figure 13 : représentation schématique de l'organisation chromosomique des loci flagellaires chez *Brucella*.
(d'après D. Fretin, thèse en cours)

Objectifs

D'après les données génomiques, *Brucella* sp. possède 28 gènes flagellaires. La technique STM a permis de mettre en évidence l'implication d'un de ces gènes flagellaires, *fliF*, encodant pour l'anneau MS, dans la virulence de *Brucella* (A. Dricot, mémoire 2000). La technique DFI a, quant à elle, permis de mettre en évidence l'induction de ce gène lors d'infection de macrophages. Ces données posent différentes questions :

- D'autres gènes flagellaires sont-ils exprimés ?
- Quelle est la régulation de l'expression de ces gènes ?
- Quelle est la fonction de ce système flagellaire ?

Seules les deux premières questions seront abordées au cours de ce mémoire.

Notre premier objectif est donc d'étudier l'expression de gènes flagellaires. Cet objectif nécessite l'identification de conditions d'induction de la biogenèse du flagelle. Nous avons privilégié les conditions *in vitro* sur base des constats suivants :

- l'organisation des loci flagellaires de *Brucella* est très proche de celle de *Sinorhizobium meliloti*,
- chez *S. meliloti*, la biogenèse flagellaire dépend du quorum sensing et est régulée par deux gènes homologues à des régulateurs de la famille LuxR, situés au niveau d'un locus flagellaire (Sourjik *et al.*, 2000).
- Chez *Brucella*, on trouve également un gène homologue à des régulateurs de cette famille à proximité du même locus flagellaire (*vjbR*). Ce régulateur intervient dans le quorum sensing et pourrait réguler l'expression du flagelle. Le quorum sensing étant dépendant de la densité de population, nous allons tester l'effet de cette densité sur l'expression de deux gènes flagellaires *fliC*, encodant pour la flagelline, et *flgE*, encodant pour le monomère du hook. Nous disposons en effet d'anticorps dirigés contre ces deux protéines composant la partie distale du flagelle.

Notre deuxième objectif est d'étudier la régulation de ces gènes flagellaires. Au cours de ce travail, nous nous concentrerons sur la régulation du gène *fliF* via deux approches. Une approche réalisée avec *a priori* comparera l'expression de *fliF* chez la souche sauvage et chez deux mutants de régulation :

- la souche délétée dans le gène *vjbR*
- une souche disruptée dans un gène homologue à un régulateur de réponse d'un système à deux composants. Ce gène se situe dans le locus flagellaire.

Cette expression sera étudiée soit en utilisant un système rapporteur GFP soit des anticorps dirigés contre la protéine FliF de *Caulobacter crescentus*.

Enfin, une approche réalisée sans *a priori* consistera à identifier des régulateurs du gène *fliF* grâce à une technique dérivée du promoteur probe. Cette technique nécessite la construction d'un vecteur qui sera réalisée au cours de ce travail.

Résultats

1. Etude de l'expression de la flagelline (FliC) et du monomère du hook (FlgE)

1.1. Etude de l'expression de la flagelline (FliC) et du monomère du hook (FlgE) dans une souche de *B. melitensis* 16M

1.1.1. Objectifs

Comme mentionné précédemment, deux gènes homologues à des régulateurs de la famille LuxR régulent la biogenèse flagellaire chez *Sinorhizobium meliloti*. Chez *Brucella*, on trouve également un homologue de ces régulateurs, *vjbR*, à proximité du régulon flagellaire. Ce gène est impliqué dans la virulence de la bactérie (Delrue, 2002). Nous émettons l'hypothèse que l'expression des gènes flagellaires est influencée par la densité de population bactérienne. Nous allons, grâce à la technique du western blot, tester l'expression de la flagelline et du monomère du hook sur des extraits réalisés à partir d'une souche de *Brucella melitensis* 16M Nal^R à différentes phases de croissance.

1.1.2. Réalisation des extraits protéiques

Les extraits protéiques totaux sont réalisés à partir d'une souche de *B. melitensis* 16M Nal^R cultivée en milieu 2YT liquide avec des prélèvements en phase de latence, en phase exponentielle et en phase stationnaire. Pour obtenir une culture en phase de latence, une préculture de 5 ml, incubée une nuit à 37°C, est diluée dans 100 ml de milieu de culture 2YT liquide de façon à obtenir une densité optique finale de 0,05 à une longueur d'onde de 590 nm. La phase de latence correspond à une période d'adaptation des bactéries pendant laquelle les cellules ne se divisent pas. Après 4 heures d'incubation, la densité optique est toujours de 0,05. Les bactéries sont donc bien en phase de latence. Dans ces conditions de culture, Taminiau *et al.* ont montré que des densités optiques comprises entre 0,1 et 0,9 correspondent à la phase exponentielle et qu'une densité supérieure ou égale à 1 correspond à la phase stationnaire (Taminiau *et al.*, 2002). Les prélèvements réalisés aux DO correspondant à ces différentes phases sont centrifugés et le culot est resuspendu dans du PBS. Les différentes

suspensions sont soumises à une température de 80°C pendant 2 heures de façon à tuer les bactéries. Les cellules sont ensuite disruptées. On obtient ainsi des extraits protéiques totaux pour les souches testées.

Les protéines contenues dans ces extraits sont ensuite dosées par la méthode de Bradford afin de réaliser les western blots avec une quantité identique de protéines. Les protéines sont déposées sur un gel SDS-PAGE puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Afin de vérifier si des quantités équivalentes de protéines ont bien été transférées sur la membrane, une coloration de Ponceau est réalisée.

1.1.3. Résultats des western blots

Dans un premier temps, nous avons effectué un western blot avec des anticorps dirigés contre la flagelline (figure 1). On observe une bande dans la piste contenant l'extrait protéique de la souche sauvage *B. melitensis* 16M en phase de latence, cette bande se trouvant à une taille correspondant à celle de la flagelline, c'est-à-dire 29 kDa. En revanche, on ne détecte rien dans les pistes contenant les extraits des souches en phase exponentielle et en phase stationnaire.

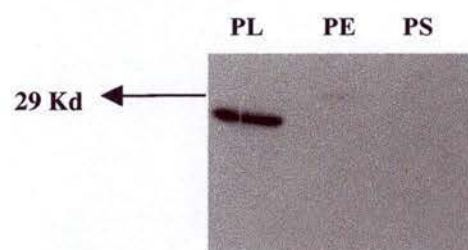


Figure 1: western blot réalisé sur les extraits protéiques issus de la souche sauvage de *Brucella melitensis* 16M à différentes phases de croissance.

PL : en phase de latence.

PE : en phase exponentielle.

PS : en phase stationnaire.

L'anticorps primaire utilisé est un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la flagelline.

L'anticorps secondaire utilisé est un anticorps anti-lapin couplé à la peroxydase (Amersham Pharmacia Biotech).

Dans un deuxième temps, nous avons effectué un western blot avec des anticorps dirigés contre le monomère du hook. Un résultat similaire à celui obtenu pour le western anti-flagelline observé, c'est-à-dire qu'on détecte l'expression du monomère du hook uniquement en phase de latence (donnée non présentée, mais voir aussi figure 2B).

1.1.4. Conclusions

Suite à ces expériences, nous pouvons conclure que, dans les conditions testées, la souche de *B. melitensis* 16M exprime la flagelline et le monomère du hook uniquement en phase de latence et donc que, dans les conditions testées, la biogenèse flagellaire est bien dépendante de la densité de population.

1.2. Etude de l'expression de la flagelline et du monomère du hook dans une souche de *B. melitensis* 16M disruptée dans le gène *fliF*

1.2.1. Objectifs

Chez les bactéries flagellées, une des conséquences du caractère séquentiel de la biogenèse flagellaire est que la mutation d'un gène codant pour une pièce du flagelle entraîne l'interruption de l'assemblage du reste de la structure. L'expression des gènes flagellaires est donc concertée et hiérarchisée. Nous allons vérifier si l'expression de la flagelline et celle du monomère du hook sont concertées avec celle du gène *fliF* codant pour l'anneau MS. Nous avons donc effectué des western blots anti-flagelline et des western blots anti-hook sur des extraits protéiques totaux réalisés à partir d'un mutant transpositionnel de *B. melitensis* disruptée dans le gène *fliF* (*fliF**) à différentes phases de croissance.

1.2.2 Résultats du western blots

Alors que, comme signalé auparavant, une souche de *B. melitensis* 16M exprime la flagelline et le monomère du hook en phase de latence, on ne détecte rien dans les pistes contenant les

extraits de la souche disruptée dans le gène *fliF* que le test soit effectué avec des anticorps dirigés contre la flagelline ou avec des anticorps dirigés contre le monomère du hook (figure 2).

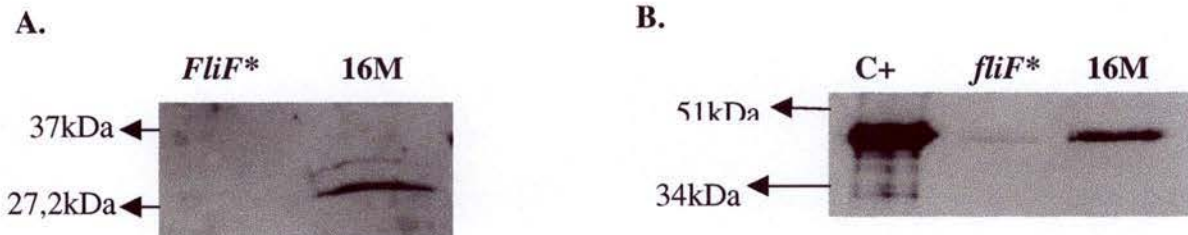


Figure 2 : A. western blot anti-FliC

*fliF** : extraits protéiques du mutant transpositionnel *fliF**

16M : extraits protéiques d'une souche de *B. melitensis* 16M en phase de latence.

L'anticorps primaire utilisé est un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la flagelline.

B. western blot anti-FlgE

C+ : contrôle positif (monomère du hook purifié)

*fliF** : extraits protéiques du mutant transpositionnel *fliF**

16M : extraits protéiques d'une souche de *B. melitensis* 16M en phase de latence.

L'anticorps primaire utilisé est un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le monomère du hook.

L'anticorps secondaire utilisé pour les deux western blots est un anticorps anti-lapin couplé à la peroxydase.

1.2.3 Conclusions

Suite à ces expériences, nous pouvons conclure que le mutant *fliF** n'exprime ni la flagelline ni le monomère du hook. L'expression de ces deux gènes est donc concertée avec celle du gène *fliF*.

1.3. Conclusions générales

Grâce à ces expériences, nous avons montré qu'une souche de *B. melitensis* 16M exprime la flagelline et le monomère du hook uniquement en phase de latence. De plus, l'expression de ces gènes est concertée et hiérarchisée avec celle du gène *fliF*. En effet, le mutant *fliF**

n'exprime aucune de ces deux protéines. On peut donc conclure qu'il existe un régulon flagellaire chez *B. melitensis*, l'expression de ce régulon étant liée, entre autres, à la densité de population bactérienne. A ce stade du travail, nous nous focaliserons sur la régulation du régulon flagellaire en découvrant les acteurs moléculaires qui établissent le lien entre la densité de population et l'enclenchement de la cascade flagellaire chez *Brucella*. Nous allons donc, dans la suite du travail, étudier la régulation du début de la cascade flagellaire, c'est-à-dire l'expression du gène *fliF*.

2. Etude de l'expression de *fliF* avec à priori

2.1. Postulat.

Nous avons montré que les gènes *fliC* et *flgE* s'expriment uniquement en phase de latence. Nous allons comparer l'expression du gène *fliF* à différentes phases de croissance dans une souche de *B. melitensis* 16M et dans divers mutants de régulation.

La figure 3 rappelle l'organisation chromosomique des loci flagellaires chez *Brucella*.

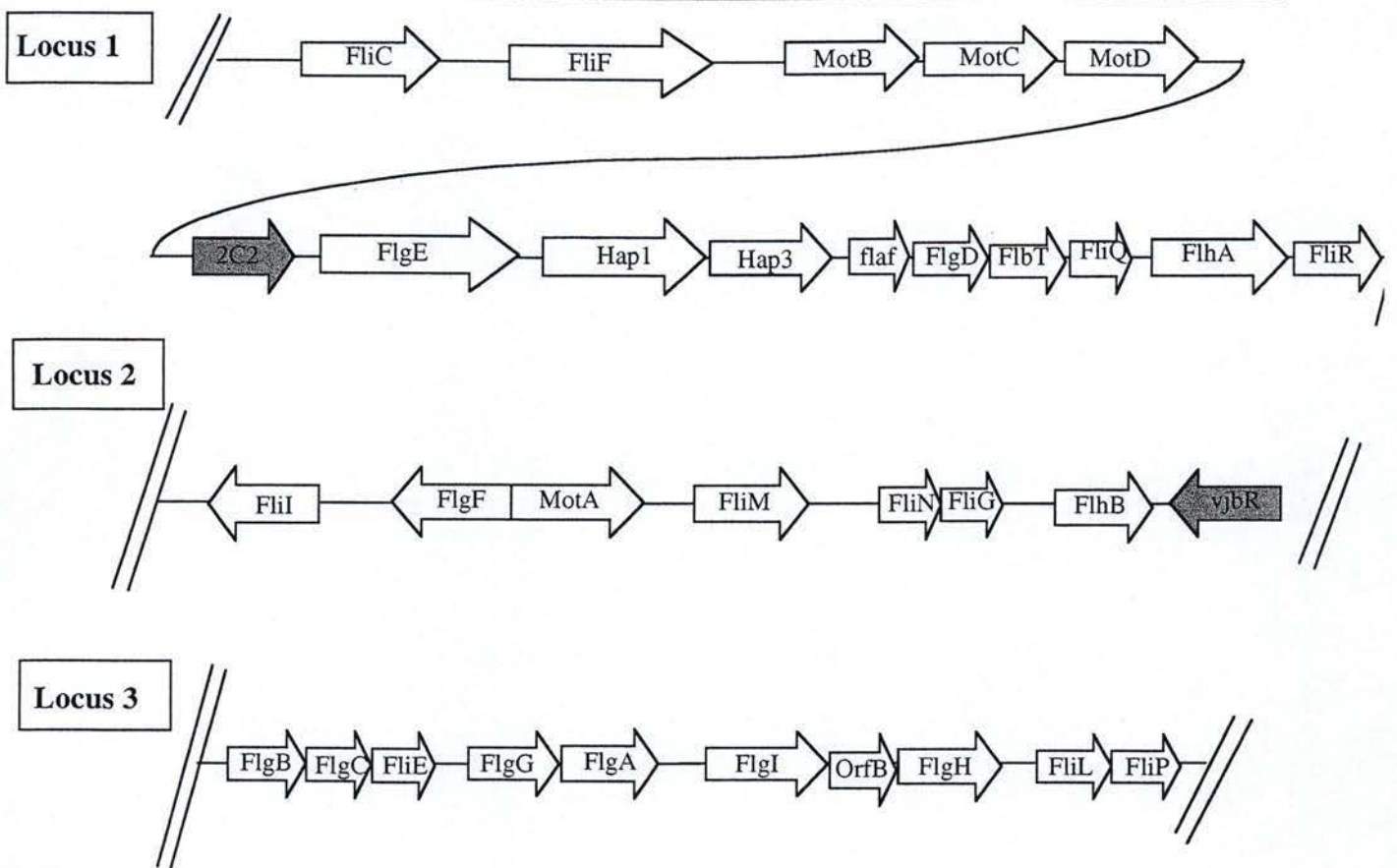


Figure 3 : représentation schématique de l'organisation chromosomique des gènes flagellaires chez *Brucella*. Les régulateurs transcriptionnels sont représentés par des flèches grises.

On observe que le gène *vjBR*, homologue à des gènes codant pour des régulateurs de la famille LuxR, se trouve à proximité du deuxième locus flagellaire. Nous émettons l'hypothèse que ce gène intervient dans la régulation des gènes flagellaires sur base de trois constats :

- chez *Sinorhizobium meliloti*, la biogenèse flagellaire est régulée par deux gènes homologues à des régulateurs de la famille LuxR (Sourjik *et al.*, 2000),
- l'expression de la flagelline et du monomère du hook est dépendante de la densité de population bactérienne,
- ce gène se trouve à proximité du régulon flagellaire.

Brucella possède dans son génome un deuxième gène homologue à des régulateurs de la famille LuxR nommé *babR* (B. Taminiau, thèse en cours). Il est possible que ce gène intervienne aussi dans la régulation des gènes flagellaires.

On observe également que le gène *2C2*, homologue à un régulateur de réponse d'un système à deux composants, se trouve au niveau du premier locus flagellaire. Les systèmes à deux composants comportent habituellement un senseur et un régulateur de réponse, situés côte à côte sur le chromosome. La particularité du système *2C2* est de ne pas comporter de gène codant pour une protéine senseur à proximité du gène codant pour le régulateur de réponse. Sa fonction n'est pas encore définie chez *Brucella* ni chez *Sinorhizobium* qui possède un homologue de ce système. Vu la localisation de ce gène, il est possible que les gènes flagellaires soient régulés par ce facteur.

