



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

### Brucella melitensis 16M et les gènes intervenant dans le métabolisme de la rhizopine

Bauraing, Caroline

*Award date:*  
2002

[Link to publication](#)

#### General rights

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

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

#### Take down policy

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



---

FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR

Faculté des Sciences

***Brucella melitensis* 16M et les gènes intervenant dans le métabolisme de  
la rhizopine.**

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

Caroline Bauraing

Août 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>

## ***Brucella melitensis* 16M et les gènes intervenant dans le métabolisme de la rhizopine.**

BAURAING Caroline

### Résumé

Les bactéries possèdent la capacité d'établir une multitude d'interactions avec les organismes pluricellulaires. Ces interactions aboutissent à des associations pouvant être neutres, bénéfiques ou néfastes pour leurs hôtes. Deux grandes associations peuvent être distinguées, il s'agit de la pathogénicité et de la symbiose. Bien qu'étant des associations totalement différentes les bactéries pathogènes et symbiotiques dépendent de mécanismes similaires pour interagir avec leurs hôtes. L'étude des mécanismes impliqués dans la symbiose permet de ce fait d'aller plus loin dans la compréhension des moyens mis en jeu par les pathogènes pour déclencher leur cycle infectieux. A cet égard, deux bactéries intracellulaires facultatives appartenant à la sous division des alpha-protéobactéries ont été particulièrement étudiées, il s'agit de *Brucella* une bactérie pathogène intracellulaire et *Rhizobium* un endosymbiote. De nombreuses similarités ont été décelées chez ces bactéries d'un point de vue génomique. Dans ce contexte, nous avons caractérisé et étudié l'expression des plusieurs gènes partageant des homologies chez ces deux bactéries. Ces gènes désignés par le nom de *mos* et *moc* sont l'objet de nombreuses recherches chez *Rhizobium* chez qui ils sont impliqués dans la synthèse et le catabolisme d'un composé, la rhizopine. L'existence de gènes homologues chez *B. melitensis* nous amène à nous interroger sur leur fonction.

*Je me souviens au du moins on me le rappelle assez souvent le jour où j'ai prononcé cette phrase: "je rêve de faire l'université". C'est donc à l'aube de mes 18 ans que je me suis dirigée vers les facs .J'ai poussé la porte pour gravir les marches des auditoires afin d'atteindre les places du dernier rang.4 ans plus tard me voilà toujours dans cet auditoire à la différence que cette fois j'ai échangé ma place du dernier rang contre celle du premier qui n'est certainement pas la meilleure, ça je vous l'accorde! Jusqu'à présent je ne regrette pas le jour où j'ai prononcé cette fameuse phrase. Bien que quoiqu'en disent certains ces études n'ont pas été de tout repos, car elles furent pénibles et longues ( apparemment pas tant que ça puisque j'ai rempli pour deux mois supplémentaires). Mais à côté de cela mes études m'ont permis de rencontrer de gens formidables que j'ai tiens à remercier dans ces quelques lignes.*

*Je tiens à remercier tout d'abord mon promoteur le Professeur J-J Letesson pour avoir signé cette feuille m'autorisant ainsi à faire partie de son équipe. Merci pour votre accueil.*

*Merci aux lecteurs pour avoir sacrifié votre temps ( qui est précieux) à la lecture de ce mémoire.*

*Je ne peux oublier mon maître Calou pour ta patience, ta bonne humeur ( surtout ton rire communicatif) et pour tous les instants que tu as pu me consacrer pour faire de moi un esclave presque digne de toi (enfin j'espère que tu n'es pas trop déçu du résultat mais je tâcherai de mieux faire la prochaine fois).Je te remercie pour tes conseils avisés au sujet de la bio et du reste, grâce à toi je sais faire une règle de trois, quitter les applications de l'ordi, mettre les coverslips à l'endroit....merci pour tes commentaires concernant mes brushing des lendemains de veille, mes activités nocturnes ... et surtout merci pour tes petites attentions touchantes comme les autocollants de ma paillasse, ...*

*Un grand merci aux brucellistes et particulièrement à Chantal pour le surnom dont tu m'as accablée (je plaisante!!), à Valé...non Valoche pour tous les coups de main que tu m'as donné et les coups de punch aussi.Merci à Amé pour le temps que tu m'as accordé en septembre l'an passé et de m'avoir inculqué les rudiments de la bio mol.*

*Merci aux généticiens, aux techniciens,...à vous tous qui avez contribué à donner au labo cette ambiance unique.*

*Merci à Sophie de m'avoir sauvé à plusieurs reprises du naufrage informatique c'est promis demain je suis une formation accélérée en info.*

*Merci d'ailleurs aux macs et à Etienne pour toutes les frayeurs que j'ai pu subir face à cesv écrans d'ordinateurs.*

*Que serait un mémoire sans tous mes compagnons de galère, merci à Allan, Mel, Gladys, Sarah, Caro, Marie, Fan, Agustina, Val, pour m'avoir soutenu dans les moments difficiles et je sais qu'ils ont été nombreux.Merci à Gégé car grâce à toi je suis d'attaque pour faire un karaoké de l'album complet d'Indochine. J'espère que cet album tu t'en souviendra. Bonne chance à toi pour la suite. Merci à Jérôme pour m'avoir consolé lorsque les larmes ont coulé, merci pour ton humour et ton écoute qui m'ont sauvé plus d'une fois des coups de blues. Par contre tes commentaires sur certains sujets t'oublie, hein!!!*

*A côté de cela je n'oublie les deuxième licence je vous souhaite à tous le meilleur dans les années à venir. Un grand merci à Catou et à Babeth pour avoir partagé ces 4 années, je vous remercie d'avoir pris le temps d'écouter toutes mes conneries à propos des études, de la famille et de l'amour (hum). Merci surtout pour toutes les guindailles qui resteront de supers souvenirs à raconter et en espérant que l'on en ajoutera d'autres à notre palmarès!!!!*

*Merci à Chouchou ( et oui je l'ai dit) toi qui ne me connais que depuis quelques mois. Tu as été pour moi un énorme soutien moral. Je te remercie pour la patience dont tu as fait preuve lorsque je n'avais pas de temps à t'accorder et lorsque j'étais insupportable. Dis toi que tu as vu les mauvais côtés de mon caractère et tu as vécu le pire (enfin c'est ce que je te laisse croire).*

*Pour terminer je veux remercier les personnes qui me sont les plus chères, mes parents. Merci à mon papa je sais que tu aurais préféré avoir un petit homme fou de mécanique mais pas de chance t'as une fille bientôt biologiste. Même si je ne suis pas ce que tu espérais je crois que tu peux être fier de toi pour avoir fait de moi ce que je suis. Merci pour l'investissement non négligeable que tu as fait pour me payer ces études et merci de m'avoir transmis ta volonté.*

*Un merci tout particulier à ma maman, tu vois maman on y est arrivée tu peux sortir ta bouteille de champagne (mais ne l'affone pas svp, à ce prix là). Mine de rien ces 4ans sont vite passés et même si pour toi cela a été aussi difficile que pour moi, je sais que mes sauts d'humeur pendant le blocus, les " je n'y arriverai jamais ", "tout est foutu" et toutes les fois où tu es venue t'asseoir dans mon bureau pour me reconforter tout ça j'en suis persuadée ça va nous manquer.*

*"The best is yet to come"  
Carotte ,*

## Abbreviations

Nal :	acide nalidixique
Kan :	kanamycine
Amp :	ampicilline
Sm :	streptomycine
Cm :	chloramphénicole
IPTG :	Isopropyl- $\beta$ -D-thiopyranoside
bla :	gène de résistance à l'ampicilline
cat :	gène de résistance au chloramphénicole
GFP :	green fluorescent protein
pb :	paires de bases
Kb :	kilo bases
Mb :	mégabase
PCR :	polymerase chain reaction
A :	Adénine
T :	thymidine
C :	cytosine
G :	guanosine
ADN :	acide désoxyribonucléique
ARN :	acide ribonucléique
dNTP :	désoxyribonucléotide
ddNTP :	didésoxyrinucléotide
Tm :	température de melting
mcs :	site multiple de clonage
SDS :	sodium dodecyl sulfate
BSA :	Bovine serum albumine
DO :	densité optique
Rpm :	rotation par minute
UV :	ultraviolet
V :	volt
mA :	milliampère
RE :	reticulum endoplasmique

## Table des matières.

1. Introduction.....	4
1. Les alpha protéobactéries.....	4
1.1 Classification.....	4
1.2 Membres des alpha-protéobactéries.....	7
1.3 Evolution génomique.....	7
2. Comparaison <i>Brucella</i> - <i>Rhizobium</i> .....	11
2.1 Taxonomie et génome.....	11
2.1.1 <i>Brucella</i> .....	11
2.1.2 <i>Rhizobium</i> .....	13
2.2 Analyse du processus pathogène et symbiotique.....	15
2.2.1 L'invasion.....	15
a) le recrutement.....	15
b) l'adhérence.....	16
c) l'entrée dans les tissus de l'hôte.....	17
d) pénétration de la cellule cible.....	19
e) échappement à la réponse cellulaire.....	22
2.2.2 Trafic intracellulaire des bactéries.....	22
a) trafic intracellulaire d'un agent non pathogène:.....	22
b) trafic intracellulaire de <i>Brucella</i> dans les cellules non phagocytaires.....	24
2.2.3 Multiplication et transmission des bactéries.....	26
2.3 Identification moléculaire des acteurs de la virulence et de la symbiose.....	28
2.3.1 Systèmes de sécrétion.....	29
a) système de sécrétion de type III.....	30
b) système de sécrétion de type IV.....	30
2.3.2 Autres facteurs communs à <i>Brucella</i> et <i>Rhizobium</i> .....	31
3. Rhizopine.....	33
3.1 Généralités.....	33
3.2 Structure et fonction de la rhizopine.....	35
3.3 Synthèse de la rhizopine.....	38
3.3.1 Organisation des gènes <i>mos</i> .....	38
3.3.2 Régulation des gènes <i>mos</i> .....	40
3.4 Catabolisme de la rhizopine.....	40
3.4.1 Organisation des gènes <i>moc</i> .....	41
3.4.2 Régulation des gènes <i>moc</i> .....	42
2.Objectif du mémoire.....	43
3. Résultats.....	44
Méthodologie du travail.....	44
3.1. Caractérisation des gènes <i>mos</i> / <i>moc</i> chez <i>B. melitensis</i> .....	44
3.1.1 Organisation des gènes <i>mos</i> et <i>moc</i> chez <i>B. melitensis</i> .....	44
3.1.1.1 Les gènes <i>moc</i> .....	44
3.1.1.2 Les gènes <i>mos</i> .....	45
3.1.2 Etude des mutants <i>mos/moc</i> .....	46
3.1.2.1 Constructions des mutants.....	46
3.1.2.1.1 Principe.....	46
a) Construction du plasmide recombinant.....	46
b) Transfert conjugatif des plasmides dans la souche <i>B. melitensis</i> 16M NaI <sup>R</sup> .....	49
c) Validation des mutants.....	51
3.1.3 Caractérisation des mutants dans les systèmes <i>mos</i> / <i>moc</i> .....	52

3.1.3.1	Analyse de la virulence résiduelle en souris.....	52
3.1.3.2	Phénotype métabolique des mutants. ....	53
3.2.	Construction de systèmes rapporteurs.....	55
3.2.1.	Amplification des régions promotrices. ....	56
3.2.1.1	Définition des primers. ....	56
3.2.1.2	Amplification des inserts. ....	56
3.2.2	Clonage dans le pGEM-TEasy. ....	57
3.2.3	Préparation de la matrice. ....	59
3.2.4	Construction des systèmes rapporteurs. ....	60
3.2.4.1	Clonage des régions promotrices dans le pBBR1-GFP.....	60
3.2.4.2.	Vérification de la présence de l'insert. ....	62
3.2.4.3	Validation des constructions. ....	63
3.2.5.	Transformation des vecteurs dans <i>B.melitensis</i> . ....	63
3.3.	Etude des conditions d'induction des gènes.....	64
3.3.1	Utilisation du gène rapporteur <i>cat</i> .....	64
3.3.2	Effet de l'inositol et de la rhizopine.....	64
3.3.3.	Utilisation de la GFP. ....	65
3.3.3.1	Etude de l'activité des promoteurs en macrophages. ....	65
4.	Conclusions et perspectives. ....	68
5.	Matériel et méthodes.....	73
5.1.	Matériel biologique.....	73
5.1.1	Souches bactériennes et plasmides. ....	73
5.1.1.1	Souches bactériennes.....	73
5.1.1.2	Plasmides. ....	74
5.1.2	Milieux de culture. ....	77
5.1.2.1	Milieux de culture pour <i>E.Coli</i> ....	77
5.1.2.2	Milieux de culture pour <i>Brucella</i> ....	77
5.1.2.3	Solutions et antibiotiques :.....	78
5.1.2.4	Milieux de culture des cellules eucaryotes. ....	79
5.2.	Méthodes. ....	79
5.2.1	Tehniques relatives à l'ADN. ....	79
5.2.1.1	Préparation de cellules électrocompétentes. ....	79
5.2.1.2	Préparation de cellules CaCL <sub>2</sub> compétentes. ....	79
5.2.1.3	Transformation de cellules compétentes. ....	80
5.2.1.4	Conjugaison bactérienne.....	82
5.2.1.5	Extraction de l'ADN plasmidique.....	84
5.2.1.6	Extraction d'ADN génomique de <i>Brucella sp.</i> ....	86
5.2.1.7	Purification de l'ADN. ....	86
5.2.1.8	Restriction de l'ADN plasmidique.....	86
5.2.1.9	Electrophorèse en gel d'agarose. ....	87
5.2.1.10	Extraction d'ADN sur gel et purification. ....	88
5.2.1.11	Réaction de ligation. ....	88
5.2.1.12	Amplification de l'ADN. ....	89
5.2.1.13	Séquençage.....	91
5.2.1.14	Analyse par Southern blot.....	91
5.2.2	Manipulations relatives à l'émission de fluorescence.....	95
5.2.2.1	Solutions et matériel.....	95
5.2.2.2	Préparation des doses infectantes.....	95
5.2.2.3	Infection de macrophages. ....	96
5.2.2.4	Observations des <i>Brucella</i> au microscope à fluorescence.....	97

5.2.2.5 Observations de la fluorescence en cas d'infection. ....	97
5.2.3 Infection en souris. ....	98
6. Bibliographie. ....	100

# 1.Introduction.

## 1. Les alpha protéobactéries.

### 1.1 Classification

La taxonomie actuelle scinde les êtres vivants en cinq catégories : les animaux, les plantes, les protistes, les champignons et les procaryotes. Les procaryotes correspondent aux bactéries alors que tous les autres types d'organismes sont assimilés aux eucaryotes.

La différence entre ces deux types cellulaires s'observe à plusieurs niveaux. La principale différence est liée à la présence chez les eucaryotes d'un noyau délimité par une enveloppe nucléaire isolant le matériel génétique du reste de la cellule. D'autres variations peuvent être énoncées comme l'absence de la majorité des organites (mitochondrie, Golgi, RE,...) et d'éléments du cytosquelette (microtubules) chez les procaryotes.

Sur base d'études de l'ARNr16S on a pu distinguer deux groupes au sein des procaryotes

- Les archaebactéries, dépourvues d'acide muramique dans leur paroi, elles ressemblent aux eubactéries par leur structure mais en divergent totalement du point de vue moléculaire(Prescott, 1995).
- Les eubactéries réparties en 11 embranchements parmi lesquels on peut citer les cyanobactéries, les mycoplasmes,...et particulièrement les protéobactéries auxquelles nous nous intéresserons (figure 1.1).