Nous envisageons donc d'étudier l'expression de *fliF* dans ces 3 mutants et comparer cette expression à celle de la souche sauvage. Nous disposons au laboratoire des souches de *B.melitensis* mutantes pour ces 3 régulateurs :

- $\Delta vjbR$: délétée pour le gène *vjbR* (R-M. Delrue, thèse en cours),
- $\Delta babR$: délétée pour le gène *babR* (B. Taminiau, thèse en cours)
- $2C2^d$: disruptée pour le gène *2C2* (V. Haine, thèse en cours).

Pour réaliser ces expériences, nous allons utiliser deux outils :

- un système rapporteur, que nous devons construire, nous permettra d'étudier l'expression du promoteur du gène *fliF* chez différents mutants
- un anticorps polyclonal, utilisé en western blot, dirigé contre la protéine FliF de *Caulobacter crescentus* (Jenal and Shapiro, 1996)

2.2. Le système rapporteur: le plasmide pBBRI-GFP-CAT

2.2.1 Description du plasmide

Le plasmide que nous allons utiliser a été construit par S.Kölher qui a utilisé cet outil pour réaliser une étude par DFI (expression différentielle de la fluorescence) des gènes exprimés par *Brucella* lors d'infection de macrophages (Jubier-Maurin, 2001). Cette technique permet d'étudier, grâce à l'expression de la fluorescence (GFP), l'activité de promoteurs bactériens.

Le pBBRI-GFP-CAT (figure 4) est un plasmide dérivé du pBBRI-MCS, plasmide répliatif à faible nombre de copies chez *E. coli* et chez *Brucella* spp. S.Kölher a aménagé le plasmide d'origine pBBRI-MCS. Deux gènes rapporteurs ont été introduits dans ce vecteur :

- le gène *gfp* codant pour la GFP (green fluorescent protein),

- le gène *cat* codant pour une chloramphénicol acétyltransférase, cloné en aval du gène *gfp*. Le gène *cat* induit une résistance au chloramphénicol.

D'une part, ces deux gènes rapporteurs sont, par définition, dépourvus de promoteur. D'autre part, l'absence de terminateur à l'extrémité 3' du gène *gfp* conduit à une expression simultanée des deux gènes rapporteurs si le promoteur d'intérêt cloné en amont du gène *gfp* est induit.

Un des gènes rapporteurs (*cat*) induit une résistance au chloramphénicol. Or le marqueur de sélection du pBBRI-MCS est un gène conférant une résistance au chloramphénicol. Celui-ci a donc été remplacé par un gène codant pour une β -lactamase. L'expression de ce gène induit une résistance à l'ampicilline.

Dans ce plasmide, les gènes rapporteurs ont une expression basale, même en l'absence de promoteur d'intérêt cloné en amont de ces gènes. Dans ces conditions, il est difficile de déterminer si l'expression des gènes rapporteurs est due à un bruit de fond ou à l'induction d'un promoteur d'intérêt cloné en amont de ces gènes.

Plusieurs modifications ont donc été apportées au plasmide d'origine. Dans un premier temps, les promoteurs du gène *lacZ* et les promoteurs T3 et T7¹ se trouvant sur ce plasmide ont été délétés afin d'éliminer les risques d'activation incontrôlée des gènes rapporteurs.

Cependant, lorsque le plasmide est introduit dans *Brucella*, on constate que les gènes rapporteurs ont de nouveau une faible expression basale. Pour pallier ce bruit de fond, l'orientation de l'opéron artificiel *gfp-cat* a été inversée grâce à une digestion par *XhoI* suivie d'une self-ligation. En effet, deux sites *XhoI* se trouvent de part et d'autre de l'opéron *gfp-cat*.

Un site unique *BglIII* est présent parmi les sites de restriction du MCS, situé en amont des gènes rapporteurs, ce qui permet de cloner des fragments d'ADN chromosomique partiellement digéré par *Sau3A* et de construire une banque génomique. Lorsque le fragment d'ADN comporte une région promotrice activée, les gènes rapporteurs sont exprimés induisant une résistance au chloramphénicol de la bactérie ainsi que l'expression de la fluorescence (Ouahrani-Bettache *et al.*, 1999).

¹ Ces promoteurs sont reconnus par la polymérase des phages T3 et T7 respectivement.

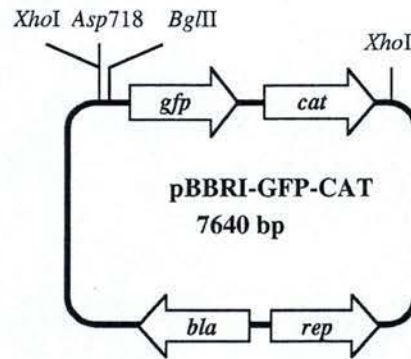


Figure 4 : représentation schématique du plasmide pBBRI-GFP-CAT

2.2.2. Objectif

Le but de la manipulation est d'étudier l'expression du gène *fliF* chez différentes souches à différentes phases de croissance.

Les souches étudiées sont les suivantes :

- la souche *B. melitensis* 16M.
- la souche *B. melitensis* 16M $\Delta vjBR$.
- la souche *B. melitensis* 16M 2C2^d.

Le promoteur du gène *fliF* sera donc cloné en amont des gènes rapporteurs du pBBRI-GFP-CAT décrit précédemment. Cette construction sera introduite dans les souches citées ci-dessus.

2.2.3. Constructions du plasmide pBBRI-GFP-CAT *fliFp*

La région contenant potentiellement le promoteur du gène *fliF* a été défini comme étant les 1000 bp situées dans la région intergénique entre l'ORF de *fliC* et l'ORF de *fliF*.

a. Préparation de l'insert

Le promoteur du gène *fliF* a été amplifié par PCR. La séquence des oligonucléotides a été définie de manière à obtenir un site de restriction *Asp718* en amont du promoteur de *fliF* et un site de restriction *BglIII* en aval de ce promoteur (figure 5).

a. 5'-**ggtacccc**ggtcttcgtatttctg-3'
 b. 5'-**agatct**gccatcctgttgaacgcaag-3'

Figure 5: amorces utilisées pour l'amplification PCR du promoteur du gène *fliF*.

- a. Amorce amont comportant le site *Asp718* représenté en gras.
 b. Amorce aval comportant le site *BglIII* représenté en gras

Ces sites ainsi positionnés nous permettront de réaliser un clonage directionnel du promoteur de *fliF* devant les gènes rapporteurs. Le fragment amplifié a une taille de 1001 bp.

Afin de faciliter le clonage du fragment PCR dans le pBBRI-GFP-CAT, un clonage intermédiaire a été effectué dans le plasmide pGEM-TEasy (Promega) (figure 6). Le produit de ligation a été introduit dans une souche *E. coli* DH10B et les clones contenant le plasmide ont été sélectionnés sur un milieu contenant de l'ampicilline. L'addition de X-gal et d'IPTG dans le milieu de sélection permet d'identifier les souches qui contiennent un plasmide recombinant grâce à un test blanc-bleu. Les colonies blanches sont donc sélectionnées. Après minipréparation, la présence de l'insert a été vérifiée grâce à une restriction *EcoRI* (figure 6A). Une digestion par cette enzyme doit générer 3 fragments. Le premier de 3015 bp correspond à la matrice du plasmide. Les deux autres fragments correspondent au fragment PCR cloné restreint. Le premier doit avoir une taille de 200 bp et l'autre une taille de 800 bp. On observe les 3 fragments à la taille attendue.

Une double restriction par *BglIII* et *Asp718* a ensuite été effectuée sur le plasmide pGEM-T *fliFp*. Cette double restriction doit générer un fragment de 3015 bp (correspondant à la

matrice) et un fragment d'environ 1 Kb (correspondant au fragment PCR cloné). Sur le gel, on observe bien les deux fragments à la taille attendue. Le fragment de 1000 bp est récupéré sur gel. (figure 6B).

b. Préparation de la matrice du plasmide pBBRI-GFP

La matrice de ce plasmide possède un site de restriction *Asp*718 suivi d'un site de restriction *Bgl*III en amont des gènes rapporteurs. On restreint la matrice avec ces deux enzymes. Cette double restriction nous permettra de réaliser un clonage directionnel de l'insert (figure 7). Le produit de ligation a été introduit dans *E.coli* DH10B. Les bactéries contenant le plasmide ont été sélectionnées sur un milieu contenant de l'ampicilline.

c. Les restrictions diagnostiques

Afin de vérifier que les clones sélectionnés contiennent bien le plasmide avec l'insert, une restriction par *Xho*I a été réalisée sur l'ADN obtenu à partir de minipréparations. On attend deux fragments, un d'une taille de 3305 bp contenant le promoteur du gène *fliF* ainsi que l'opéron *gfp-cat*, l'autre d'une taille de 5300 bp contenant la matrice.

On obtient bien les fragments à la taille attendue (figure 7). Cette construction a été vérifiée par séquençage. La séquence correspond bien à celle du promoteur de *fliF*.

Nous avons comparé le profil de restriction de ce plasmide avec celui du plasmide d'origine après une restriction par *Xho*I. Une restriction par cette enzyme du plasmide d'origine génère deux fragments : un d'une taille de 2305 bp, l'autre d'une taille de 5300 bp.

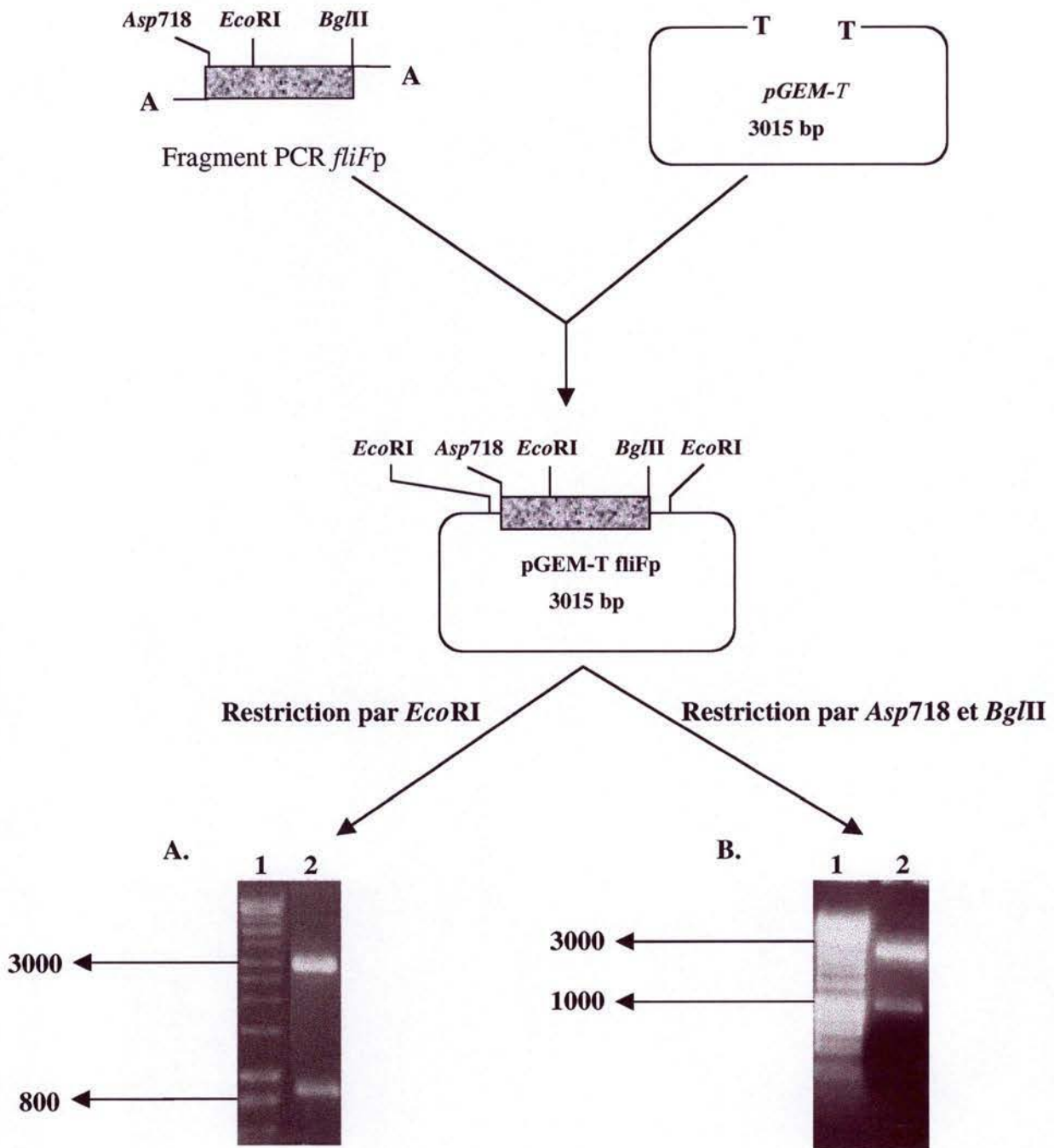


Figure 6 : le promoteur de *fliF* amplifié par PCR est cloné dans le pGEM-TEasy et la construction est vérifiée par restriction.

A. électrophorèse en gel d'agarose 1% de la restriction *EcoRI*.

Piste 1 : marqueur de taille moléculaire Hyper Ladder (Bioline).

Piste 2 : pGEM-TEasy *fliFp* restreint par *EcoRI*.

B. électrophorèse en gel d'agarose 1% de la restriction *Asp718/BglII*.

Piste 1 : marqueur de taille moléculaire Hyper Ladder (Bioline).

Piste 2 : pGEM-TEasy *fliFp* restreint par *XhoI*. Le fragment de 1000 bp correspondant au promoteur de *fliF* est récupéré sur gel.

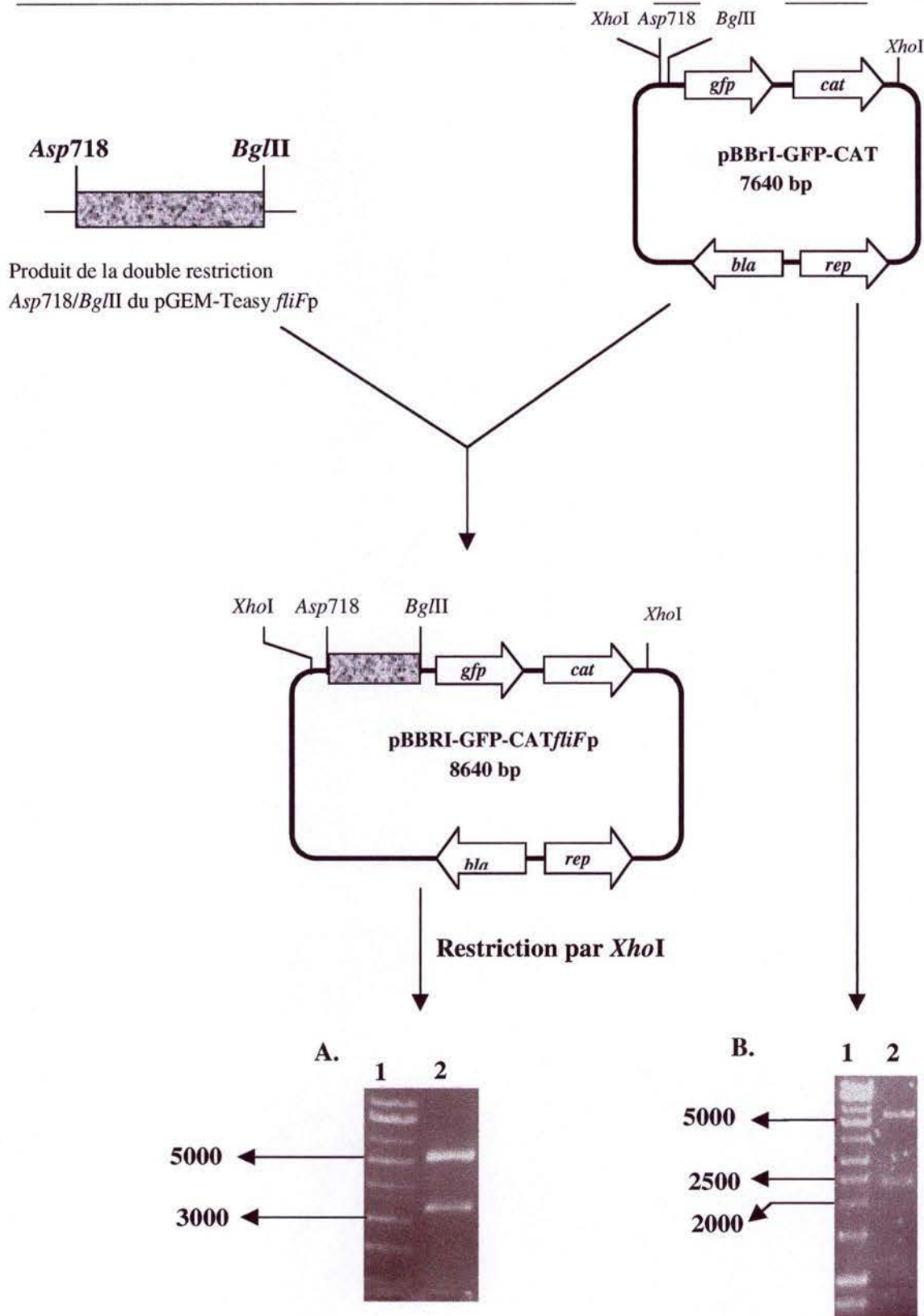


Figure 7 : clonage directionnel du promoteur de *fliF* est cloné dans le plasmide pBBRI-GFP-CAT et restrictions diagnostiques sur la construction.