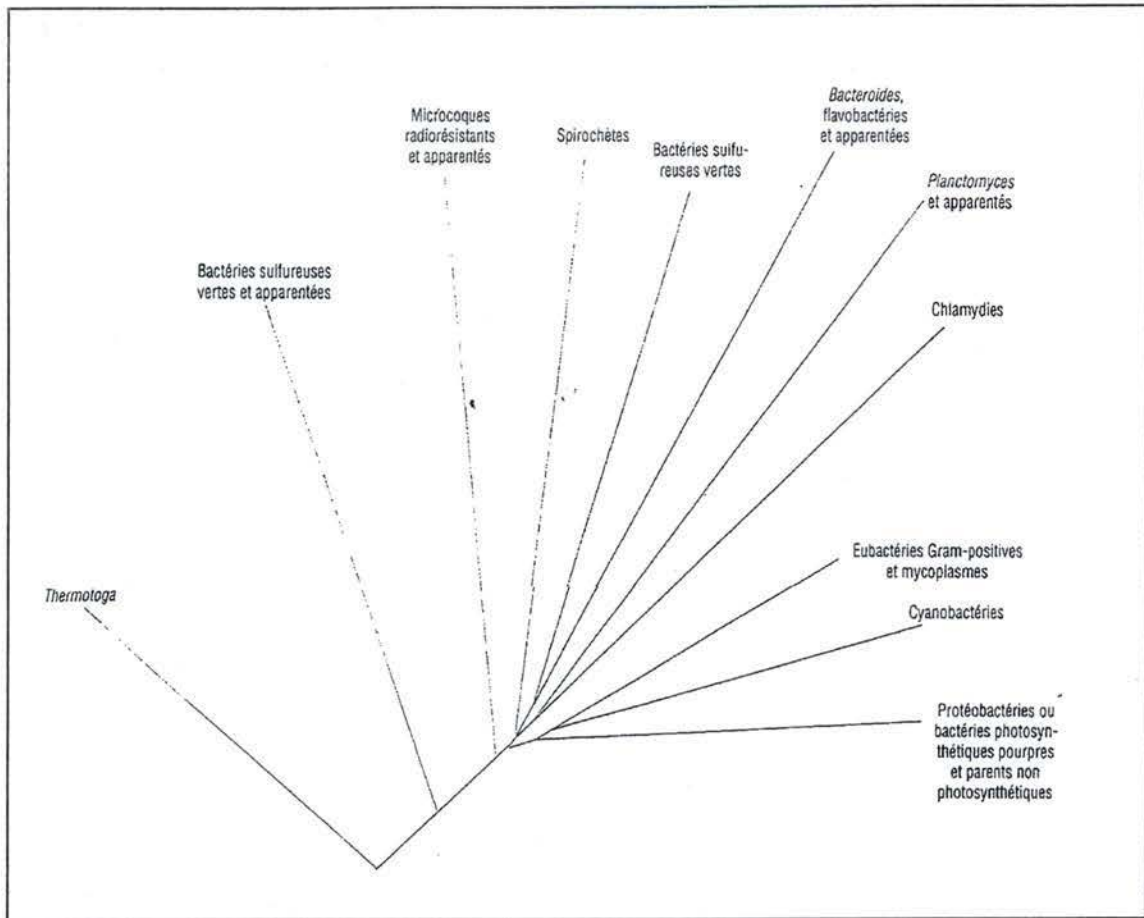


Figure 1.1 : Arbre phylogénétique des eubactéries sur base de la comparaison des séquences d'ARNr 16S. Les longueurs des branches sont proportionnelles aux distances évolutives (Prescott, 1995).

L'ancêtre commun des protéobactéries a été décrit comme une bactérie pourpre, photosynthétique. A l'heure actuelle, les protéobactéries comprennent les bactéries photosynthétiques et leurs parents non photosynthétiques. Les protéobactéries sont réparties en 5 sous-embranchements qui sont :

- le sous-embranchement bêta qui comprend entre autres: *Bordetella pertussis* (agent de la coqueluche), *Neisseria* (bacilles cocciformes non mobiles dont certaines espèces sont responsables de méningite),...
- le sous-embranchement gamma dont la famille la plus connue est celle des entérobactéries avec des genres comme *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*,...
- les sous-embranchements delta et epsilon regroupent des bactéries réductrices de soufre et quelques myxobactéries (Moreno, 1998).
- et enfin le sous-embranchement contenant les alpha protéobactéries.

Pour plus de clarté pour le reste de l'exposé nous allons énoncer l'organisation taxonomique de ce dernier sous embranchement. En s'attardant, principalement sur la classification des bactéries que nous traiterons au cours de ce travail. Parmi les alpha-protéobactéries on dénombre trois groupes majoritaires qui sont les *Rickettsiaceae*, les *Bradyrhizobiaceae* et les *Rhizobiaceae* ou *Rhizobiae* (figure 1.2) . Ce dernier groupe comprend les bactéries des genres *Rhizobium*, *Brucella* et *Agrobacterium* (qui seront plus détaillées dans ce travail).

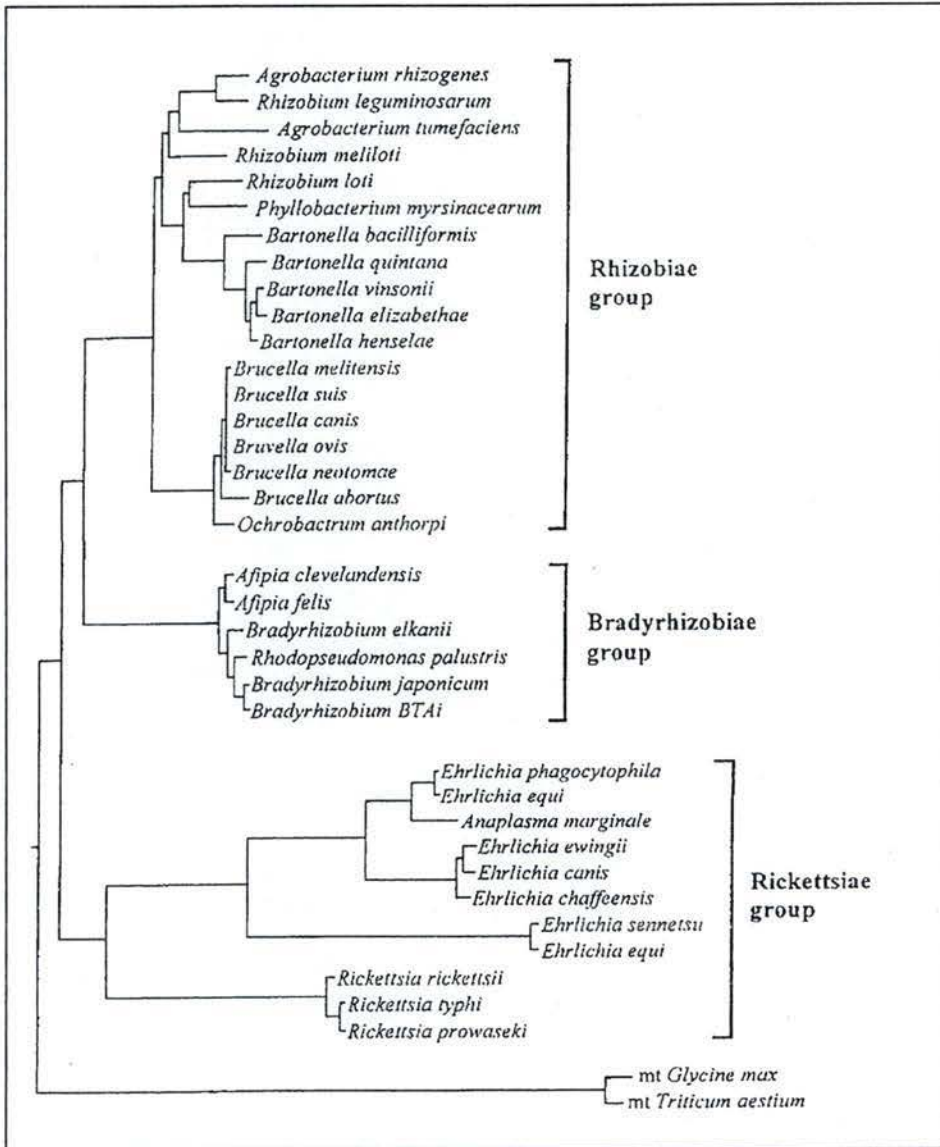


Figure 1.2 : Arbre phylogénétique des alpha-protéobactéries (Pizarro-Cerdà, 1999).

## 1.2 Membres des alpha-protéobactéries.

La sous division des  $\alpha$ -protéobactéries comprend de nombreux genres bactériens dont le mode de vie englobe la plupart des relations qu'une bactérie peut établir avec d'autres organismes. Parmi les  $\alpha$ -protéobactéries les plus couramment étudiées, on peut citer des bactéries capables de développer une interaction avec des végétaux comme c'est le cas d'*A. tumefaciens* défini comme étant un phytopathogène et un endosymbiote ; *Rhizobium*. Enfin on y découvre de nombreux pathogènes de vertébrés comme *Ochrobactrum anthropi*, *Bartonella* un parasite des érythrocytes chez l'humain et d'autres vertébrés, *Brucella* pathogène intracellulaire facultatif, *Rickettsia* décrite en tant que bactérie intracellulaire obligatoire. Notons que l'ancêtre des alpha-protéobactéries, suite à l'établissement d'une relation endosymbiotique avec une autre bactérie serait à l'origine de la mitochondrie (Prescott, 1995). Cette affirmation est soutenue par des analyses phylogénétiques basées sur des comparaisons de séquences de l'ARNr et des protéines « heat-shock » suggérant de plus que l'ancêtre de la mitochondrie semble être la bactérie *Rickettsia prowazekii* (Andersson *et al.*, 1998).

## 1.3 Evolution génomique.

Les  $\alpha$ -protéobactéries montrent une organisation génomique hors du commun. En effet, alors que la plupart des procaryotes sont connus pour ne posséder qu'un seul chromosome, la présence de deux voire trois chromosomes est fréquente chez les  $\alpha$ -protéobactéries.

Elles font donc preuve d'une remarquable hétérogénéité dans l'organisation de leur matériel génétique (nombre de chromosomes inhabituel et présence de plasmides).

On peut noter de manière générale que les bactéries vivant dans des milieux changeants tels que le sol, le tube digestif,...ont des tailles de génome relativement importantes, de grands plasmides ainsi qu'une capacité de transfert horizontal développée. Par contre, des bactéries colonisant les milieux stables comme l'intérieur de cellules eucaryotes sont dotées d'un génome de taille réduite et ne possèdent pas de plasmide (Ochman and Moran, 2001).

Cette observation peut s'expliquer par l'hypothèse dite d'adaptation locale qui postule que les caractères situés sur les plasmides sont des adaptations aux variations locales et spontanées de

l'environnement (Moreno, 1998). Pour illustrer, cette hypothèse prenons l'exemple d'une bactérie pathogène *Rickettsia* et celui de *Rhizobium*, un symbiote.

*Rhizobium meliloti* (bacille gram négatif) oscille entre 2 modes de vie, elle vit dans le sol mais est aussi capable d'infecter les racines des légumineuses. Pour s'adapter à ces différentes conditions de vie, la bactérie possède un arsenal de gènes que l'on retrouve distribué sur un chromosome de 3.65Mb et sur 2 mégaplasmides de 1.68 et 1.35Mb contribuant à divers degrés dans la symbiose (Galibert *et al.*, 2001).

Les rickettsiales sont des petites bactéries gram négatives bacilliformes sans flagelles.

Plusieurs d'entre elles sont des pathogènes de l'homme chez qui elles provoquent le typhus. Ces bactéries infectent leurs hôtes finaux (vertébrés) par l'intermédiaire d'un vecteur qui est souvent un arthropode (tique,...) (Prescott, 1995). Elles présentent un métabolisme particulier. En effet, étant parasite intracellulaire obligatoire, la bactérie a pu abandonner certaines voies métaboliques (comme la glycolyse)(Prescott, 1995) cela se manifeste de façon générale au niveau génomique par une réduction des gènes encodant pour ces fonctions. Pour compenser cela, la bactérie a subi des variations physiologiques au niveau de sa membrane en augmentant le nombre de ses systèmes de transport afin de pouvoir puiser les nutriments au sein de la cellule. On sait que les membranes sont imperméables aux nucléotides pourtant on a découvert chez *R. prowazekii*, des gènes encodant pour des ATP/ADP translocases (Zomodipour and Andersson, 1999).

Cette importante réduction du génome ne s'applique pas uniquement aux rickettsiales étant donné qu'un grand nombre d'études démontrent une tendance à la réduction des gènes chez les bactéries intracellulaires obligatoires. Certains auteurs parlent de syndrome des génomes résident (génome de bactéries vivant en promiscuité avec les cellules eucaryotes) qui se manifeste par la réduction du génome et un biais en A/T (Moran and Wernegreen, 2000). Une étude comparant les génomes de deux parasites intracellulaires obligatoires *Rickettsia et Chlamydia* met en évidence une tendance à la réduction des mêmes gènes (surtout ceux impliqués dans les voies de biosynthèse) (figure 1.3). Des analyses phylogénétiques ont indiqué que ces deux bactéries proviennent d'un ancêtre commun possédant un large génome ayant subi des délétions, conséquence d'une évolution à long terme imposées par un milieu de vie isolé (Ochman and Moran, 2001).

Paradoxalement, ces bactéries ont acquis par transferts horizontaux, des gènes en relation avec la virulence en vue d'améliorer les interactions avec l'hôte, comme c'est le cas notamment des îlots de pathogénicité<sup>1</sup> (Ochman and Moran, 2001).

---

<sup>1</sup> Les îlots de pathogénicité sont des segments d'ADN particuliers présents chez les bactéries gram négatives. Plusieurs caractéristiques peuvent être énoncées :

- ils contiennent beaucoup de gènes de virulence rassemblés en entité génétiques distinctes encadrées de « direct repeat » et dont le contenu en G-C est différent du reste du génome bactérien.
- ils sont présents chez les souches pathogènes mais absents ou sporadiques dans les souches non pathogènes de la même espèce.
- ils occupent de grandes régions du génome.
- ils s'associent avec des gènes de tRNA et/ou des séquences d'insertion.
- ils possèdent des gènes de mobilité comme des éléments IS, les intégrases, les transposases et des origines de répllication plasmidique.
- ils ont une grande instabilité.

(Kaper, 1999).

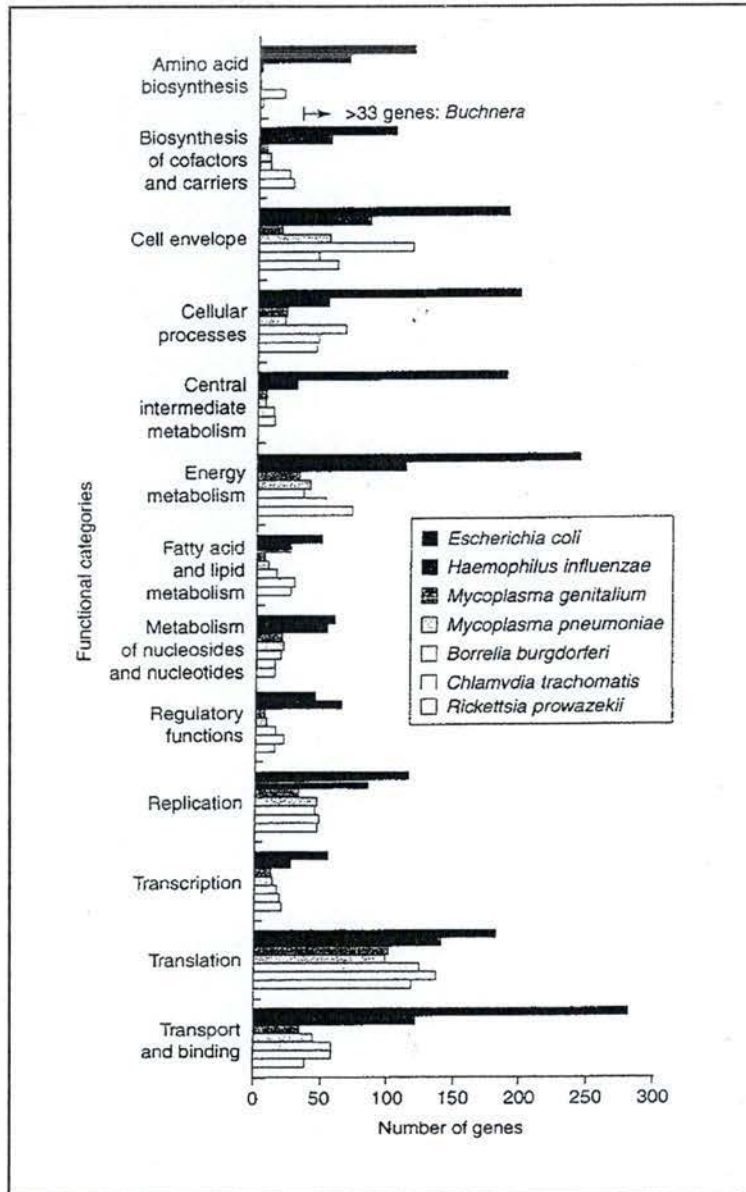


Figure 1.3 :Schéma représentant les diverses catégories fonctionnelles de gènes. Le schéma met en évidence une réduction des gènes du métabolisme au profit de gènes codant pour des systèmes de transport dans le cas de bactéries intracellulaires (par exemple *Rickettsia* et *Chlamydia* ) (Moran, 2000) .