- A. électrophorèse en gel d'agarose 1% de la restriction *XhoI*.
 - Piste 1 : marqueur de taille moléculaire Hyper Ladder (Bioline).
 - Piste 2 : pBBRI-GFP-CAT *fliFp* restreint par *XhoI*.
- B. électrophorèse en gel d'agarose 1% de la restriction *XhoI* sur la matrice vide.
 - Piste 1 : marqueur de taille moléculaire Hyper Ladder (Bioline).
 - Piste 2 : pBBRI-GFP-CAT restreint par *XhoI*.

2.2.4. Evaluation de l'expression des gènes rapporteurs

2.2.4.1. Le pBBRI-GFP-CAT

Pour étudier l'induction d'un promoteur via l'expression de gènes rapporteurs, il est nécessaire de vérifier que les gènes rapporteurs ne s'expriment pas lorsque le plasmide ne contient pas de promoteur cloné en amont de ces gènes. Le pBBRI-GFP-CAT a été introduit dans une souche de *B.melitensis* 16M.

Dans un premier temps, nous avons testé cette souche sur milieu 2YT agar contenant une concentration de 20 µg/ml de chloramphénicol, ce qui est la concentration classiquement utilisée pour sélectionner les souches d'*E.coli* contenant un plasmide porteur du gène *cat*. On observe que la souche ne se développe pas sur ce type de milieu.

Dans un deuxième temps, nous avons observé cette souche en phase de latence et en phase stationnaire en microscopie confocale, afin de vérifier qu'elle n'exprime pas la protéine GFP. Un marquage du LPS des *Brucella* a été effectué. Les cellules sont d'abord traitées avec un anticorps primaire dirigé contre le LPS de *Brucella*, puis avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (le Texas-red). Nous avons effectué ce type de marquage afin de vérifier que la fluorescence observée est bien due à une expression de la GFP par la bactérie et non à une autofluorescence. Ceci permet également une colocalisation du signal observé et de la bactérie. On n'observe aucune expression de la GFP par cette souche, ni en phase de latence ni en phase stationnaire (donnée non présentée).

On a donc montré qu'une souche contenant le plasmide vide (dépourvu de promoteur cloné devant les gènes rapporteurs) n'exprime aucun des gènes rapporteurs. Une expression des gènes rapporteurs sera donc due à la présence d'un promoteur induit cloné en amont des gènes rapporteurs et non à une expression basale de ceux-ci. L'utilisation de ce plasmide pour l'étude du promoteur de *fliF* s'avère donc adéquate.

2.2.4.2. le pBBRI-GFP-CAT *fliFp*

a. La souche *B.melitensis* 16M

Nous avons introduit ce plasmide dans une souche de *B. melitensis* 16M afin d'étudier l'expression de *fliF* à différentes phases de croissance.

Dans un premier temps, nous avons testé cette souche sur un milieu 2YT agar contenant 20 µg/ml de chloramphénicol. On observe que cette souche se développe sur ce type de milieu.

Dans un deuxième temps, nous avons observé cette souche en phase de latence et en phase stationnaire en microscopie confocale. On constate que la souche observée en phase de latence exprime la GFP (figure 8). En revanche, les *Brucella* observées en phase stationnaire n'expriment pas cette protéine (donnée non présentée).

Les résultats obtenus grâce à la microscopie confocale suggèrent que *B. melitensis* 16M n'induit le promoteur du gène *fliF* que lorsqu'elle se trouve en phase de latence. Ce plasmide est donc un outil intéressant pour l'étude de la régulation transcriptionnelle de différents gènes.

Au laboratoire, nous disposons des souches mutantes 2C2^d. Nous allons donc tester l'expression du gène *fliF* dans cette souche.

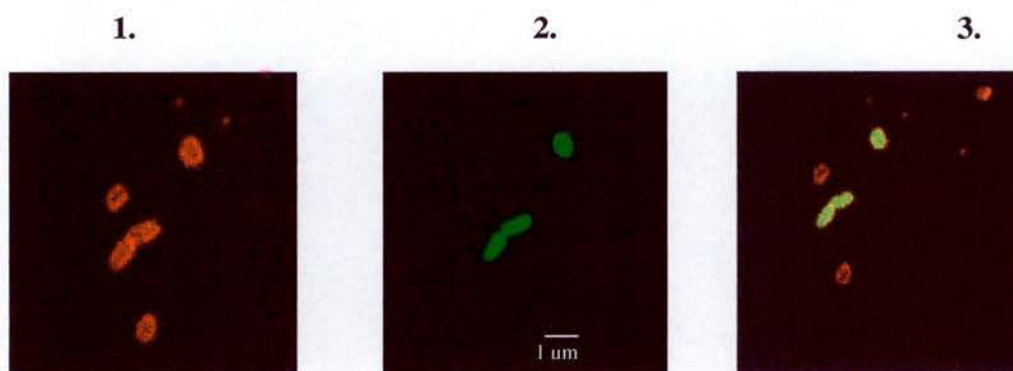


Figure 8: observation en microscopie confocale de *B.melitensis* 16M contenant le plasmide pBBRI-GFP-CAT *fliFp*.

1. *B. melitensis* 16M en phase de latence marquée au niveau du LPS.
2. Expression de la GFP par cette même souche.
3. Superposition des deux images.

b. la souche 2C2^d

Nous avons introduit le plasmide pBBRI-GFP-CAT *fliFp* dans cette souche par conjugaison. Celle-ci a ensuite été testée sur milieu 2YT agar contenant 20 µg/ml de chloramphénicol. On observe que cette souche se développe sur ce type de milieu.

Par la suite, nous avons observé cette souche en microscopie confocale (figure 9). On constate que la souche n'exprime aucune fluorescence que ce soit en phase de latence ou en phase stationnaire (donnée non présentée).

On remarque donc que l'expression du gène rapporteur *cat* ne coïncide pas avec l'expression du gène rapporteur *gfp*. Il est possible que le promoteur de *fliF* cloné en amont de ces gènes soit induit de manière faible mais constitutive. Cette faible induction serait suffisante pour initier l'expression du gène *cat* mais pas pour initier celle du gène *gfp*.

Les résultats obtenus en microscopie confocale suggèrent que dans la souche 2C2^d, le promoteur du gène *fliF* n'est pas induit et que le gène 2C2 intervient dans la régulation du gène *fliF*.

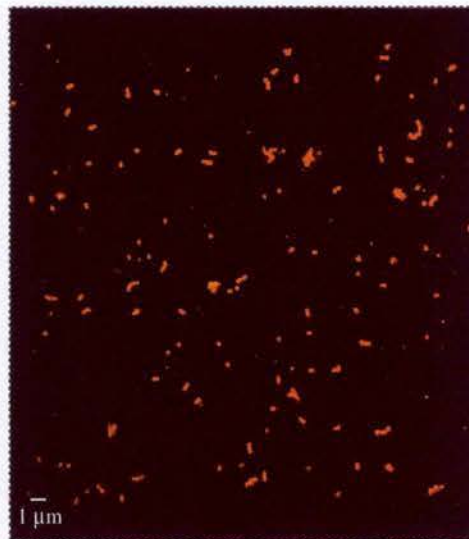


Figure 9: observation en microscopie confocale de la souche 2C2^d contenant le plasmide pBBRI-GFP-CAT *fliFp* en phase de latence. Les bactéries sont marquées au niveau du LPS. On n'observe pas d'expression de la GFP. On observe ici la superposition des deux fluorescences.

Au laboratoire, une fusion traductionnelle du promoteur de *fliF* et du gène rapporteur *lac Z* α a été réalisée parallèlement à cette étude (S.Léonard, thèse en cours). Cette construction a été introduite dans une souche sauvage et dans le mutant *2C2*^d. Pour évaluer l'expression du gène rapporteur, un dosage de la β -galactosidase a été réalisé. Les résultats obtenus confirment nos données : à savoir que le mutant *2C2*^d n'exprime pas le gène *fliF*.

2.3. Détection de la protéine FliF par western blot

2.3.1. Objectifs

Les résultats obtenus en microscopie confocale montrent que le gène *fliF* est transcrit en phase de latence comme c'est le cas au niveau protéique pour la flagelline et le monomère du hook. Afin de détecter la production de la protéine FliF, nous avons voulu effectuer un western blot avec un sérum polyclonal anti-FliF sur des extraits protéiques provenant des différentes souches étudiées. Cependant, nous ne disposons pas d'anticorps dirigés contre la protéine FliF de *Brucella*. Nous avons donc utilisé des anticorps dirigés contre FliF de *Caulobacter crescentus*, une α -protéobactérie proche de *Brucella*.

2.3.2. Souches utilisées

Nous avons voulu montrer que l'utilisation de cet anticorps s'avère adéquate pour détecter la protéine FliF. Différents extraits protéiques totaux ont été utilisés pour réaliser le western blot.

Un dosage BCA a été réalisé afin de quantifier les protéines contenues dans chaque extrait. De cette façon, les western blots seront effectués avec une quantité identique de protéines pour chaque échantillon. Les protéines sont déposées sur un gel SDS-PAGE puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Nous confirmons que des quantités équivalentes de protéines ont bien été transférées sur la membrane avec une coloration de Ponceau.

Le premier extrait testé est un extrait protéique total de *C. crescentus*. Le deuxième extrait testé est réalisé à partir du mutant transpositionnel *fliF*^{*}. Théoriquement, le transposon se trouvant au début du gène *fliF*, cette souche n'exprime pas la protéine FliF. On ne doit donc pas détecter la protéine FliF ou alors une version tronquée de la protéine lors du western blot dans les pistes correspondant à ces extraits.

2.3.3. Résultats du Western Blot

Les résultats sont présentés à la figure 11.

Pour l'extrait protéique total de *Caulobacter crescentus* (*Cc*), on observe un signal à une taille de 59 kDa ce qui correspond à la taille de la protéine FliF ainsi que des bandes additionnelles. Ceci suggère que le sérum polyclonal anti-FliF n'est pas spécifique de la protéine FliF de *C. crescentus*. En effet, d'autres protéines du lysat de *C. crescentus* sont reconnues.

On observe également plusieurs bandes dans les pistes nommées 16M PL et PS correspondant respectivement aux extraits obtenus à partir de la souche de *B. melitensis* 16M en phase de latence et en phase stationnaire. Au niveau des pistes nommées *fliF** PL et PS correspondant aux extraits réalisés à partir du mutant transpositionnel *fliF**, on observe un profil de marquage comparable à celui observé dans les pistes contenant les extraits de *B. melitensis* 16M non mutée.

Lorsqu'on observe la séquence génomique du gène *fliF* chez *B. melitensis*, on remarque la présence d'un codon stop. La présence de ce codon pourrait générer la production d'une partie seulement de la protéine FliF d'une taille de 24,4 kDa. La partie du gène située après le codon stop ne serait pas traduite. On n'observe aucune bande de 24,4 kDa sur le western blot.

Chez certaines souches d'*E. coli*, la présence d'un codon TAG (codon stop) ne va pas toujours de pair avec l'arrêt de la traduction de l'ARNm. En effet, ces bactéries produisent un ARNt appelé supE. Celui-ci reconnaît spécifiquement le codon TAG et ajoute au peptide naissant une glutamine au lieu de stopper la traduction de la protéine. On ignore si *Brucella* possède ce système et est capable de traduire la protéine FliF en entier malgré le codon TAG. Si ce codon stop n'est pas totalement effectif chez *Brucella*, on attend une taille de 59 kDa pour la protéine FliF (figure 10). On observe aucune bande correspondant à cette taille sur le western blot. Notons que chez les autres espèces de *Brucella*, le gène *fliF* ne contient pas de codon stop. Le codon correspondant chez ces espèces est celui d'une glutamine.

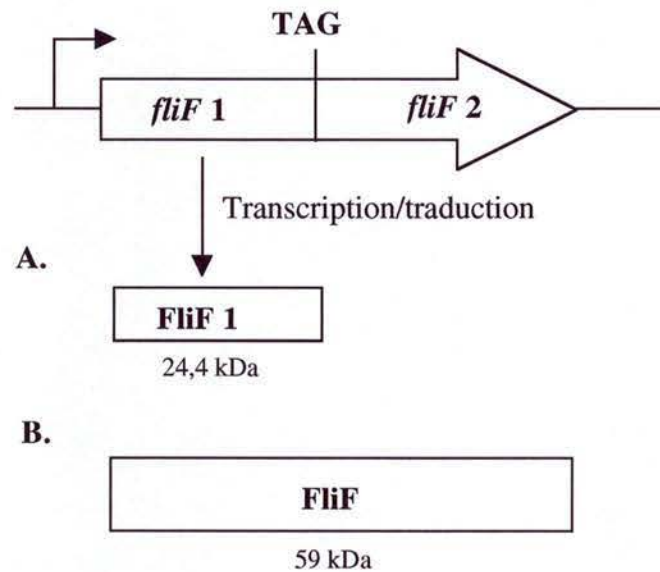


Figure 10 : représentation schématique du gène *fliF* de *B.melitensis* 16M.
 A. le codon stop est effectif. On obtient une protéine d'une taille de 24,4KD.
 B. Le codon stop n'est pas effectif. On obtient une protéine de 59 KD.

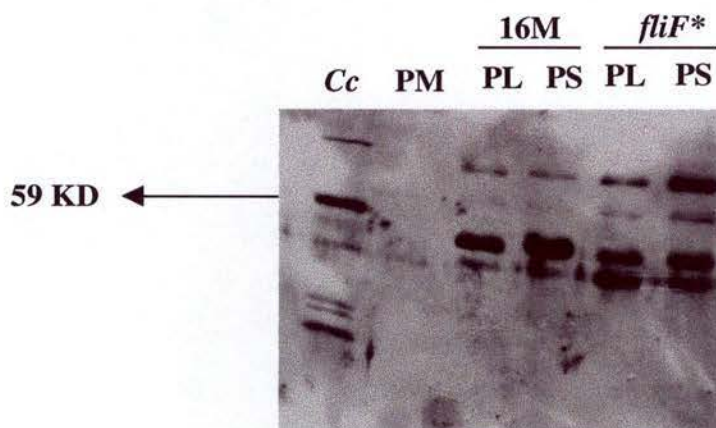


Figure 11 : western blot anti-FliF réalisé sur des extraits protéiques totaux de :
 Cc: *Caulobacter crescentus*.
 PM : marqueur de masse moléculaire (ne donne pas de signal sur le film)
 16M PL : *B. melitensis* 16M en phase de latence.
 16M PS : *B. melitensis* 16M en phase stationnaire.
*fliF** PL : *B. melitensis* 16M *fliF** en phase de latence.
*fliF** PS : *B. melitensis* 16M *fliF** en phase stationnaire.
 L'anticorps primaire utilisé est un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la protéine FliF de *Caulobacter crescentus*. L'anticorps secondaire utilisé est un anticorps anti-lapin couplé à la peroxydase.

2.3.4. Conclusions

D'une part, on observe que le profil de migration ne varie pratiquement pas dans les extraits de *B. melitensis* en phase de latence et en phase stationnaire. Or, les résultats obtenus en microscopie confocale suggèrent que le gène *fliF* n'est exprimé qu'en phase de latence.

Bien que légèrement différent, le profil de migration du mutant *fliF** est très semblable au profil de la souche de *B. melitensis* 16M en western blot, et aucune bande aux poids moléculaires attendus n'est observée. L'absence de reconnaissance de la protéine FliF de *Brucella* par l'anticorps hétérologue pourrait être dû au faible pourcentage d'identité (28%) et de similarité (50%) entre les protéines FliF des deux espèces. L'utilisation d'anticorps homologues seraient sans doute plus appropriée.

Nous pensons donc que l'anticorps dirigé contre la protéine FliF de *Caulobacter crescentus* reconnaît des protéines de manière aspécifique sur des extraits totaux de *B. melitensis* 16M.

3. Recherche d'un régulateur du gène *fliF* sans a priori

3.1 Principe

La stratégie qui a été retenue est d'évaluer l'induction du promoteur de *fliF* grâce à un rapporteur dans des souches contenant une banque surexprimant des ORF's de *Brucella* (figure 12).