## 2. Comparaison *Brucella*- *Rhizobium*.

Parmi les  $\alpha$ -protéobactéries, nous nous intéressons à *Brucella* et *Rhizobium*, définies comme deux bactéries intracellulaires facultatives responsables d'infections chroniques chez leurs hôtes. Une brève description de ces deux bactéries est faite dans les lignes suivantes:

*Rhizobium* est une bactérie du sol, capable d'interactions avec les végétaux avec lesquels elle établit une relation symbiotique. La finalité de cette association est bénéfique pour les deux organismes puisque la bactérie assimile l'azote atmosphérique en procurant ainsi de l'azote réduit à la plante, qui en échange assure la protection et l'apport en nutriments au microorganisme.

*Brucella* est une bactérie pathogène de mammifères à l'origine d'une maladie infectieuse nommée Brucellose ou fièvre de Malte (dans le cas de l'humain) (Young, 1995). Chez les animaux infectés, la bactérie possède un tropisme important pour les organes reproducteurs entraînant des problèmes de stérilité chez les mâles (épididymite,...) tandis que chez la femelle, la bactérie envahit les tissus placentaires et foetaux conduisant souvent à des avortements.

### 2.1 Taxonomie et génome.

#### 2.1.1 *Brucella*.

##### Taxonomie de la bactérie.

La découverte de *Brucella* remonte à 1887 où Bruce l'avait décrite pour la première fois. Il s'agit d'un petit coccobacille gram négatif, non mobile, aérobic (Young, 1995). Plusieurs possibilités existent au sujet de la classification du genre *Brucella*. Il existe un système de classification tenant compte de caractéristiques biochimiques comme la susceptibilité de la bactérie à certains phages et des voies d'oxydation de carbohydrates et d'acides aminés mais aussi en fonction de l'hôte de prédilection (O'Callaghan and MacMillan, 2001). Cette classification semble la plus répandue, elle répartit donc le genre *Brucella* en 6 espèces : *B. ovis*, *B. canis*, *B. abortus*, *B. neotomae*, *B. melitensis*, *B. suis*. ( figure1.4) dont 4 sont connues pour être pathogènes chez l'humain : *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. melitensis* (Corbel, 1997). D'autre part, les avancées au niveau des techniques de biologie moléculaire ont permis d'assimiler le genre *Brucella* sur base de comparaisons de séquences d'ARN ribosomal (16S) à la sous division des  $\alpha$ -protéobactéries dans le groupe des *Rhizobiaceae*. D'autres études axées sur l'hybridation ADN/ADN montre 95% de similitudes

entre les divers membres du genre faisant de *Brucella* un genre monospécifique (Corbel, 1997; Gandara *et al.*, 2000). Pour cette raison, la nomenclature actuelle tend à ne considérer qu'une seule espèce qui est *Brucella melitensis*. Tandis que les autres seraient dénommées comme étant des biovars, par exemple *B. melitensis* biovar abortus1 (Verger *et al.*, 1987).

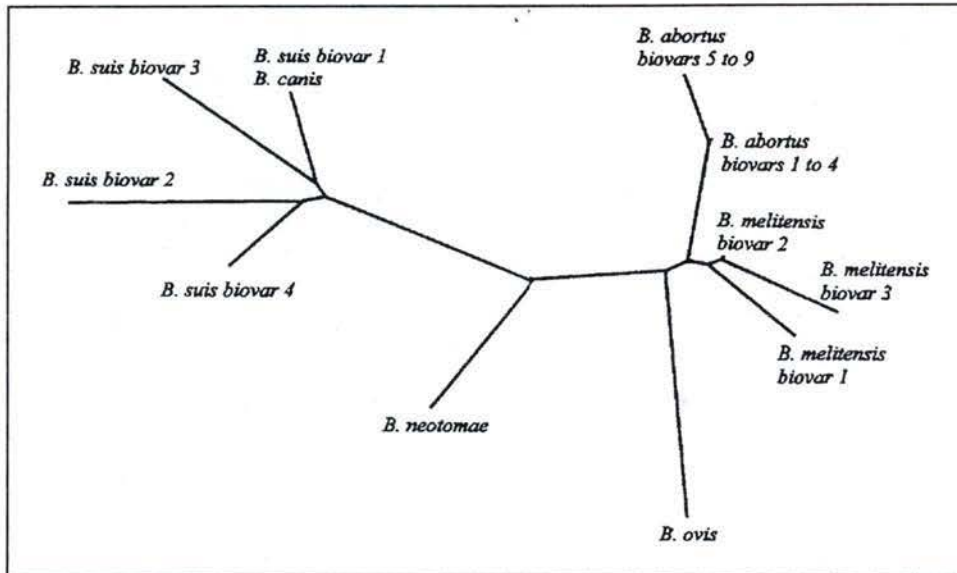


Figure 1.4 : Arbre phylogénétique des six espèces de *Brucella* (Jumas-Bilak, 1998).

### Génome de *Brucella*.

Des études réalisées par Jumas-Bilak ont servi dans l'élaboration d'une carte physique du génome de *B. melitensis* révélant l'absence de plasmide naturel et la présence de 2 chromosomes d'une taille respective de 1.1Mb et de 2.2Mb chez cette espèce. Cette organisation est conservée pour la plupart des espèces à l'exception de *B. suis* où les biovars 2 et 4 montrent des variations dans la taille des chromosomes tandis que le biovar 3 ne possède qu'un seul chromosome (Jumas-Bilak *et al.*, 1998).

Récemment, le génome de *B. melitensis* a été totalement séquencé. Les données de séquençage nous informent qu'il contient 3 294 935pb distribuées sur les deux chromosomes, tous deux porteurs de gènes essentiels. Le chromosome II est particulièrement intéressant puisqu'il possède de nombreux gènes homologues avec ceux portés par le plasmide pSymA

de *Rhizobium meliloti*. Par contre, aucun homologue aux gènes du pSymA n'est retrouvé sur le chromosome I de *Brucella*. De plus, les résultats de ce séquençage nous révèlent qu'environ 87% de la séquence est codante, parmi les fonctions encodées par les différents gènes on retrouve des gènes dans différents systèmes de transport : ABC transporteurs, des transporteurs impliqués dans l'adaptation aux changements d'osmolarité, de systèmes de transport de l'érythritol (sucre produit par les organismes gestants)... On découvre de nombreux gènes en relation avec des voies métaboliques habituelles ainsi que des gènes requis pour la synthèse de lipides et phospholipides, des gènes encodant des enzymes de dégradation de l'érythritol. Plus étonnant, on a répertorié sur le chromosome II un ensemble de gènes codant pour des enzymes intervenant dans la dénitrification, il est donc possible que la bactérie soit capable de croître en anaérobie par respiration du nitrate (DelVecchio *et al.*, 2002). Enfin, l'analyse complète du génome a permis l'identification des gènes flagellaires, des gènes homologues aux gènes de systèmes de sécrétion,... pour lesquels une implication dans la virulence de la bactérie a été par la suite démontrée (Moreno and Moriyon, 2002) (Delrue *et al.*, 2001; O'Callaghan *et al.*, 1999)(D.Fretin, thèse en cours).

### 2.1.2 *Rhizobium*.

#### Taxonomie de la bactérie.

La systématique répartit les différents de types de *Rhizobiaceae* en fonction de leur spécificité de l'hôte. On distingue donc les genres (Johnston):

- *Rhizobium* incluant des souches de croissance rapide avec une gamme d'hôtes restreinte.
- *Bradyrhizobium* ( ne fixe pas l'azote) où la gamme d'hôtes est plus variée .
- *Azorhizobium* regroupant les symbiotes des plantes tropicales.

#### Génome de *Rhizobium*

Les bactéries appartenant au genre *Rhizobium* présentent une organisation génomique différente de celle décrite pour *Brucella*.

L'espèce la mieux connue au point de vue génomique est *R. meliloti* dont le génome consiste en trois réplicons :- un chromosome d'une taille de 3,65Mb

- deux mégaplasmides : pSymA de 1,35Mb et pSymB de 1,68MB

(Galibert *et al.*, 2001).

La taille des mégaplasmides étant comparable à celles de certains génomes bactériens, cela nous pousse à la question de l'origine de ces éléments génomiques. Les plasmides sont définis comme des réplicons ne portant aucun gène essentiel à la multiplication ou la survie de la bactérie. On assimile aisément à cette définition le pSymA. Le séquençage du pSymA a été entrepris par l'équipe de M.J.Barnett. L'analyse de sa séquence montre l'absence de gènes essentiels sur ce plasmide. De plus, des gènes de transfert conjugatif (*tra*) ainsi qu'une séquence d'origine de transfert putative y ont été retrouvés. La plupart des autres gènes du pSymA codent pour des protéines intervenant dans la nodulation (*nod*) et dans la fixation de l'azote (*fix*) chez *R. meliloti*, ainsi que dans le métabolisme de l'azote et des opines (Barnett *et al.*, 2001). A l'opposé, le pSymB ne contient pas de gènes *tra* et comprend de nombreux gènes essentiels. Il est porteur de plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques, des systèmes de transport de type ABC, des gènes de synthèse et de catabolisme,...ainsi 20% de la séquence est constituée de gènes codant pour des systèmes de transport (la majorité appartenant à la famille des ATPbinding protein). L'autre grande catégorie des gènes (14%) est en relation avec des voies de biosynthèse et particulièrement celle des lipopolysaccharides et d'autres composants de la surface cellulaire tels que les gènes *exo* (encodant pour des protéines de synthèse d'exopolysaccharide). En bref, la description du pSymB montre que la plupart de ces gènes sont importants pour l'adaptation de la bactérie aux variations environnementales et tend à le considérer comme un élément génétique non plasmidique (Finan *et al.*, 2001).

Etant donné les variations de la structure et les caractères des trois réplicons, certains auteurs avancent qu'ils auraient été acquis séparément par un ancêtre commun possédant un seul chromosome. Le pSymA aurait été acquis récemment par transfert horizontal tandis que le pSymB proviendrait d'une excision du chromosome (Galibert *et al.*, 2001).

## 2.2 Analyse du processus pathogène et symbiotique.

Souvent dans la littérature, on décrit la pathogénie et la symbiose comme deux manifestations différentes de la relation hôte-bactérie. Ces deux modes de vie étant néanmoins proches puisque ces bactéries infectent les organismes eucaryotes. Cela suggère une confrontation aux mêmes épreuves ce qui paraît avoir été résolu de façon semblable dans les deux cas (Tamas *et al.*, 2001), bien que la finalité de ces associations soit totalement différente selon le cas considéré. En fait, le principal point de divergence entre les bactéries symbiotiques et pathogènes est lié à l'issue de la relation menée par le procaryote. Le pathogène provoque des dommages chez l'hôte tandis que dans la symbiose ils bénéficient tous deux de cette association (Hentschel *et al.*, 2000).

En ce qui concerne le parallélisme entre *Brucella* et *Rhizobium* il fait l'objet de plusieurs publications (Eskra *et al.*, 2001; LeVier *et al.*, 2000; Sieira *et al.*, 2000; Ugalde, 1999). Pourtant les similitudes observées entre les deux bactéries ne se manifestent pas distinctement dans le cadre de leur processus infectieux. Par contre, lorsqu'on s'intéresse à l'aspect moléculaire des mécanismes de symbiose et de pathogénie, on peut y déceler de nombreuses similitudes entre les gènes exprimés chez *Brucella* et *Rhizobium*, lors des différentes étapes de l'interaction avec leurs hôtes (recrutement- invasion- survie- multiplication). Cette similitude est toute aussi frappante lors des analyses génomiques même fragmentaires.

Le point suivant aura pour but de comparer ces deux processus infectieux afin de mettre en évidence les éventuelles analogies ainsi que les différences observées chez ces deux bactéries lors de l'interaction avec leurs hôtes.

### 2.2.1 L'invasion.

#### a) le recrutement.

Une des premières conditions pour que la bactérie entre en interaction avec son hôte consiste en la mise en présence des deux partenaires.

Un processus spécifique s'établit lors de la symbiose. En effet, le recrutement de *Rhizobium* débute après la production de signaux sécrétés par le végétal, suite à des stress comme par exemple, un manque en azote (Patriarca *et al.*, 2002). Ces signaux sont des flavonoïdes (luteoline, isoflavones, ...) (figure 1.5) ou des acides aminés présents dans les exudats de la

plante. La bactérie répond à ce signal en se déplaçant en direction du système racinaire du végétal à l'aide de son flagelle (Van Rhijn and Vanderleyden, 1995).

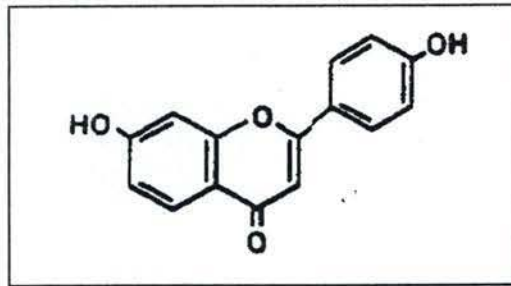


Figure1.5 : Exemple de flavonoïde. Schéma représentant la structure du flavone (Phillips, 1995).

Dans le cas de *Brucella*, la bactérie rencontre son hôte suite aux interactions directes ou non avec des animaux ou aliments infectés (lait non pasteurisé, fromages crus,...). Par conséquent, les contacts répétés avec des organismes malades font partie des facteurs favorisant les probabilités d'infection par la bactérie (Wallach *et al.*, 1997).

#### b) l'adhérence.

*Rhizobium* est capable d'adhérer à la surface du poil racinaire par des liens spécifiques entre des structures polysaccharidiques présentes en surface de la bactérie et des lectines exposées en surface de la plante (Van Rhijn and Vanderleyden, 1995). Le mécanisme d'adhérence se déroule en 2 étapes. La première correspond à l'attachement de la bactérie en surface d'une cellule, puis à la formation d'une micro-colonie au site d'adhésion. Les déterminants de ces étapes d'adhésion restent encore mal définis. Seul le mécanisme d'attachement à la paroi cellulaire de *R. leguminosarum* est un peu plus élucidé. On sait que la première étape de l'attachement est médiée par un mécanisme dépendant des adhésines et la seconde étape est possible grâce à des appendices formés de cellulose (Van Rhijn and Vanderleyden, 1995).

Une fois que *Rhizobium* est attachée à la paroi cellulaire, la bactérie exprime des facteurs lipo-oligosaccharidiques appelés facteurs Nod (figure1.6). Ces facteurs déclenchent chez le végétal une réorganisation morphologique de l'extrémité racinaire. Le mécanisme d'activation des gènes codant pour ces facteurs nécessite la perception des flavonoïdes. Ces

composés activent une protéine NodD, un régulateur transcriptionnel agissant sur l'opéron *nod* conduisant à l'expression des facteurs nod (Spaink, 2000).

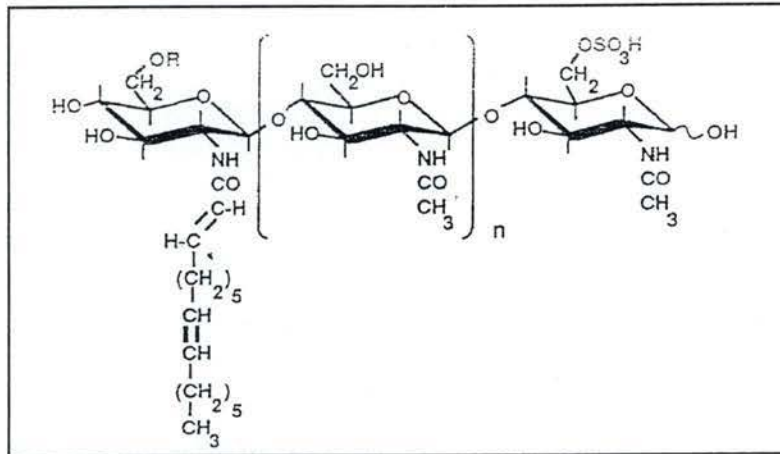


Figure 1.6 : Structure du facteur Nod où R représente un hydrogène ou un groupe acétyl [Dénarié, 1992 #109].