Deux constructions sont nécessaires à la réalisation de notre étude :

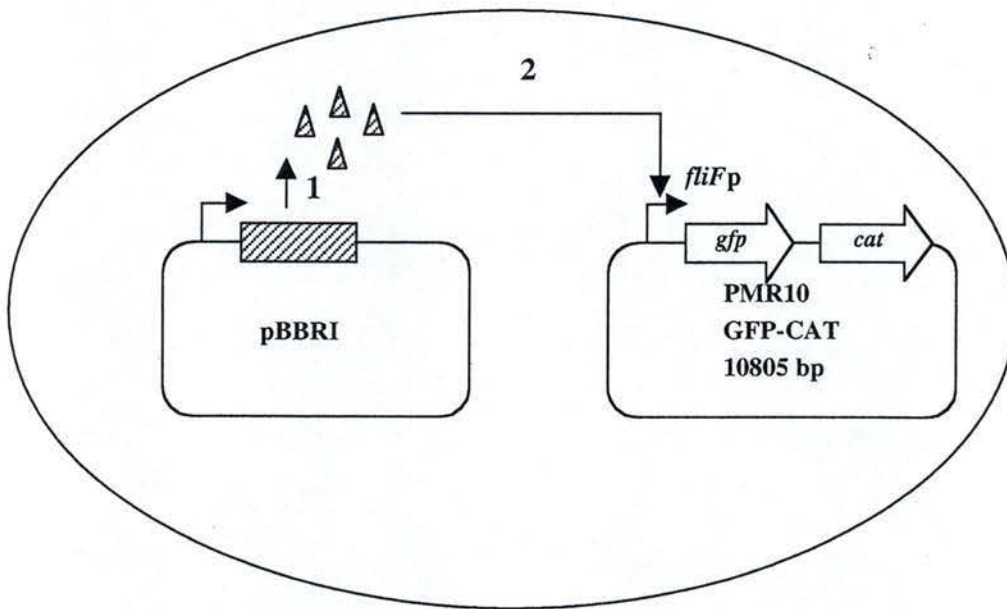
- Une banque génomique surexprimant des ORF's (disponible au laboratoire),
- un plasmide contenant le promoteur du gène *fliF* cloné en amont de deux gènes rapporteurs (*gfp* et *cat* codant respectivement pour la protéine GFP et pour une chloramphénicol acétyltransférase) : le pMR10 GFP-CAT.

La première étape de ce travail est de construire un plasmide contenant un gène rapporteur en amont duquel le promoteur du gène *fliF* sera cloné. Il est primordial que ce plasmide soit compatible avec le plasmide de la banque. En effet, deux plasmides différents ayant la même origine de répllication ne peuvent cohabiter de façon stable dans une bactérie. La banque

d'ADN utilisée étant construite dans des plasmides pBBRI, il nous était impossible d'utiliser les constructions pBBRI-GFP-CAT précédentes pour cribler la banque. C'est pourquoi nous avons construit et testé un outil à partir du plasmide pMR10, qui peut cohabiter avec un plasmide pBBRI. En effet, le plasmide pMR10 possède une origine de répllication RK2 oriV tandis que le plasmide pBBRI possède une origine de répllication *rep*.

Ce rapporteur nous permettrait d'identifier les régulateurs contrôlant l'expression du gène *fliF*. En effet, si le plasmide de la banque contient un fragment codant pour un activateur du gène *fliF*, celui-ci se fixera sur le promoteur de *fliF* et conduira à l'activation du gène rapporteur ce qui induira une résistance au chloramphénicol.

A.



B.

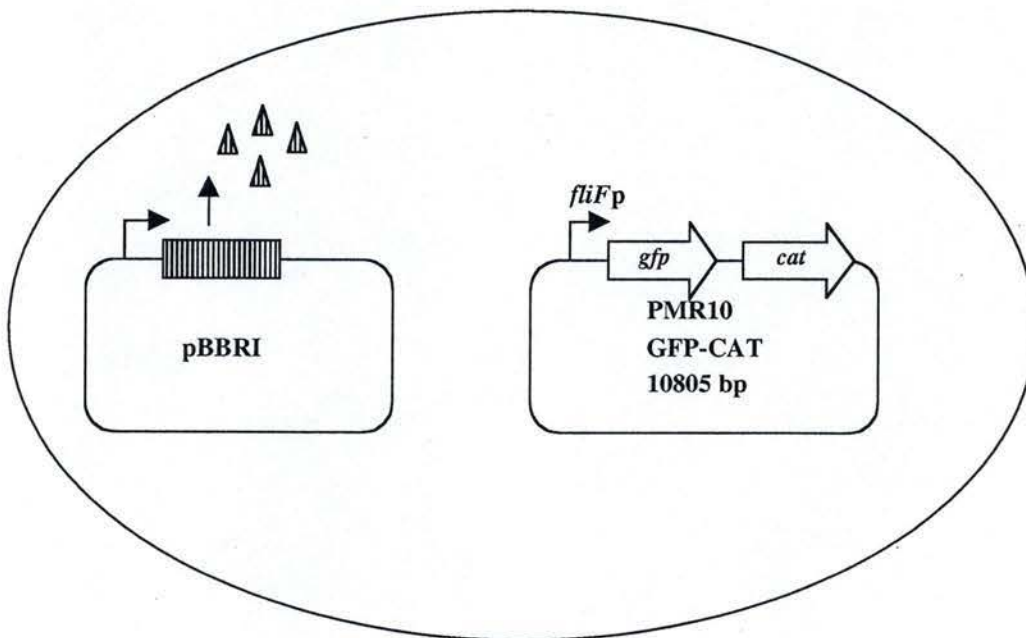


Figure 12 : représentation schématique du principe de la stratégie adoptée pour l'étude de l'expression de *fliF*.

A. 1. Le fragment de la banque code pour un activateur de *fliFp*.

2. L'activateur se fixe sur le promoteur *fliFp* qui active alors l'expression des gènes rapporteurs. La cellule devient résistante au chloramphénicol.

B. Le fragment de la banque ne code pas pour un activateur de *fliFp*. Les gènes rapporteurs ne sont pas exprimés.

3.2. Description du plasmide pMR10

Ce plasmide est dérivé du plasmide pGL10. Il possède un site multiple de clonage dans le gène *lac Zα*. Il s'agit d'un plasmide à faible nombre de copies, répliquatif chez *Brucella*, *E. coli* et *C. crescentus* possédant un gène conférant une résistance à la kanamycine.

3.3. Constructions du plasmide pMR10-GFP-CAT

3.3.1. Constructions

Dans un premier temps, nous avons cloné l'opéron artificiel *gfp-cat* provenant du pBBRI-GFP-CAT dans un plasmide pMR10. Cette construction nous permettra de vérifier que le plasmide construit n'induit pas de résistance au chloramphénicol en absence de promoteur cloné en amont du gène *cat*.

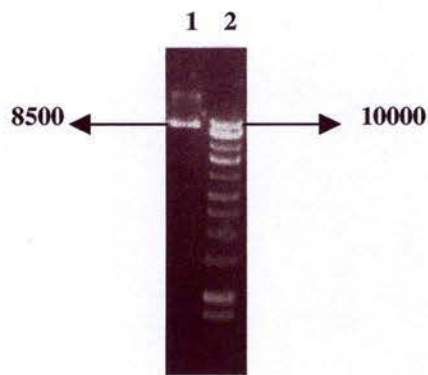
a. Préparation de l'insert

L'insert contiendra donc l'opéron artificiel *gfp-cat* dépourvu de promoteur, provenant du plasmide pBBRI-GFP-CAT. Ce dernier possède deux sites de restriction *XhoI* de part et d'autre de l'opéron *gfp-cat*. Une restriction de ce plasmide par *XhoI* permet de ressortir l'opéron *gfp-cat* d'une taille de 2305 bp. Le plasmide pBBRI-GFP-CAT a donc été restreint avec cette enzyme et le fragment d'intérêt a été récupéré sur gel (figure 13).

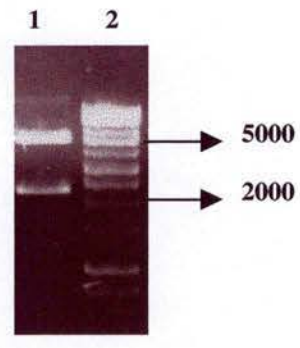
b. Préparation de la matrice

Le plasmide pMR10 possède quant à lui un site de restriction *XhoI* dans le MCS. Une restriction *XhoI* est donc réalisée sur le plasmide pMR10. Le plasmide linéarisé est ensuite récupéré sur gel (figure 13).

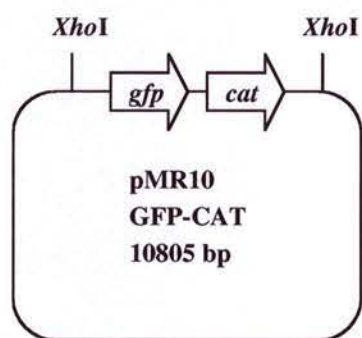
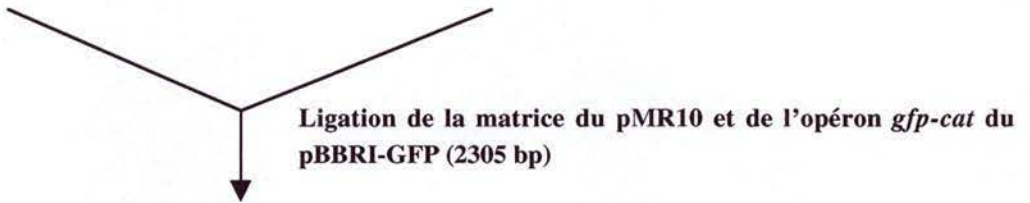
Le produit de ligation étant introduit dans une souche de *E. coli* DH10, un test blanc-bleu nous permet de sélectionner les clones portant un plasmide recombinant. Ceux-ci sont en plus sélectionnés sur un milieu contenant de la kanamycine.



électrophorèse en gel d'agarose
 Piste 1 : pMR10 restreint par *XhoI*.
 Piste 2 : marqueur de taille moléculaire HyperLadder (Bioline).



Gel d'électrophorèse 1%
 Piste 1 : plasmide pBBRI-GFP restreint par *XhoI*. Le fragment de 2305 bp est récupéré sur gel.
 Piste 2 : marqueur de taille moléculaire Hyper Ladder (Bioline)



Restriction par *XhoI*

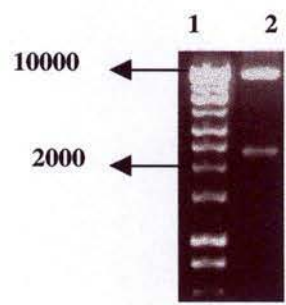


Figure 13: le plasmide linéarisé et l'opéron *gfp-cat* sont récupérés sur gel. L'opéron *gfp-cat* est ensuite cloné dans le plasmide pMR10. Le pMR10 *gfp-cat* est restreint par *XhoI*.
 Piste 1: marqueur de taille moléculaire Hyper Ladder (Bioline).
 Piste 2 : pMR10 *gfp-cat* restreint par *XhoI*.

3.3.2. Restrictions diagnostiques

Afin de vérifier que les plasmides sélectionnés contiennent bien l'insert, une restriction par *XhoI* est réalisée. Après restriction, on obtient bien les fragments de taille attendue c'est-à-dire 2305 bp pour le fragment correspondant à l'insert et 8500 bp pour le fragment correspondant à la matrice (figure 13).

La matrice linéarisée et l'insert possèdent tous deux des extrémités *XhoI* ; l'insert peut donc se liguer dans les deux sens. Si les gènes rapporteurs sont dans le même sens que le promoteur du gène *lacZα*, il y a un risque que l'expression de ces gènes rapporteurs soit influencée par ce promoteur.

Le sens de ligation de l'insert est donc vérifié grâce à une restriction diagnostique par l'enzyme *BglIII* (figure 14).

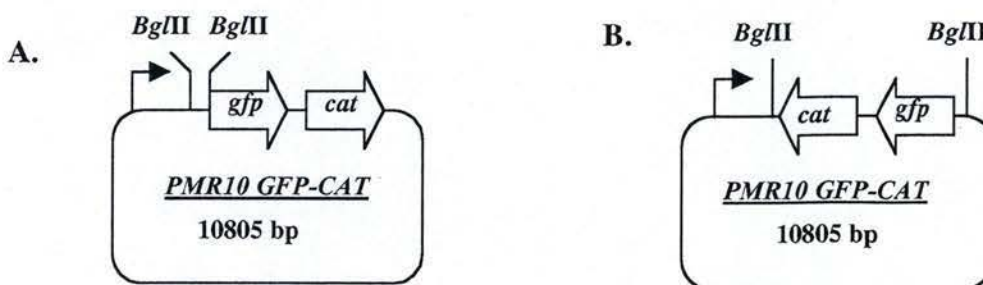


Figure 14 : A. l'opéron *gfp-cat* se trouve dans le sens du promoteur du gène *lacZ*.

B. l'opéron *gfp-cat* se trouve dans le sens opposé au promoteur du gène *lacZ*.

Si l'insert se trouve dans le même sens que le promoteur du gène *lacZα*, une restriction par *BglIII* doit générer un fragment d'une taille de 10750 bp et un fragment de 40 bp. Si en revanche l'insert se trouve dans le sens opposé à celui du promoteur du gène *lacZα*, une restriction par *BglIII* doit générer un fragment d'une taille de 2300 bp et un fragment de 8505 bp. Sur le gel, on observe un fragment de 2300 bp et un fragment de 8500 bp (figure 15). L'insert se trouve donc dans le sens opposé à celui du promoteur du gène *lacZα*. L'expression des gènes rapporteurs ne sera donc pas influencée par ce promoteur.

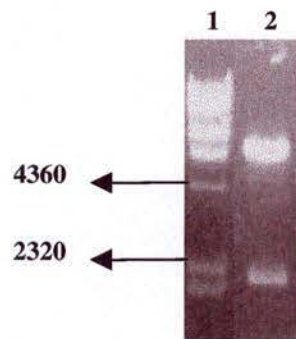


Figure 15: électrophorèse en gel d'agarose 1% du plasmide pMR10 GFP-CAT restreint avec *Bgl*III.
 Piste 1 : marqueur de taille moléculaire λ *Hind*III.
 Piste 2 : plasmide pMR10-GFP restreint avec *Bgl*III.

3.4. Les tests sur chloramphénicol

La construction obtenue a été introduite par conjugaison dans une souche de *Brucella melitensis* 16M et les souches contenant le plasmide ont été sélectionnées sur un milieu 2YT agar contenant 25 μ g/ml de kanamycine. Pour rappel, aucun promoteur n'a été cloné en amont des gènes rapporteurs. Les souches contenant le plasmide ne devraient donc pas être résistantes au chloramphénicol. Or ces souches poussent sur un milieu 2YT agar contenant 20 μ g/ml de chloramphénicol.

3.5. Conclusions

Les souches poussent sur un milieu contenant du chloramphénicol alors que le plasmide qu'elles contiennent n'ont pas de promoteur cloné en amont des gènes rapporteurs. Il nous est donc impossible d'utiliser cette construction dans son état actuel pour le crible d'une banque. Pour pallier cela, il serait nécessaire d'apporter différents aménagements à ce plasmide. Par exemple, l'orientation de l'opéron *gfp-cat* pourrait être inversée et le promoteur du gène *lac Z α* pourrait être délété. De cette manière, on éviterait l'activation incontrôlée des gènes rapporteurs par ce promoteur.

Discussion et
perspectives

Brucella est une bactérie décrite comme non mobile. Pourtant, 28 gènes homologues à des gènes flagellaires sont présents dans son génome. L'organisation génomique des loci flagellaires est très proche de celle de *Sinorhizobium meliloti*, une autre $\alpha 2$ -protéobactérie. De plus, les séquences des gènes flagellaires présentent de fortes homologues avec celles des gènes flagellaires de *Sinorhizobium*.

Au début de ce travail, seules quelques données concernant le gène *fliF* étaient disponibles. Ces données sont les suivantes :

- le gène *fliF* est impliqué dans la virulence de *Brucella*. En effet, le mutant transpositionnel *fliF** présente une atténuation de sa virulence en modèle murin et cellulaire (macrophages).
- Dans un modèle cellulaire, le promoteur de *fliF* est induit en macrophages.

La question est de savoir si d'autres gènes flagellaires sont exprimés.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence la production de deux protéines flagellaires : la flagelline (FliC) et le monomère du hook (FlgE) qui sont les protéines composant les parties distales du flagelle chez les autres bactéries flagellées. Il serait intéressant d'observer s'il existe une structure flagellaire chez *Brucella*. En marquant la flagelline et le monomère du hook grâce à des anticorps couplés à un fluorochrome, l'observation des *Brucella* en microscopie confocale nous permettrait de déceler une éventuelle structure flagellaire. En utilisant les anticorps dirigés contre les protéines de la partie distale (FliC et FlgE), on pourrait détecter un éventuel appendice flagellaire grâce à la technique ELISA réalisée sur des bactéries non lysées. La production d'anticorps homologues dirigés contre d'autres protéines flagellaires de *Brucella* est en cours. Alternativement, l'observation de *B. melitensis* 16M en phase de latence en microscopie électronique devrait également nous permettre de visualiser une éventuelle structure flagellaire.

Chez les bactéries flagellées, l'expression des parties distales d'un flagelle implique l'expression des parties proximales de cette structure. L'expression des gènes flagellaires est donc concertée et hiérarchisée. Chez *Brucella*, nous avons montré que l'expression des gènes *fliC* et *flgE* est concertée et hiérarchisée avec l'expression du gène *fliF*. En effet, le mutant

transpositionnel *fliF** n'exprime pas les protéines FliC et FlgE. Ces résultats suggèrent l'existence d'un régulon flagellaire chez *Brucella melitensis*.

L'existence d'un régulon flagellaire implique d'une part une régulation intrinsèque au système flagellaire et d'autre part une régulation faisant intervenir des facteurs internes et externes à la bactérie.

La régulation intrinsèque au régulon flagellaire est inconnue chez *Brucella*. *Caulobacter crescentus*, une autre α -protéobactérie, régule sa biogenèse flagellaire grâce à un facteur FlbT qui, rappelons-le, déstabilise les transcrits de type IV avant l'achèvement du corps basal et du hook (Aldridge and Hughes, 2002). *Brucella* possède, dans son génome, un gène homologue à *flbT* chez *Rhizobium* (D. Fretin, thèse en cours). Il est possible que ce facteur intervienne dans la régulation des gènes flagellaires chez *Brucella*. La construction d'un disruptant pour le gène *flbT* est en cours au laboratoire (D. Fretin, thèse en cours). De cette manière, l'implication de ce facteur dans la régulation des gènes flagellaires pourra être étudiée.

La régulation des gènes flagellaires par un facteur interne à la bactérie n'est pas décrite chez *Brucella*. *Caulobacter crescentus* régule également sa biogenèse flagellaire grâce au facteur CtrA (codé par un gène de classe I) intervenant aussi dans la régulation du cycle cellulaire. En amont des gènes flagellaires de cette bactérie, on trouve un motif nucléotidique reconnu par ce facteur. Le facteur CtrA est connu et étudié chez *Brucella*. Le motif reconnu par ce facteur a été défini chez cette bactérie. Cependant, on ne retrouve pas ce motif en amont des gènes flagellaires chez *Brucella*. Il serait cependant intéressant d'étudier l'effet de ce facteur sur la régulation des gènes flagellaires.

Nous avons montré, au cours de ce travail, que le facteur 2C2 intervient dans la régulation du gène *fliF*. Le 2C2 est, rappelons-le, un gène homologue à un régulateur de réponse putatif intervenant dans un système à deux composants chez *Rhizobium*. Cependant, comme chez *Rhizobium*, aucun gène codant pour une protéine senseur n'a été mis en évidence à proximité du gène 2C2 chez *Brucella* comme c'est le cas dans les systèmes à deux composants classiques. Il faudrait identifier le gène codant pour la protéine senseur grâce par exemple à la technique du double hybride. D'autres expériences sont envisagées pour étayer l'implication du gène 2C2 dans la régulation du gène *fliF*. La complémentation du mutant 2C2^d est en cours ainsi que la surexpression de ce facteur dans la souche sauvage. Cette surexpression permettra

peut-être d'induire l'expression du régulon dans toutes les phases de croissance. Vu la proximité phylogénétique de *Brucella* et *Rhizobium*, il nous semble aussi intéressant de vérifier si l'homologue du gène *2C2* chez *Rhizobium* est également impliqué dans la régulation de la biogenèse flagellaire.

La régulation des gènes flagellaires chez *Brucella* par des facteurs externes à la bactérie est également inconnue. Cependant, nous avons montré au cours de ce travail que l'expression de *fliC*, *flgE* et *fliF* est dépendante de la densité de population. Il serait donc intéressant d'étudier l'implication du quorum sensing dans la régulation des gènes flagellaires.

L'étude de l'expression des gènes flagellaires dans des souches délétées des gènes *babR* ou *vjbR* sera réalisée au laboratoire. Un autoinducteur (C12-HSL) a été isolé au laboratoire chez *B. melitensis* (Taminiau *et al.*, 2002). Il serait également intéressant de tester l'effet de l'addition de cet autoinducteur sur une culture en phase de latence au niveau de l'expression du gène *fliF*. De cette manière, nous pourrions établir un lien entre l'expression des gènes flagellaires et les différents acteurs du quorum sensing, déjà décrits chez *Brucella*.

Enfin, la fonction biologique de ces gènes flagellaires reste encore à définir. Sont-ils impliqués dans un appareil de sécrétion de type III ? Y a-t-il formation d'une structure flagellaire chez *Brucella* ? A quel niveau interviennent-ils dans le cycle infectieux de la bactérie ? La réponse à ces questions nous permettrait d'approfondir nos connaissances sur la virulence de ce microorganisme.

Matériel et méthodes

1. Souches bactériennes et plasmides.

1.1. Souches bactériennes

1.1.1. *E.coli* DH10B

Cette souche est utilisée pour la transformation par divers plasmides ou produits de ligation. Son génotype est le suivant :

F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*dlacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *deoR* *recA1* *endA1* *araD139* Δ (*ara, leu*)7697 *galU* *galK* λ *rpsL* *nupG*.

1.1.2. *E.coli* S17

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

1.1.3. *Brucella* sp.

1.1.3.1. *Brucella melitensis* 16M Nal^R

La souche de référence utilisée tout au long de ce travail est *B. melitensis* biovar 1 16M, phénotype Smooth, rendue résistante à l'acide nalidixique (Nal^R) au laboratoire de biologie moléculaire, FUNDP, Namur. L'agglutination se produit avec un anti-sérum M. Cette souche a été reçue de A. MacMillan et isolée sur le terrain en 1955.

1.1.3.2. *B. melitensis* 16M Nal^R Δ *vjbR*

Il s'agit d'une souche de *Brucella melitensis* 16M délétée du gène *vjbR*. Ce gène est remplacé par un gène induisant une résistance à la kanamycine.

1.1.3.3. *B. melitensis* 16M Nal^R 2C2^d

Il s'agit d'une souche de *B. melitensis* disruptée pour le gène 2C2 par l'intégration du plasmide pSK-OriT Kan (V.Haine, thèse en cours).

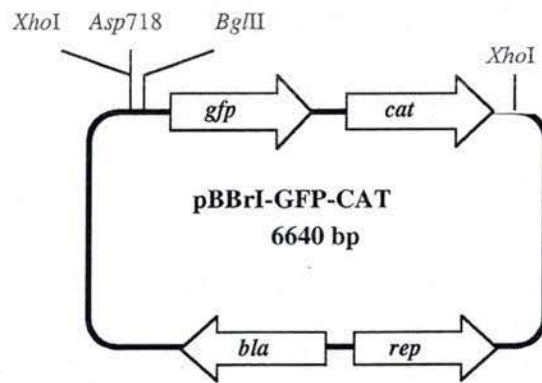


Figure 1 : représentation schématique du plasmide pBBRI-GFP-CAT

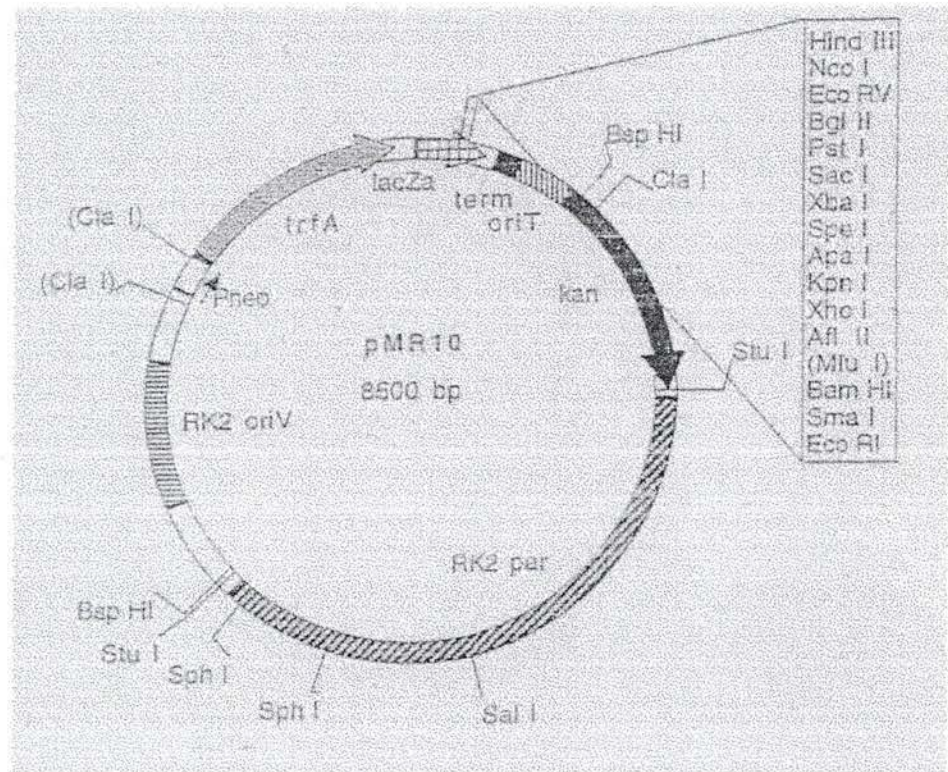


Figure 2 : représentation du pMR10.

1.1.3.4. Le mutant transpositionnel *fliF**

Il s'agit d'une souche de *Brucella melitensis* 16M contenant un transposon dans le gène *fliF* (A. Dricot, mémoire de licence).

1.2. Plasmides

1.2.1. pBBRI-GFP

Le plasmide pBBRI-GFP (figure 1) est un plasmide dérivé du pBBRI MCS, répliquatif low copy chez *Brucella* spp. et chez *E. coli*. Il possède un gène codant pour une β -lactamase induisant une résistance à l'ampicilline. Il possède également deux gènes rapporteurs: un gène *gfp* codant pour la green fluorescent protein suivi du gène codant pour une chloramphénicol acétyltransférase conférant une résistance au chloramphénicol. Ces deux gènes sont dépourvus de promoteur. L'absence de terminateur transcriptionnel à l'extrémité 3' du gène *gfp* résulte en l'expression simultanée de ces deux gènes rapporteurs si le promoteur cloné à l'extrémité 5' de la GFP est induit.

1.2.2. pMR10

Le pMR10 est un plasmide possédant un gène de résistance à la kanamycine, une origine de répllication RK2 et un gène codant pour l' α -peptide de la β -galactosidase. C'est au niveau de ce gène que se trouve le MCS, permettant ainsi l'utilisation du test blanc-bleu. Ce plasmide a été reçu de R. Roberts. Il est répliquatif chez *Brucella*, chez *E. coli* et chez *Caulobacter* (figure 2).

1.2.3. pGEM-T Easy (Promega)

Ce plasmide, commercialisé par Proméga, est spécialement conçu pour le clonage de fragments PCR. Il est linéarisé au niveau du MCS et porte une base T protrudante, ce qui permet de liguer avec une grande efficacité un fragment PCR. En effet, l'enzyme ADN polymérase *Taq* (Biotools) ajoute une base A aux extrémités 3' des fragments PCR. Ces fragments sont donc compatibles avec les extrémités du vecteur pGEM-T Easy (figure 3). De plus, ce dernier ne peut pas se liguer sur lui-même. Le site de clonage est situé dans le gène codant pour l' α -peptide de la β -galactosidase, ce qui permet de détecter les plasmides recombinants avec le test blanc-bleu. Le plasmide pGEM-T porte le gène codant pour une β -lactamase induisant une résistance à l'ampicilline. Ce gène nous sert de marqueur de sélection.

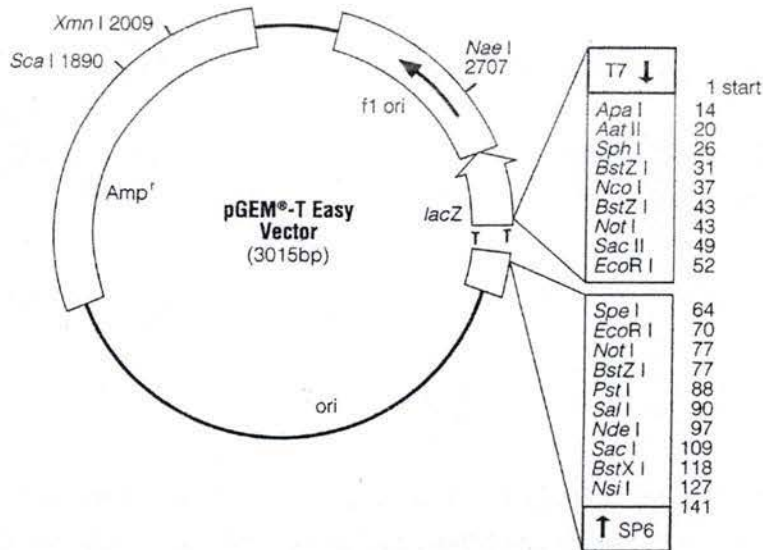


Figure 3 : représentation schématique du plasmide pGEM-Teasy.

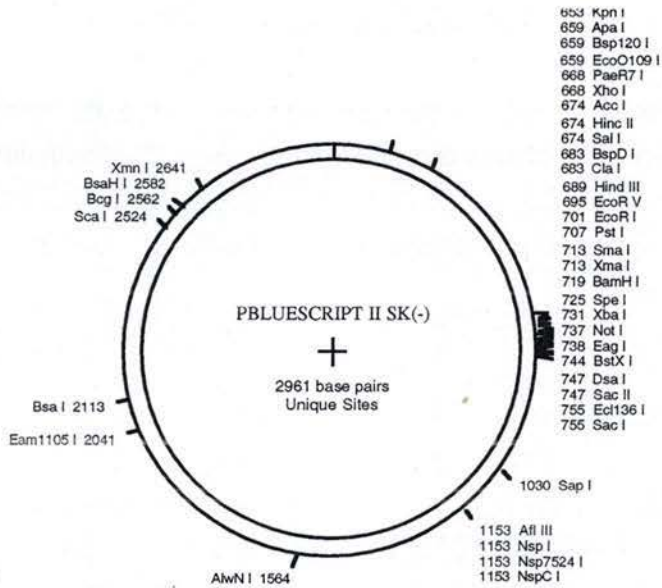


Figure 4 : représentation schématique du plasmide pSK OriT.

1.2.4. pSK-oriT

Ce plasmide est dérivé du plasmide pBluescript dans lequel une origine de transfert conjugatif oriT a été clonée. Il porte une origine de réplication ColE1 non fonctionnelle chez *Brucella*. C'est donc un plasmide suicide chez cette bactérie. Il possède également un gène codant pour une β -lactamase conférant une résistance à l'ampicilline (figure 4).

2. Milieux de culture utilisés et antibiotiques

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

2.1. Milieu Luria Bertani (LB)

a. Forme liquide :	- hydrolysate de caséine (peptone)	1 g/ 100ml
	- NaCl	0.5 g/ 100ml
	- Yeast extract	0.5 g/ 100ml
b. Forme solide :	- hydrolysate de caséine (peptone)	1 g/ 100ml
	- NaCl	0.5 g/ 100ml
	- Yeast extract	0.5 g/ 100ml
	- Agar	1,2 g/ 100ml

2.2. Milieu 2YT

a. Forme liquide :	- mix pour LB liquide	2 g/ 100ml
	- Hydrolysate de caséine (peptone)	0,6 g/ 100ml
	- Yeast	0,5 g/ 100ml
b. Forme solide :	- mix pour LB agar	3,2 g/ 100ml
	- Hydrolysate de caséine (peptone)	0,6 g/ 100ml
	- Yeast extract	0,5 g/ 100ml
	- Agar	0,1 g/ 100ml

2.3. Les antibiotiques

1. Ampicilline :	100 μ g/ml
2. Kanamycine :	25 μ g/ml
3. Streptomycine :	10 μ g/ml
4. Chloramphénicol :	20 μ g/ml

5. Acide nalidixique : 25 µg/ml

L'ampicilline a été utilisée pour sélectionner les souches portant le plasmide pBBri-GFP. La kanamycine a été utilisée pour sélectionner les souches portant le plasmide pMR10. La streptomycine a été utilisée pour sélectionner les *E. coli* S17. Le chloramphénicol a été utilisé pour sélectionner les souches portant le plasmide pBBri-GFP ou le plasmide pMR10 contenant un promoteur induit.

3. Manipulations relatives à l'ADN

3.1. Extraction d'ADN plasmidique

3.1.1. Minipréparations sur *E. coli*

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

Mode opératoire

- Ensemencer 5ml de milieu liquide (LB + antibiotiques) avec une colonie isolée
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation
- Centrifuger 1,5ml de la culture dans un eppendorf (pendant 5 minutes à 12500 rpm) et éliminer le milieu de culture
- Resuspendre le culot bactérien dans 300 µl de S1 (RNase A 100 µg/ml, Tris-HCL 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, à conserver à 4°C)
- Ajouter 300 µl de S2 (NaOH 200 mM, SDS 1%, à conserver à température ambiante) et mélanger doucement en retournant l'eppendorf, incuber 5 minutes à température ambiante
- Ajouter 300 µl de S3 (Kac 3.0 M pH 5,5, à conserver à 4°C) et mélanger doucement en retournant, incuber 10 minutes sur glace
- Centrifuger 15 minutes à 4°C (à 14000 rpm) et récupérer le surnageant
- Précipiter l'ADN en ajoutant 0.7 volume d'isopropanol, homogénéiser
- Centrifuger 15 minutes à 4°C (à 12500 rpm), éliminer le surnageant
- Laver l'ADN, en ajoutant 300 µl d'éthanol 70% et centrifuger 5 minutes à 4°C (à 12500 rpm). Éliminer prudemment l'éthanol
- Sécher le culot d'ADN
- Resuspendre dans 20 µl d'H₂O distillée stérile

3.1.2. Minipréparations sur *Brucella*

- ensemencer 5ml de milieu liquide (2 YT + antibiotiques) avec une colonie isolée
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation
- Centrifuger 1,5 ml de la culture dans un eppendorf (pendant 5 minutes à 13000rpm) et éliminer le milieu de culture
- Ajouter 0,2 ml de tampon A dilué (0,5 ml de tampon A + 4,5 ml d'eau distillée stérile) et resuspendre le culot
- Ajouter 0,4 ml de tampon de lyse (2 ml de NaOH 0,4 N + 2 ml de SDS à 4%). Fermer et mélanger lentement en retournant 15 à 20 fois.
- Laisser reposer 10 minutes à la température de la pièce
- Neutraliser avec 0,3 ml de tampon B. Agiter lentement 15 à 20 fois. Il se produit une floculation.
- Maintenir le tube dans la glace pendant 10 minutes.
- Centrifuger à 13000rpm pendant 10 minutes
- Récupérer le surnageant
- Ajouter un volume égal de phénol/chloroforme. Inverser le tube 15 à 20 fois.
- Centrifuger à 5000 rpm pendant 5 minutes à 4°C
- Prélever la phase aqueuse supérieure et transvaser dans un nouveau tube.
- Décongeler la RNAase 0,2%
- Précipiter avec 1 ml d'éthanol froid (-20°C) 100%, retourner 15 à 20 fois et laisser à -80°C pendant 10 minutes
- Centrifuger à 13500 rpm pendant 10 minutes à 0°C
- On obtient un petit culot blanchâtre (précipité). Décanter en vidant le surnageant et en passant un coton tige sur les parois
- Ajouter 50 µl d'eau pour resuspendre le culot puis 1 µl de RNAase.