*Brucella* adhère à son hôte au niveau des conjonctives et du tractus intestinal (O'Callaghan and MacMillan, 2001). A l'heure actuelle, les mécanismes d'adhérence employés par la bactérie au niveau des tissus de l'hôte ne sont pas encore connus. Mais par contre, les moyens mis en place par *Brucella* pour assurer son adhérence en surface des cellules eucaryotes sont mieux cernés (voir plus loin).

### c) l'entrée dans les tissus de l'hôte.

L'entrée de *Rhizobium* à l'intérieur de la plante est un processus complexe. Après s'être localisée au niveau du poil racinaire, la bactérie par la production des facteurs Nod réorganise le cytosquelette des cellules végétales afin d'y induire une courbure des cellules en croissance. Cette déformation du poil racinaire, permet à la colonie d'être englobée par le poil racinaire lui permettant de ce fait, de pénétrer dans le système racinaire de la plante (figure 1.7).

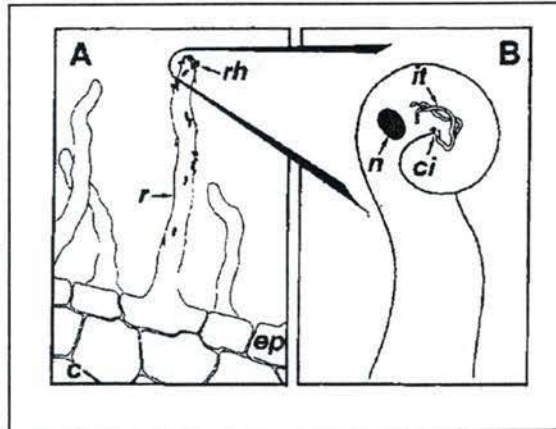


Figure 1.7 : Invasion du poil racinaire (r) par *Rhizobium* (rh). Dans un premier temps, les bactéries s'attachent au poil racinaire (A). En (B), le processus de déformation du poil est amorcé par la production des facteurs nod et la bactérie envahit la racine par le centre d'infection (ci) et débute la formation du cordon d'infection (it). Autres abréviations (c) =cortex, (ep) épiderme et (n) noyau (Perret, 2000).

Dès que *Rhizobium* est en contact avec la paroi cellulaire, une hydrolyse de la paroi végétale se produit. Les mécanismes exacts de cette dégradation enzymatique restent mal compris (Van Rhijn and Vanderleyden, 1995). On sait que cette détérioration de la paroi, permet à la bactérie d'envahir la racine. Son entrée dans le système racinaire est médiée par un mécanisme d'invagination de la membrane plasmique qui vient entourer la bactérie (Johnston).

*Brucella* semble envahir son hôte, par un mécanisme semblable à celui utilisé par les bactéries entéropathogènes pénétrant dans les tissus grâce aux cellules M, dont la fonction est de transférer les antigènes au travers de l'épithélium muqueux (Jepson and Clark, 1998). La bactérie exploite donc cette capacité de transfert comme moyen d'invasion pour accéder aux tissus les plus profonds (Thèse de R-M Delrue).

#### d) pénétration de la cellule cible

Pour accéder à la cellule corticale dans laquelle *Rhizobium* se différencie en bactéroïdes et provoque la nodulation, elle a recours à un système lui permettant de traverser le poil racinaire et d'aboutir à la cellule cible. Ce mécanisme de pénétration des tissus du végétal est connu sous le terme de cordon d'infection (figure 1.8).

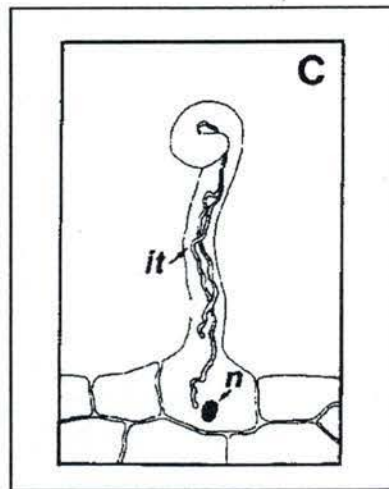


Figure 1.8 : Formation du cordon d'infection (it) en direction du cortex. Autre abbréviation (n)= noyau (Perret, 2000).

Dès les premiers instants suivant l'hydrolyse de la paroi, la plante réagit en déposant de nouvelles cellules (souvent arrêtées en phase G2 du cycle cellulaire) autour de la zone de lésion, initiant ainsi la formation du cordon d'infection menant progressivement les bactéries au cortex racinaire ( figure 1.9)(Van Rhijn and Vanderleyden, 1995). Simultanément à la formation de ce cordon d'infection on assiste à des modifications au niveau des cellules corticales (réarrangements du cytosquelette, migration du noyau vers le centre de la cellule,...(Oke and Long, 1999)) qui tendent à faire penser que la cellule se prépare à l'invasion par le cordon d'infection. De plus, suite à la fixation des facteurs Nod au niveau de récepteurs cellulaires encore non identifiés, les cellules du cortex interne et du méristème entrent dans un cycle de division cellulaire pour donner naissance au nodule primordium (Gage and Margolin, 2000). Bien que ces facteurs soient des produits d'origine bactérienne, ils partagent de nombreuses caractéristiques avec des hormones de plantes intervenant dans l'équilibre auxine-cytokine. Il est donc probable que la prolifération cellulaire soit due à un effet de mime du facteur nod par rapport aux hormones végétales (Perret *et al.*, 2000b). Ce n'est que lorsque le cordon d'infection entre en contact avec les cellules de ce nodule que se

met en place la libération de *Rhizobium* (Patriarca *et al.*, 2002). Selon certains auteurs, les bactéries seraient libérées dans les cellules cibles par un mécanisme « pinching-off » signifiant littéralement : pincer pour former un bourgeon (Oke and Long, 1999). Les bactéries libérées dans le cytosol de la cellule prennent alors le nom de bactéroïdes et sont entourées par une membrane, dérivée de la membrane plasmique de l'hôte donnant naissance à un compartiment endocytotique (figure 1.10) (Verma and Hong, 1996).

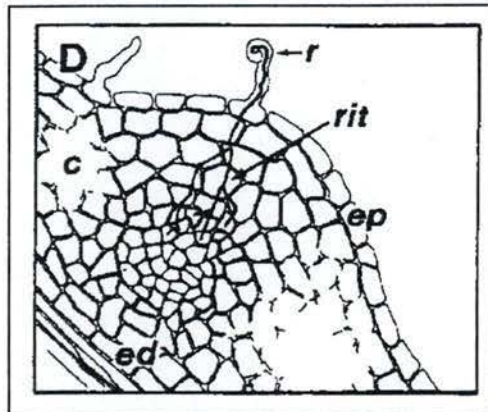


Figure 1.9 : Le cordon d'infection commence à se ramifier (rit) lorsqu'il entre en contact avec les cellules en division du nodule primordial. Autres abbréviations (ed)=endoderme, (ep)=épiderme, (c)=cortex, (r)=poil racinaire (Perret, 2000).

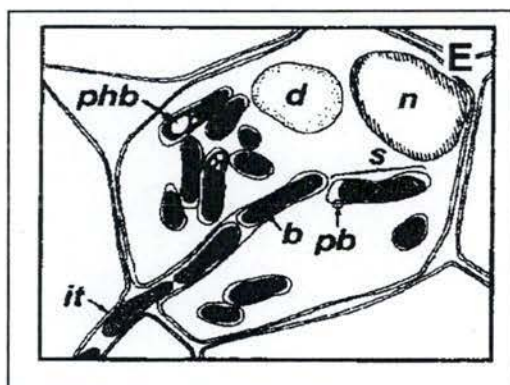


Figure 1.10 : Mécanisme d'endocytose de la bactérie initié lors du contact cordon d'infection (it) avec les cellules corticales. Les bactéroïdes (b) sont rapidement entourés par la membrane péricellulaire (pb) formant les futurs symbiosomes (s). Autres abbréviations (phb)=granules de poly-β-hydroxybutyrate, (d)= vacuole digestive, (n)=noyau (Perret, 2000).