3.1.3. Midipréparations sur *E. coli*

La midipréparation d'ADN comprend les mêmes étapes que la minipréparation d'ADN, mais permet d'obtenir une plus grande quantité d'ADN purifié. Cette technique comprend l'utilisation d'une colonne dans un kit commercial Nucleobond AX 100 échangeuse d'anions qui permet de préparer l'ADN plasmidique en éliminant les protéines, l'ARN et l'ADN génomique.

Mode opératoire

- Préculture : ensemencer 5 ml de milieu liquide (LB+antibiotiques) avec une colonie bactérienne
- Ensemencer avec 25 à 100 ml de ce même milieu liquide avec la préculture
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation

- Culoter la culture à 3000 rpm pendant 15 minutes, éliminer le surnageant
- Resuspendre le culot dans 4 ml de S1
- Ajouter 4ml de S2 et mélanger doucement, laisser 5 minutes à température ambiante
- Ajouter 4 ml de S3 et agiter doucement, laisser 10 minutes sur glace
- Centrifuger 25 minutes à 12000 rpm (Sorvall, rotor SS34) à 4°C et récupérer le surnageant
- Equilibrer la colonne avec 2 ml de tampon N2 (NaCl 50 mM, Ethanol 15%, Triton X-100 0,15%)
- Déposer le surnageant sur la colonne équilibrée
- Laver la colonne avec 2 X 4ml de tampon N3 (pH7,0, NaCl 1M, MOPS 50 mM, Ethanol 15%)
- Eluer l'ADN plasmidique avec 2 ml de tampon N5 (NaCl 1,25 M, Tris-Hcl 50 mM, Ethanol 15%)
- Précipiter l'ADN avec 0.7 volume d'isopropanol
- Centrifuger 15 minutes à 4°C (à 12000 rpm) et éliminer le surnageant
- Laver à l'éthanol 70% et centrifuger 5 minutes à 4°C (à 12000 rpm). Eliminer le surnageant
- Sécher le culot
- Resuspendre dans 50 µl d'H₂O distillée stérile

3.2. Purification d'ADN

3.2.1. Extraction d'ADN au phénol/chloroforme

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

Mode opératoire

- Porter le volume de la solution à un minimum de 100 µl avec de l'eau distillée
- Ajouter 1 volume d'une solution de phénol-chloroforme (1:1) pH 6.6 (prélever la phase du dessous)
- Vortexer
- Centrifuger 5 minutes à 14000 rpm à 4°C.
- Prélever avec précaution la phase supérieure, en évitant de reprendre l'interface
- Précipiter l'ADN à l'éthanol.

3.2.2. Précipitation à l'éthanol

Mode opératoire

- A 1 volume de réaction ajouter 2 volumes d'éthanol 100% froid (-20°C)
- Vortexer et placer 20 minutes à -80°C
- Centrifuger à vitesse maximale pendant 30 minutes à 4°C
- Eliminer le surnageant prudemment
- Laver en ajoutant de l'éthanol 70% froid
- Centrifuger 20 minutes à 4°C, éliminer le surnageant
- Resuspendre dans un volume adéquat d'eau stérile (40 µl)

3.2.3. Purification de fragments d'ADN extraits d'un gel d'agarose

Cette technique va permettre d'extraire un fragment d'ADN intéressant à partir du gel de polyacrylamide ou d'agarose dans lequel il a migré. Dans un premier temps le gel est préparé et les échantillons sont chargés dans les pistes. Après migration et trempage dans une solution de bromure d'éthidium, le gel est exposé une fraction de seconde sur le banc U.V.. Cette brève révélation permet de repérer la localisation du fragment d'ADN d'intérêt. Ce fragment est alors découpé du gel et l'ADN en est extrait. Cette technique est également utilisée pour éliminer les enzymes de restriction, de ligation, ou autres. Elle permet aussi de se débarrasser des fragments de restriction inutiles ou partiellement restreints. On utilise le kit MBI-fermentas :

- Placer la solution contenant l'ADN à purifier dans un tube.
- Ajouter 3 volumes de *Binding solution* pour un volume de gel.
- Incuber 10 minutes à 55°C pour dissoudre l'agarose.
- Passer la solution de silice du kit au vortex pour bien resuspendre les billes de silice. Ajouter x µl de cette solution de silice par µg d'ADN. Vortexer.
- Incuber 10 minutes à 55°C.
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.
- Retirer le surnageant.
- Ajouter 500 µl de solution de lavage du kit. Resuspendre le culot.
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.
- Retirer le surnageant.
- Ajouter 500 µl de solution de lavage du kit. Resuspendre le culot.
- Centrifuger 2 minutes à 12000rpm.
- Retirer le surnageant. Ajouter 20 µl d'eau stérile. Resuspendre le culot.
- Incuber à 55°C pendant 10 minutes.

- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.
- Récupérer le surnageant qui contient le fragment d'ADN purifié.

3.3. Méthodes d'analyse de l'ADN

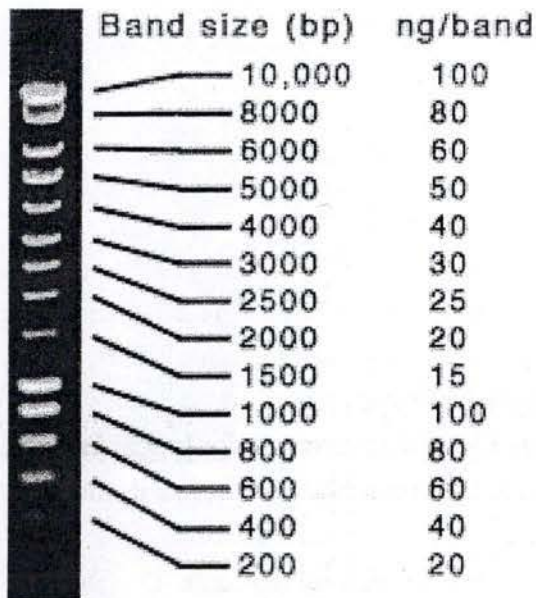
3.3.1. Le séquençage

Pour séquencer des fragments d'ADN nous avons utilisé le Kit ABI PRISM dye terminator (Perkin Elmer). Le principe appliqué dans ce kit est une amplification d'ADN par PCR avec assimilation de didéoxyribonucléotides marqués à la fluorescéine. Chacun de ces nucléotides possède son marquage propre (sa longueur d'onde d'émission), ce qui rend possible la lecture à partir d'une seule réaction PCR. Ce type de réaction permet par la suite l'utilisation d'un séquenceur automatique (figure 5).

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

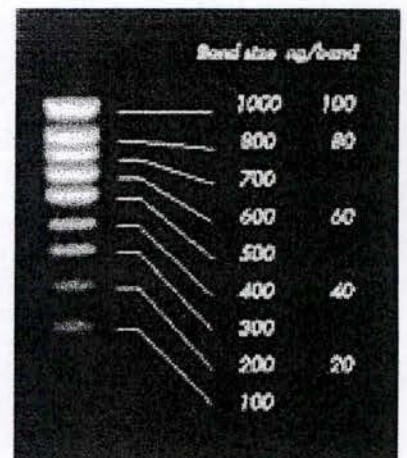
- Une PCR est réalisée sur le fragment d'ADN.
 - * La concentration en ADN matrice doit être de 1 à 100 ng si c'est un produit PCR et de 200 à 500 ng si c'est un plasmide. Lorsqu'on utilise un produit PCR, une purification préalable est nécessaire, elle permet d'éliminer les amorces et les nucléotides qui interagiraient avec la réaction de séquençage
 - * La quantité d'amorce doit être de 3.2 pM
 - * 8µl de terminator ready reaction mix sont ajoutés ensuite. Cette solution contient les 4 didésoxynucléotides marqués à la fluorescéine, du Tris-Hcl (pH 9), du MgCl₂, une pyrophosphatase stable, l'ampliTaQ ADN polymérase FS, dITP, dATP, dTTP, dCTP. Le dITP remplace le dGTP, ce qui évite la compression des bandes lors de l'électrophorèse. L'ampliTaQ ADN polymérase FS remplace la *Taq* polymérase classique car elle est plus efficace pour l'incorporation de nucléotides marqués.
- Les temps de réaction préalablement réglés sur l'appareil PCR sont ceux appliqués en générale.
- Après la réaction de PCR, il est nécessaire de purifier l'ADN car de nombreux nucléotides marqués n'ont pas été incorporés dans la réaction de polymérisation. Leur présence pourrait perturber l'électrophorèse dans le séquenceur. Pour cette purification nous avons suivi le protocole suivant :
 - * Ajouter 2µl de NaAc 3M pH4.8
 - * Ajouter 50 µl d' EtOH 95%
 - * Mettre 10 ' sur glace
 - * Centrifuger 20' dans une minifuge à vitesse maximale

A.



5µl HyperLadder/lane, 1% molecular biology grade agarose in 1x TAE stained with Ethidium Bromide

B.



C.

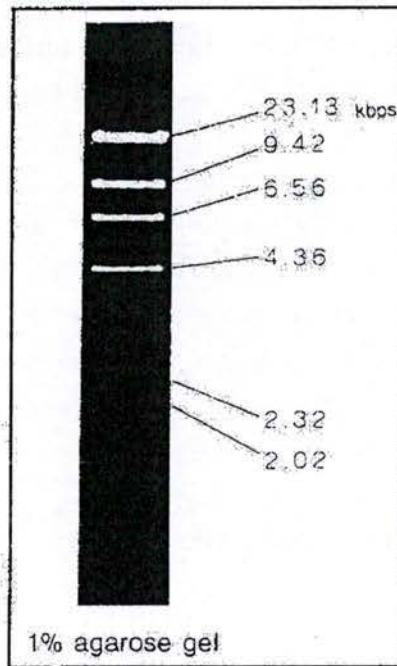


Figure 6: A. marqueur de taille moléculaire Hyper Ladder (Bioline).
 B. marqueur de taille moléculaire Smart Ladder (Eurogentec).
 C. marqueur de taille moléculaire λ HindIII (Eurogentec).

- * Eliminer le surnageant
 - * Ajouter 250 μ l d'EtOH 70% à 4°C
 - * Centrifuger pendant 20 minutes
 - * Eliminer l'EtOH, laisser sécher à l'air
- Les produits PCR sont séparés suivant leur taille par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée. Le résultat du gel sera détecté par un système optique relié à un ordinateur (ABI PRISM 377).

3.3.2. Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser sera donc inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer. La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Nous avons utilisé comme marqueurs de taille, l'ADN du phage λ coupé par *Hind* III (figure 6C), le Smart Ladder SF (small fragment) (figure 6D) commercialisé par la firme Eurogentec et l'Hyper Ladder commercialisé par la firme Bioline (figure 6A).

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

a. Mode opératoire

- Porter à ébullition un volume approprié de tampon TAE additionné d'agarose, jusqu'à obtention d'une solution limpide.
- Quand la solution est refroidie, ajouter 5 μ l de BrEth et couler la solution sur un support *ad hoc* muni d'un peigne
- Immerger le gel dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon TAE, auquel on a ajouté quelques μ l d'une solution de bromure d'éthidium
- Préparer les échantillons en ajoutant 1/10 de solution d'alourdisseur
- Déposer les échantillons dans les puits et effectuer la migration au voltage désiré (5V/cm)
- Visualiser le gel sous UV (transilluminateur de longueur d'onde 302 nm)

b. Solution, tampons et matériel

1. Solution de bromure d'éthidium :
 - 2µg/ml
2. Solution d'alourdisseur (10x) :
 - glycerol 50%
 - EDTA 100 mM
 - SDS 1%
 - Bleu de bromophénol
3. Tampon TAE (50 fois concentré) :
 - Tris-HCl, pH 8,0 40 mM
 - EDTA 50mM
 - Acide acétique glacial 57,1 ml/litre

3.4. Autres techniques

3.4.1. La réaction de ligation

Pour lier de manière covalente deux fragments d'ADN, on utilise l'ADN ligase du phage T4 (Invitrogen 1U/µl). Elle catalyse la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyle 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' d'une extrémité proche. L'enzyme, pour être active, nécessite la présence d'ATP et d'ions Mg²⁺.

Mode opératoire

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

3.4.2. Amplification de gènes par PCR

L'ADN doit être dénaturé pour permettre l'hybridation des amorces. Des amorces oligonucléotidiques complémentaires de séquences se trouvant de chaque côté de la région-cible, s'hybrident l'une au brin "sens" et l'autre au brin "anti-sens". Une ADN polymérase thermostable, telle que la *Taq* (Biotools) est alors utilisée pour synthétiser à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque amorce un brin d'ADN complémentaire. Un cycle consiste en 3 étapes:

1. dénaturation des brins d'ADN
2. hybridation des amorces
3. élongation (synthèse d'un brin d'ADN complémentaire).

En répétant ce cycle, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies du fragment cible. La T_m des amorces se calcule de la façon suivante (pour des oligos d'une taille inférieure à 20 bases) : 4°C sont comptabilisés pour les bases G et C et 2°C pour les bases A et T: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$.

a. Mode opératoire

Mélange de réaction réalisé dans un microtube:

- Tampon d'ADN polymérase 10X à une concentration finale 1X
- dNTP à une concentration finale de 0,2 mM
- Primer 1 à une concentration finale de 0,2 μ M
- Primer 2 à une concentration finale de 0,2 μ M
- Polymérase à raison de 1,245 U/ml au final
- Porter à 50 μ l avec de l'eau distillée stérile

b. Programme utilisé pour toutes les amplifications PCR

- Dénaturation de 5 minutes à 95°C.
- 30 cycles d'amplification divisés en 3 étapes:
 - 30 sec. à 95°C pour la dénaturation
 - 30 sec. à 50°C pour l'hybridation
 - 1 min. à 72°C pour la polymérisation
- Elongation finale de 10 minutes à 72°C

3.4.3. Restriction d'ADN

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

a. Mode opératoire

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

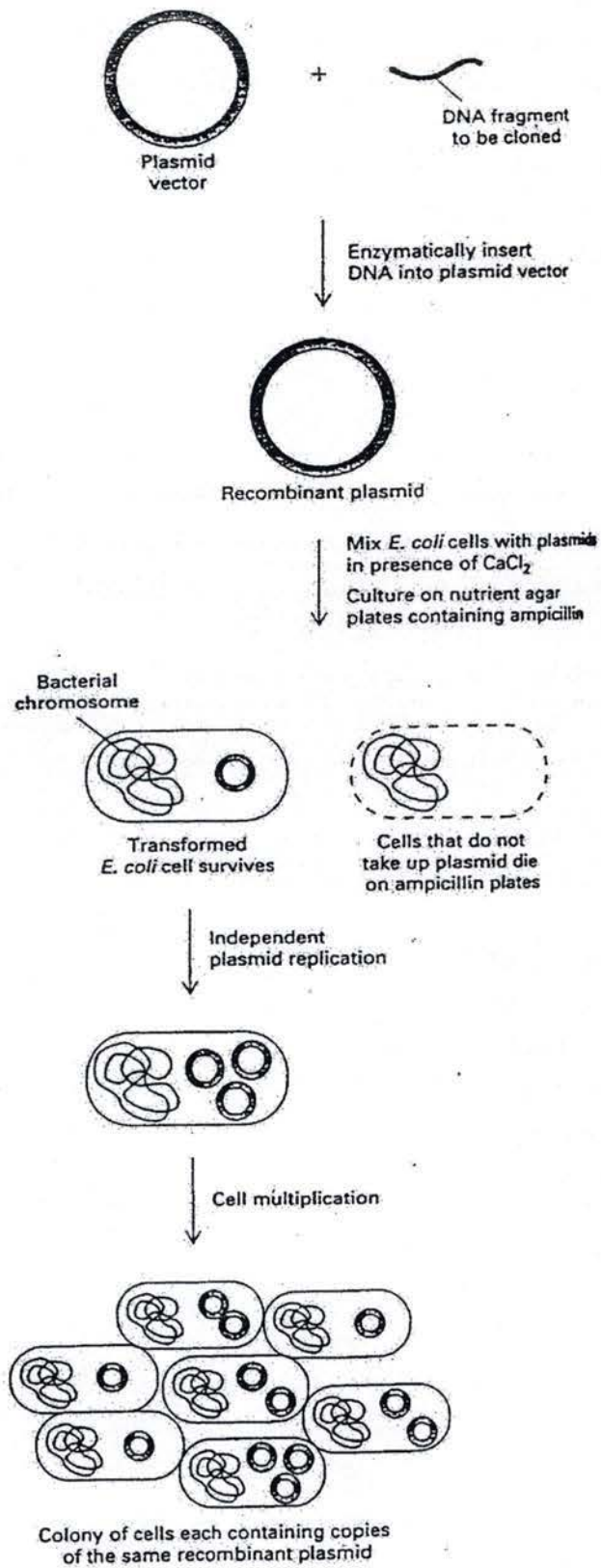


Figure 7: principe de la transformation bactérienne

- l'enzyme de restriction, au maximum $1/10^{\text{ème}}$ du volume final. Entre 2 et 10 unités d'enzyme par μg d'ADN (1 unité correspondant à la quantité d'enzyme nécessaire pour restreindre complètement 1 μg d'ADN du phage λ en 1 heure à 37°C dans un volume de 25 μl)
- Amener au volume final avec de l'eau distillée stérile
- Incuber au minimum 45 minutes à la température optimale de l'enzyme (souvent 37°C). L'enzyme peut être soit inactivée par chauffage (15 à 20 minutes à 65 °C) si l'enzyme est thermosensible, soit éliminée par une extraction phénol/chloroforme

4. Manipulations relatives aux bactéries

4.1. Manipulations relatives à *E. coli* : transformation CaCl_2

Pour cette transformation, la paroi et la membrane bactérienne sont rendues perméables à l'ADN: la bactérie est alors dite compétente.

Des bactéries Gram-négatives *E. coli* en début de phase exponentielle de croissance sont rendues artificiellement compétentes par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium (CaCl_2). Celle-ci déstabilise la paroi de la bactérie, qui gonfle alors en prenant l'aspect d'un sphéroplaste. L'ADN plasmidique ajouté forme avec le calcium un complexe résistant aux désoxyribonucléases. Ce complexe est supposé adhérer à la bactérie. Les bactéries sont soumises à un choc thermique qui permet au complexe de rentrer dans la cellule. Un temps d'incubation en milieu riche non sélectif permet aux bactéries de régénérer une paroi normale et aux gènes de résistance introduits de s'exprimer. Les transformants sont ensuite isolés sur des boîtes contenant un milieu de culture sélectif (figure 7)..

4.1.1. La préparation de cellules CaCl_2 compétentes

- Ensemencer 100 ml de LB + antibiotique à partir d'une préculture. Incuber à 37°C sous agitation jusqu'à obtenir une absorbance d'environ 0,3 à 550 nm (début de la phase exponentielle)
- Arrêter la croissance en refroidissant la culture sur glace pendant 10 minutes
- Centrifuger la culture 15 minutes à 3000 rpm à 4°C. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de CaCl_2 50mM. Répéter cette étape une seconde fois
- Laisser la solution 30 minutes sur glace puis centrifuger 15 minutes à 3000 rpm à 4°C
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de solution froide en CaCl_2 50mM glycérol 15% équivalent au dixième du volume initial
- Aliquoter la suspension en eppendorfs et stocker à -80°C

E. coli donneuses

B. melitensis receveuses

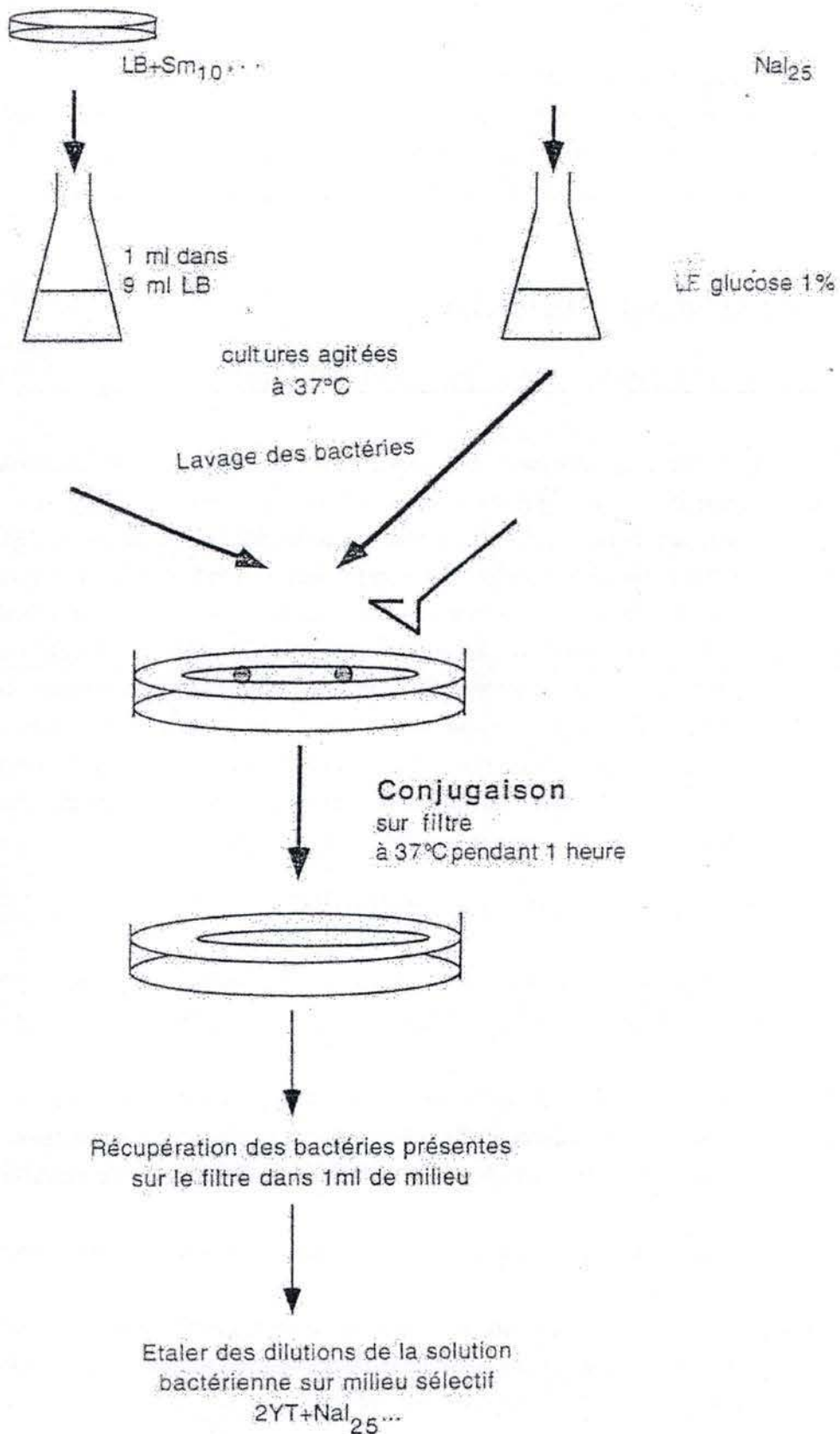


Figure 8 : principe de la conjugaison.

4.1.2. La transformation de cellules compétentes

- A 50-150 µl de cellules compétentes, ajouter environ 10 µl de mélange de ligation ou 10 à 100 ng d'ADN
- Déposer 30 minutes sur glace
- Réaliser un choc thermique de 2 minutes à 42°C
- Ajouter 900 µl de LB liquide
- Incuber 30 min. à 1 heure à 37°C
- Etaler sur boîtes de milieu sélectif et incuber une nuit à 37°C
- Témoin de compétence : des cellules compétentes transformées avec une quantité précise d'un plasmide non restreint sont étalées sur milieu sélectif
- Un témoin de viabilité des cellules compétentes : des cellules compétentes après transformation, sont étalées sur milieu LB

4.2. Manipulations relatives à *Brucella*

4.2.1. La conjugaison

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

Les plasmides utilisés lors de ce travail sont les différentes constructions effectuées à partir du pBBri-GFP et du pMR10.

Les contrôles de résistance aux antibiotiques utilisés sont:

les bactéries donneuses sont étalées sur un milieu sélectif contenant de l'acide nalidixique et les *Brucella* (Nal^R) receveuses sont étalées sur un milieu additionné de l'antibiotique à laquelle résiste les *E. coli* donneuses (figure 8).

Méthode

- Préparer une préculture d'*E. coli* S17-1 (RP4⁺) donneuses contenant le plasmide dans du LB + antibiotique, ainsi qu'une culture de *Brucella* receveuse (Nal^R).
- Après une croissance à 37°C durant une nuit, inoculer une culture de *E. coli* dans du LB + antibiotique avec 1/10 de la préculture. Laisser pousser à 37°C quelques heures.

- Avant la conjugaison, laver les bactéries pour éliminer les antibiotiques du milieu de culture en centrifugeant 15 minutes à 4000 rpm et resuspendre le culot bactérien dans du milieu sans antibiotique (1/10 du volume de la culture de départ).
- Placer un filtre stérile 0,22µm de 82 mm de diamètre sur une boîte de pétri contenant du 2YT, y déposer 100 µl de culture de *B. melitensis* et 100 µl d'*E.coli* S17 lavées et resuspendues.
- Mélanger et étaler les gouttes de bactéries sur la totalité du filtre.
- Laisser incuber au moins 1 heure à 37°C
- Récupérer les bactéries sur le filtre dans 1 ml de milieu.
- Incuber 3-4 jours à 37°C.

4.2.2. L'électroporation

Jour -3

- Ensemencer les souches de *Brucella* à électroporer dans 250ml de 2YT liquide et les mettre sous agitation à 37°C

Jour -2

- étaler les différentes souches impliquées sur des boîtes 2YT agar (50 à 100ml des cultures lancées la veille à partir de boîtes)

Jour 0

- déposer 1,5 ml 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 50 ml
- centrifuger 15 minutes à 4000 rpm à 4°C
- 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. A faire 3 fois.
- retirer le surnageant et mettre 100 µl d'eau stérile froide/nombre d'électroporation à réaliser
- placer dans une cuvette d'électroporation (0,2 cm) stérile et froide (sur glace), 3 µl d'ADN plasmidique et y ajouter 100µl de cellules compétentes.
- placer la cuvette dans l'électroporateur (BIO RAD Gene Pulser™).
- 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 (permet aux bactéries de se remettre du choc électrique).

- récupérer le contenu de la cuvette et le mettre dans un tube de 50 ml qu'il faut placer sous agitation à 37°C.
- incuber 3 h
- étaler sur milieu sélectif (100 à 250 µl/boîte) et incuber à 37°C et 5% de CO₂.

4.2.3. Observation de *Brucella* en microscopie à fluorescence

Les bactéries sont inactivées avec du paraformaldéhyde 3%.

- Prélever 200µl de culture liquide de *Brucella* et déposer sur un coverslip se trouvant dans un puits d'une plaque falcon 3047.
- Centriuger 15 minutes à 2000rpm.
- Eliminer l'excès de milieu et laver avec 500 µl de PBS.
- Eliminer le PBS et ajouter 500 µl de paraformaldéhyde 3%. Laisser agir 20 minutes.
- Enlever le paraformaldéhyde et laver avec 500 µl de PBS.
- Prendre le coverslip et le retourner sur la goutte de milieu de montage Dako déposée sur la lamelle porte-objet.

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

Solution de paraformaldéhyde

- Faire chauffer 80 ml de PBS puis y ajouter 3g de paraformaldéhyde sous hotte.
- Chauffer jusqu'à dissolution puis ajouter 100 µl de CaCl₂ 100 mM et 100 µl de MgCl₂ 100 mM.
- Laisser refroidir.
- Mettre à pH 7,5 et ajuster le volume à 100 ml avec du PBS.
- Aliquotter par 5 ml et stocker à -20°C. une fois décongelé, la solution de paraformaldéhyde ne peut pas être recongelée.

4.2.4. La coloration de Gram

Afin de distinguer les bactéries à Gram négatif des bactéries à Gram positif, il faut réaliser une coloration de Gram. Pour ce faire les bactéries sont d'abord colorées au violet de gentiane. Ce colorant s'accumule chez les deux bactéries, mais après traitement au lugol, seule les bactéries à Gram positif gardent le colorant retenu par la couche de muréine. Une contre-coloration permet de colorer les bactéries à Gram négatif en rouge.

- Déposer une goutte de NaCl 7,5% sur une lame porte-objet
- Prélever quelques bactéries de la colonie à examiner
- Déposer ces bactéries dans la goutte et étaler sur la lame
- Laisser sécher
- Couvrir la lame d'alcool et flamber, laisser refroidir
- Couvrir de violet de gentiane (1 minute)
- Eliminer l'excès de colorant et couvrir de lugol (30 secondes)
- Rincer à l'eau, décolorer prudemment à l'éthanol, rincer de nouveau à l'eau
- Contre colorer à la safranine (1 minute)
- Sécher et observer au microscope à immersion

Les bactéries qui résistent à la décoloration par l'alcool sont dites Gram positives (elles restent colorées en bleu violet). Les bactéries qui perdent leur coloration bleue sont dites Gram négatives.

4.2.5. Test de séro-agglutination

On utilise un test de séroagglutination afin de s'assurer que les bactéries observées sont bien des *Brucella*.

Mode opératoire

- Déposer 10 µl d'eau sur deux lamelles en verre.
- Prélever une colonie de *Brucella* et la resuspendre dans l'eau déposée.
- Pour le contrôle négatif du test, prélever une colonie de *E.coli* et la resuspendre dans 10 µl d'eau sur une autre lamelle.
- Sur une des lamelles, déposer 3 µl de sérum anti-A, réagissant spécifiquement avec *B.abortus*.
- Sur l'autre déposer 3 µl de sérum anti-M, réagissant spécifiquement avec *B.melitensis*.
- Homogénéiser.
- Attendre 1 à 2 minutes.
- Observer au binoculaire. Les bactéries formeront des agrégats avec le sérum dirigé spécifiquement contre elles.

Les *E.coli* ne réagissent normalement pas avec les sera anti-*Brucella*.

4.2.6. Test blanc bleu

Les éléments génétiques portés par la souche DH10B (Δlac) ne lui permettent pas d'avoir une activité β -galactosidase normale. Une complémentation intragénique avec un plasmide apportant *lac Z'* (fragment non opérationnel du gène de régulation de l'opéron lactose) et un fragment du gène *lacZ* (partie N-terminale de la β -galactosidase) peuvent néanmoins se faire. Lorsque cette complémentation est effectuée, la bactérie possède une β -galactosidase fonctionnelle. Celle-ci est mise en évidence par son action sur l'*X-gal* (20 μ g/ml dilué 1000 fois dans le milieu) substrat chromogène qui donne un composé bleu lorsqu'il est clivé. Le test blanc met en évidence les bactéries présentant un plasmide contenant un insert car celui-ci est disrupté dans le gène *lac Z'* et la β -galactosidase n'est donc plus fonctionnelle. La colonie bactérienne apparaîtra blanche. L'IPTG, dans le milieu de culture, permettra l'expression de *lacZ*.

5. Manipulations relatives aux protéines

5.1. Préparation d'extraits protéiques totaux

5.1.1. Inactivation de bactéries en phase de latence et en phase stationnaire

On évalue la phase dans laquelle se trouvent les bactéries en mesurant la DO de la culture. On considère que les bactéries sont en phase de latence lorsque la DO (à 590 nm) est de 0,05; en phase exponentielle lorsque la DO est de 0,1; et en phase stationnaire lorsque la DO est de 1 (Taminiau et al, 2002).

Mode opératoire pour obtenir des bactéries en phase de latence

- Ensemencer 5 ml de milieu liquide (2YT) avec des *Brucella*.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.
- Mesurer la DO de cette préculture à 590 nm.
- Diluer cette culture dans 100 ml de milieu liquide (2YT) afin d'obtenir une culture ayant une DO de 0,05. Pour obtenir la phase stationnaire, remettre le reste de la préculture sous agitation à 37°C.
- Laisser incuber les cultures pendant 4h sous forte agitation.

- Reprendre les DO des bactéries en phase de latence pour s'assurer que la DO n'a pas augmenté. En effet, les bactéries en phase de latence ne se divisent pas. Leur DO ne doit donc pas augmenter.
Reprendre la DO des précultures afin de s'assurer qu'elles sont bien en phase stationnaire.
- Inactiver les *Brucella* 2h à 80°C.

5.1.2. Disruption de cellules

Le disrupteur de cellules utilisé est le *Cell Disruption, One Shot, Constant Systems LTD*. Son rôle est d'entraîner l'éclatement des bactéries par changement rapide de pression, permettant ainsi d'obtenir toutes les protéines produites par la bactérie.

Fonctionnement :

La pression utilisée pour l'éclatement d'une cellule de *Brucella melitensis* est de 2 Kilobars. Lorsque la haute pression désirée est atteinte par l'appareil, le piston descend. A ce moment, environ 6 ml d'échantillon sont introduits à l'intérieur du cylindre à haute pression. Ensuite, le piston va compresser l'échantillon et l'éjecter à une très grande vitesse à travers un orifice très étroit. Le transfert rapide de l'échantillon d'une région soumise à une haute pression à une région de basse pression entraîne la disruption des cellules de l'échantillon. Lorsque l'échantillon sort de l'orifice, il heurte la tête du disrupteur et redescend de manière radiale le long des parois qui constituent alors une large surface de refroidissement et permettent donc d'éviter la dégradation des protéines.

En pratique :

- Laver trois fois le disrupteur à l'eau bidistillée
- Déposer l'échantillon dans la chambre inférieure, appliquer la pression et récupérer l'échantillon disrupté
- Rincer trois fois le disrupteur à l'eau bidistillée puis une fois à l'alcool-éther

5.1.3. Dosage protéique

5.1.3.1. Le dosage de Bradford

La méthode de Bradford est utilisée afin de doser la quantité de protéines dans les extraits totaux réalisés.

Mode opératoire

- Réaliser une courbe étalon. Pour cela, on utilise la BSA (bovine serum albumine). On dilue la solution stock afin d'obtenir une concentration finale de 1 μg de protéines dans 10 μl . On réalise différentes dilutions de la solution obtenue (10 fois, 2 fois et non dilué).
- Placer dans différents tubes les mêmes quantités de nos échantillons que les quantités utilisées pour les différentes dilutions de la BSA.
- Ajouter à chaque dilution 1ml de solution de Bradford.
- Laisser incuber 15 minutes.
- Mesurer la DO (à 590 nm) de chaque échantillon.

En se basant sur la courbe étalon réalisée avec la BSA, on calcule la quantité de protéines se trouvant dans nos échantillons.

Solution de Bradford

- 0,1 g de Coomassie Brilliant Blue G-250
- 50 ml d'éthanol 95 %
- 100 ml H_3PO_4 85%
- 50 ml H_2O

Cette solution est concentrée 5 fois. Après dilution de cette solution, il est nécessaire de filtrer la solution obtenue.

5.1.3.2. Le dosage BCA

La méthode de dosage BCA a également pour but d'évaluer la quantité de protéines dans les extraits totaux réalisés.

Mode opératoire

- Réaliser différentes dilutions d'une solution de BSA à partir d'une solution stock de 1 mg/ml. Les concentrations obtenues par les dilutions effectuées sont les suivantes :
 - 0,8 mg/ml
 - 0,6 mg/ml
 - 0,4 mg/ml
 - 0,2 mg/ml
 - 0,1 mg/ml
- Diluer nos échantillons protéiques.
- Ajouter à chaque dilutions 200 µl du mélange de réactifs A/B (1/50)
- Agiter 30 minutes
- Mesurer la densité optique à 550 nm.

5.2. Le western blot5.2.1 Electrophorèse en gel polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)Préparation du gel.Le Running Gel, à 10% de polyacrylamide

Pour 20 ml de running gel :

Eau	7,9ml
29,2% acrylamide/0,8% bis-Acrylamide	6,7 ml
1,5M Tris (pH8,8)	5 ml
SDS 10%	0,2 ml
APS 10%	0,2 ml
TEMED	0,008ml

Couler la solution entre les deux plaques de verre préalablement fixées sur leur support. Déposer entre celles-ci 1ml d'isopropanol pour permettre la polymérisation de celui-ci (la présence d'air l'inhibe). Lorsque le gel est pris, enlever l'isopropanol par inversion du montage.

Composition de la solution de polyacrylamide 30% :

Acrylamide.	29,2%
Bisacrylamide.	0,8%
Eau distillée.	100ml

Cette solution est filtrée et stockée à 4°C.

Le Stacking Gel

Pour 6 ml de stacking gel :

Eau	3,3 ml
29,2%acrylamide/0,8% bis-Acrylamide	1 ml
Tris 0,5 M pH6,8	1,5 ml
SDS 10%	0,06 ml
APS 10%	0,06 ml
TEMED	0,006 ml

Placer le peigne entre les deux plaques de verre avant de couler le Stacking gel. Laisser polymériser puis retirer lentement le peigne. Remplir les puits avec le tampon d'électrophorèse (SDS-PAGE buffer 1x).

Préparation des échantillons

Le volume correspondant à la quantité de protéines à charger est fonction de la concentration en protéines de chacun des extraits. Il faut ajouter à ce volume un tampon de chargement protéique à base de bleu de bromophénol dont la concentration-stock est 5x. On veillera à ce que le volume à charger dans les puits soit identique de sorte à assurer une migration équivalente dans toutes les pistes.

On charge les échantillons à la pipette Hamilton. Un puits est utilisé par un marqueur de poids moléculaire (Bio Rad prestained SDS-PAGE standards low range).

Tampon de chargement protéique 5X :

Pour 10 ml de tampon de chargement :

Glycérol	5 ml
β -mercapto-éthanol	2,5 ml
SDS	1 g
Tris 312,5 mM pH6,8 solution 1M	3,125 ml
Bleu de Bromophénol	0,5 mg

Migration

L'ampérage de l'appareil est fixé sur 40 mA et le voltage peut varier jusqu'à un maximum de 600Volts.

La durée de migration est fonction du pourcentage du gel et de la taille de nos protéines d'intérêt.

5.2.2 Transfert sur membrane de nitrocellulose (Western-Blot).

Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est un transfert de type semi-dry. On découpe une membrane de nitrocellulose ainsi que 6 papiers Whatman (1 mm d'épaisseur) aux dimensions du gel. La membrane est humidifiée dans l'eau distillée tandis que les papiers Whatman sont humidifiés dans le tampon de transfert.

On place le tout dans l'appareil de transfert (semi dry) (Panther Semi-dry Electrobloetter, model HEP1 OWL).

Afin que le transfert des protéines soit optimal, l'ampérage doit varier entre 0,8 et 3 mA par cm² de membrane de nitrocellulose. Le voltage doit varier entre 10 et maximum 14 V. La durée du transfert varie quant à elle entre 30 minutes et deux heures, en fonction de la taille des protéines à faire transférer (la vitesse de transfert des protéines dépend de leur poids moléculaire: plus le poids moléculaire est élevé, plus le transfert sera lent) et cette durée doit tenir compte de la thermorésistance des protéines.

Tampon de transfert :

Pour 1000 ml de tampon de transfert :

Tris 48mM	5,80g
Glycine 39mM	2,90g

SDS 0,037%	0,37g
Méthanol	200 ml
Eau distillée	porter à volume

La membrane est ensuite rincée dans de l'eau distillée. La qualité du transfert ainsi que celle du chargement en protéines dans les différentes pistes peut être visualisée par une coloration aspécifique des protéines au rouge ponceau. Celui-ci colore de façon non-spécifique les protéines sur la membrane de nitrocellulose. Cette coloration s'effectue par simple immersion de la membrane dans le colorant, suivie immédiatement par des rinçages à l'eau distillée afin d'ôter l'excédent de colorant. Cette coloration est ensuite éliminée par un rinçage au PBS 1X.

Ponceau 1X :

Dissoudre 0,5g de Ponceau S dans 1 ml d'acide acétique glacial, amener à 100 ml avec de l'eau.

5.2.3 Immunodétection.

Cette étape utilise une technique de révélation dite indirecte.

Un anticorps primaire reconnaît son épitope et s'y fixe. C'est la reconnaissance spécifique du substrat.

Un second anticorps est utilisé pour la révélation: il va reconnaître l'anticorps primaire et s'y fixer. Cet anticorps secondaire est conjugué à la peroxydase, une enzyme qui va catalyser une réaction produisant de la lumière, qui sera captée sur un film autoradiographique.

La figure 5c représente très schématiquement l'immunodétection des protéines " taggées " par l'épitope HA, par des anticorps primaires reconnaissant cet épitope. Des anticorps secondaires dirigés contre les anticorps primaires, les reconnaissent. Ils sont couplés à la peroxydase, une enzyme oxydant un substrat. Cette réaction permet un dégagement de lumière (voir paragraphe concernant la révélation).

Etape de " blocking"

Avant de mettre en présence les anticorps primaires, une étape préliminaire consiste à saturer les sites non spécifiques de la membrane, pour éviter un bruit de fond important lors de la révélation. Par la suite, une réaction de compétition permettra un déplacement des protéines du lait, fixées de manière non spécifiques, en faveur des anticorps primaires dirigés spécifiquement contre un épitope. Pour cela, la membrane est incubée dans une solution de

Blocking pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation. Cette étape peut aussi se faire à 4°C pendant une nuit.

Solution de Blocking

Pour 100 ml :

- | | |
|---------------------|-------------|
| - PBS 1X | 10ml PBS10X |
| - Tween 0,05% | 50µl |
| - Lait en poudre 5% | 5 g |

PBS 10X :

Pour 1 litre à PH 7,6

- 80g de NaCl
- 2g de KCl
- 11,5g de Na₂HPO₄
- 2g de KH₂PO₄

Enlever la solution de blocage et laver la membrane 3 x 10 minutes sous agitation dans du PBS-Tween 0,05%.

Mise en présence de l'anticorps primaire

La concentration du réactif immunologique varie de 1 à 50 mg/ml, en fonction de l'affinité des immunoglobulines pour leur épitope. Pour une immunodétection, les anticorps sont dilués à une concentration de 1 à 50 µg/ml.

Mettre la membrane en présence de l'anticorps primaire dilué à la concentration recommandée par la firme dans une solution de PBS-Tween 0,05 % sous agitation pendant une heure. Récupérer la solution contenant les anticorps et laver 3 x 10 minutes la membrane avec la solution PBS-Tween sous agitation.

Mise en présence de l'anticorps secondaire

Ces anticorps sont dirigés contre le domaine F(c) des anticorps primaires. Ceux qui sont le plus couramment utilisés seront dirigés contre des Ig murins ou de lapins.

Ils sont conjugués à la peroxydase, enzyme permettant un dégagement de lumière par l'oxydation d'un substrat peracide (le luminol) en un composé oxydé. L'émission de lumière

est amplifiée par la présence d'agents chimiques comme les phénols, et maintenue plus longtemps.

Mettre la membrane en présence de l'anticorps secondaire à la dilution recommandée par la firme le commercialisant, sous agitation pendant une demi-heure. Laver 6x5 minutes la membrane avec la solution PBS-Tween 0,05% sous agitation.

Révélation

La technique de détection utilise les réactifs ECL (Amersham Pharmacia Biotech) et se déroule en chambre noire.

La membrane est mise en présence d'un mélange en volume égal de deux solutions: S1 et S2. Ce volume est fonction de la surface à couvrir: surface en $\text{cm}^2 \times 0.125 \text{ ml}$.

Mélanger S1 et S2 et en recouvrir la membrane sur la face où les protéines ont été transférées. Incuber durant une minute.

Oter la solution de détection et placer la membrane recouverte d'un film plastique (type SaranWrap) dans une cassette de révélation, et exposer à un film autoradiographique pendant différentes durées en fonction de l'intensité du signal: 10 secondes, 30 secondes, 60 secondes, 5 minutes et 10 minutes. La figure 5d représente schématiquement le film autoradiographique suite à une exposition à une membrane.

Il faut savoir qu'une fois S1 et S2 mélangées, l'activité maximale de la peroxydase a lieu une à cinq minutes après le mélange puis elle décroît en fonction du temps.

Révéler les bandes par un bain de révélateur: le film est plongé dans la cuve jusqu'à ce qu'apparaissent des bandes ou, le cas échéant, les bords de la membrane.

Ensuite rincer le film par un passage dans l'eau et enfin le passer une dizaine de secondes dans le fixateur. Rincer abondamment à l'eau de ville et laisser sécher.

Garder la membrane pour positionner les bandes en fonction des puits chargés et pour avoir des renseignements quant à l'échelle de taille.

Bibliographie

Aizawa (2001). Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiology letters*, 157-164.

Aldridge, P., and Hughes, K. T. (2002). Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol* 5, 160-5.

Bellefontaine, A.-F. (2001). Caractérisation du régulon dépendant de CtrA chez *Brucella* sp. In URBM (Namur: FUNDP), pp. 154.

Bren (2000). how signals are heard during bacterial chemotaxis:protein-protein interactions in sensory signal propagation. *Journal of bacteriology* 182, 6865-6873.

Corbel (1997). Brucellosis : An Overview. *Emerging Infectious Diseases* 3, 213-221.

Cornelis (2000). Assembly and function of type III: secretory systems. *Annual review of microbiology* 54, 735-774.

Cornelis (1995). Le plasmide pYV, élément clé de la virulence des *Yersinia*. *médecine/sciences* 11, 1295-1304.

Delrue (2001). Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell microbiology* 3, 487-497.

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., Goltzman, E., Selkov, E., Elzer, P. H., Hagius, S., O'Callaghan, D., Letesson, J. J., Haselkorn, R., Kyrpides, N., and Overbeek, R. (2002). The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 443-8.

Gober, J. W., and Marques, M. V. (1995). Regulation of cellular differentiation in *Caulobacter crescentus*. *Microbiol Rev* 59, 31-47.

Godfroid, F., Taminiou, B., Danese, I., Denoel, P., Tibor, A., Weynants, V., Cloeckaert, A., Godfroid, J., and Letesson, J. J. (1998). Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. *Infect Immun* 66, 5485-93.

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.

- Jenal, U., and Shapiro, L. (1996). Cell cycle-controlled proteolysis of a flagellar motor protein that is asymmetrically distributed in the *Caulobacter* predivisional cell. *Embo J* 15, 2393-2406.
- Jubier-Maurin (2001). Identification of the *nik* gene cluster of *Brucella suis*: regulation and contribution of urease activity. *Journal of bacteriology* 183, 426-434.
- Karlinsey (1998). Flk couples flgM translation to flagellar ring assembly in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* 180, 5384-5397.
- Lengeler, J. W., Drews, G., and Schlegel, H. G. (1999). Gene expression and regulatory mechanisms. In *Biology of the procaryotes* (New York: Blackwell Science).
- Lestrade, P., Delrue, R. M., Danese, I., Didembourg, C., Taminiau, B., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Tang, C. M., and Letesson, J. J. (2000). Identification and characterization of in vivo attenuated mutants of *Brucella melitensis*. *Mol Microbiol* 38, 543-51.
- Lillehoj, E. P., Kim, B. T., and Kim, K. C. (2002). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282, L751-6.
- Macnab. (1996). Flagella and motility. In *Escherichia coli and Salmonella*, F. C. Neidhardt, ed. (Washington: ASM Press)..
- Malek (1992). The role of motility in the efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Archives of microbiology*.
- Manhan (1995). Environmental regulation of virulence gene in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Shigella* spp. .
- Manson, M. D., Armitage, J. P., Hoch, J. A., and Macnab, R. M. (1998). Bacterial locomotion and signal transduction. *J Bacteriol* 180, 1009-22.
- Miller (2001). Quorum sensing in bacteria. *annual review in microbiology* 55, 165-199.
- Minamino, T., and Macnab, R. M. (1999). Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J Bacteriol* 181, 1388-94.
- Moens (1996). Functions of Bacterial Flagella. *Critical Review in Microbiology* 22, 67-100.
- O'Callaghan (2001). *Brucella*. Animal and ectoparasitic source infections, 1994-2010.

- O'Callaghan, D., Cazevieille, C., Allardet-Servent, A., Boschioli, M. L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y., and Ramuz, M. (1999). A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol Microbiol* 33, 1210-20.
- Otteman (1997). Roles for motility in bacterial-host interactions. *Molecular Microbiology* 24, 1109-1117.
- Ouahrani-Bettache, S., Porte, F., Teyssier, J., Liautard, J. P., and Kohler, S. (1999). pBBR1-GFP: a broad-host-range vector for prokaryotic promoter studies. *Biotechniques* 26, 620-2.
- Pizzaro-Cerdà, J., Moreno, E., and Gorvel, J.-P. (1999). *Brucella abortus* invasion and survival within professional and nonprofessional phagocytes. In *Advances in cell and molecular biology of membranes and organelles*, J. P. Inc., ed., pp. 201-232.
- Ramphal, R., Arora, S. K., and Ritchings, B. W. (1996). Recognition of mucin by the adhesin-flagellar system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med* 154, S170-4.
- Shapiro (1995). The bacterial flagellum : from genetic network to complex architecture. *Cell* 80, 525-527.
- Sockett (1998). Characterizing Flagella and Motile Behavior. *Methods in Microbiology* 27.
- Sola-Landa, A., Pizarro-Cerda, J., Grillo, M. J., Moreno, E., Moriyon, I., Blasco, J. M., Gorvel, J. P., and Lopez-Goni, I. (1998). A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol* 29, 125-38.
- Sourjik, V., Muschler, P., Scharf, B., and Schmitt, R. (2000). VisN and VisR are global regulators of chemotaxis, flagellar, and motility genes in *Sinorhizobium (Rhizobium) meliloti*. *J Bacteriol* 182, 782-8.
- Sperandio, V., Torres, A. G., Giron, J. A., and Kaper, J. B. (2001). Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* 183, 5187-97.
- Taminiau, B., Daykin, M., Swift, S., Boschioli, M. L., Tibor, A., Lestrade, P., De Bolle, X., O'Callaghan, D., Williams, P., and Letesson, J. J. (2002). Identification of a Quorum-Sensing Signal Molecule in the Facultative Intracellular Pathogen *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 70, 3004-3011.

Verger, J. M., Grimont, P., Grayon, M. (1985). *Brucella*, a monospecific genus as shown by dextrinonucleic acid and hybridization. *Int.J.* 35, 292-295.

Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J., and Salmond, G. P. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 25, 365-404.

Young, G. M., Schmiel, D. H., and Miller, V. L. (1999). A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6456-61.