Dans le but d'assurer sa survie et sa dissémination, *Brucella* doit atteindre sa cellule cible. Pour cela, la bactérie interagit avec différents types cellulaires. Parmi ceux-ci on retrouve les cellules du système immunitaire. *Brucella* tire profit des cellules phagocytaires en se répliquant au sein des vacuoles du phagocyte professionnel. Cela lui confère plusieurs avantages, puisque dès qu'elle a pénétré le macrophage la bactérie ne doit plus faire face au système du complément et aux anticorps. D'autre part, les cellules phagocytaires sont mobiles et servent donc au transport et à la dissémination de la bactérie au sein de son hôte. Elle est en outre capable de se réfugier aussi bien en cellules phagocytaires et non phagocytaires (Detilleux *et al.*, 1990) (Pizarro-Cerdà *et al.*, 1999).

L'étape préliminaire à la pénétration de la bactérie au sein de la cellule consiste en l'adhérence du pathogène à la surface cellulaire. Une implication probable du lipopolysaccharide bactérien (LPS) dans ce processus a été supposée, puisque des bactéries dites rugueuses (c'est à dire non porteuse de la chaîne O polysaccharidique) sont plus adhérentes et entrent en plus grand nombre dans les cellules non phagocytaires en comparaison avec des bactéries lisses (porteuses de cette chaîne O polysaccharidique) (Detilleux *et al.*, 1990). L'internalisation au sens propre de *Brucella* dans les phagocytes et les cellules non-phagocytaires se réalise par un mécanisme proche du système « fermeture-éclair » défini pour *Listeria monocytogenes* (Pizarro-Cerdà *et al.*, 1999). Les acteurs cellulaires et bactériens permettant l'internalisation de *Brucella* restent encore à préciser mais quelques données nous laissent penser qu'ils sont dépendants de la cellule cible. En effet, des expériences utilisant des inhibiteurs de l'actine (cytochalasine) ont mis en évidence le rôle du cytosquelette dans l'ingestion de la bactérie par les phagocytes (Liautard *et al.*, 1996). En cellules non phagocytaires, on a montré qu'il se produit un faible recrutement de l'actine au site d'entrée de la bactérie. L'utilisation de plusieurs inhibiteurs de GTPases a comme conséquence de réduire l'internalisation de la bactérie. On a pu visualiser qu'une GTPase (Cdc42) est activée suite au contact avec *Brucella* (Guzmán-Verri *et al.*, 2001). Outre les effecteurs cellulaires intervenant pendant l'internalisation, on a découvert chez *Brucella* un système à deux composants *BvrRS* important pour l'invasion des cellules phagocytaires et non phagocytaires. Des mutants de ce système présentent une capacité d'invasion limitée (Sola-Landa *et al.*, 1998). Finalement, l'analyse du génome a révélé la présence de gènes codant pour des adhésines ainsi qu'une invasine susceptible de médier l'entrée en cellules par liaison aux intégrines (DeIVecchio *et al.*, 2002).

### e) échappement à la réponse cellulaire

Après avoir envahi la cellule cible, les bactéries doivent encore faire face aux mécanismes bactéricides développés par celle-ci (production de peptides cationiques, explosion respiratoire). Chez *Rhizobium*, il a été proposé que la membrane péribactéroïdienne sert de barrière physique pour éviter un contact direct entre la bactérie et la cellule, évitant ainsi de stimuler les « défenses immunitaires » de la cellule végétale (Verma and Hong, 1996). *Brucella*, quant à elle, a élaboré de multiples stratégies pour réduire les effets bactéricides du phagocyte (augmentation de l'expression de protéines de résistance au stress acide, stress oxydatif,... (Lin *et al.*, 1992; Lin and Ficht, 1995; Rafie-Kolpin *et al.*, 1996) (Wang *et al.*, 2001)) Cependant le mécanisme central à la survie de la bactérie à l'intérieur des cellules consiste en l'inhibition de la fusion entre le phagosome et le lysosome.

### 2.2.2 Trafic intracellulaire des bactéries.

Le trafic intracellulaire de *Rhizobium* est encore mal compris. Une des seules données que nous pouvons avancer concerne le lieu où se loge *Rhizobium*. Dans les nodules, les bactéroïdes sont enfermés dans un compartiment délimité par la membrane péribactéroïdienne dérivée de la membrane plasmique de l'hôte (Verma and Hong, 1996). Cette membrane péribactéroïdienne montre une structure complexe. En effet, elle partage des caractéristiques avec la membrane plasmique et avec les vacuoles. Grâce à cette membrane péribactéroïdienne, le végétal et la bactérie peuvent échanger des signaux et des nutriments. Pour assurer cette fonction, cette membrane doit subir quelques modifications. Des nouvelles protéines, des lipides,... lui sont donc incorporés. L'apport de ces nouveaux constituants se fait par des vésicules dérivée du Golgi (Verma and Hong, 1996). Vu les interactions entre le Golgi et le réticulum endoplasmique (RE) on sous entend que le compartiment endosymbiotique partage des caractères fonctionnels avec le RE. Sur base de cette donnée nous pouvons déjà préciser que les compartiments finaux dans lesquels *Brucella* et *Rhizobium* se localisent ont des caractéristiques du RE.

Pour mieux cerner les moyens mis en œuvre par *Brucella* pour moduler le trafic intracellulaire et assurer sa survie en cellules, un bref descriptif de trajet suivi par une particule dans une cellule phagocytaire sera donné.

a) trafic intracellulaire d'un agent non pathogène:  
(figure 1.11).

La capture des macromolécules par une cellule eucaryote se fait de 2 manières très différentes qui sont la phagocytose et l'endocytose.

L'endocytose permet l'internalisation de macromolécules en suspension dans un liquide grâce la formation de vésicules de taille réduite par rapport à la phagocytose.

La phagocytose quant à elle correspond à la prise en charge de matières particulaires et de grandes tailles (Desjardins, 1995) qui seront dirigées par la suite vers la voie lysosomale.

Les particules sont englobées par la cellule à l'aide de pseudopodes. Ces replis membranaires donneront après détachement de la membrane plasmique, une vacuole de phagocytose ou phagosome dans lequel se trouve la particule ingérée. Par après, le phagosome contenant la particule subit un processus de maturation dit « kiss & run ». L'hypothèse propose que le phagosome entre en contact de façon transitoire avec des compartiments endosomaux et par ce processus dynamique mature en un phagolysosome. Dans les premiers instants suivants la phagocytose, le phagosome interagit avec l'endosome précoce et porte de ce fait les marqueurs de ce dernier tels que Rab5. Plus tard, le phagosome recycle ses marqueurs précoces et acquiert les marqueurs de l'endosome tardif comme Rab7, LAMP,...suite à l'interaction avec ce compartiment. Au final, le phagosome fusionne avec le lysosome créant ainsi un nouveau compartiment nommé phagolysosome (Clemens, 1996) (Desjardins, 1995). Dès que ce phagolysosome est formé, la particule ingérée peut être dégradée notamment par l'action des hydrolases et suite à l'acidification du compartiment,...

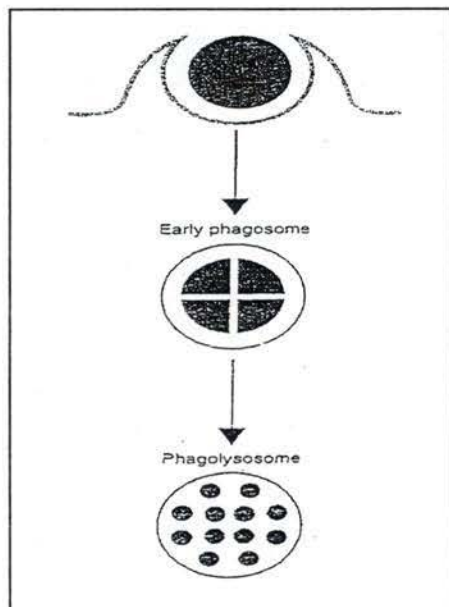


Fig 1.11 : Schéma simplifié de la phagocytose, où le phagosome interagit avec les compartiments endosomiaux conduisant à la maturation en phagolysosome où se déroule la dégradation de la particule (Merresse, 1999).

## b) trafic intracellulaire de *Brucella* dans les cellules non phagocytaires.

Le trafic de *Brucella* fait encore l'objet à l'heure actuelle de nombreuses recherches. Nombre d'indications concernant le trajet de la bactérie ont été obtenues grâce à des expériences de marquage de la bactérie et des organites intracellulaires. Ceci en vue de déterminer avec quels composants cellulaires la bactérie entre en contact.

Nous n'aborderons au cours de ce travail que le trafic intracellulaire de la bactérie en cellules non phagocytaires celui-ci étant le mieux documenté.

Le cycle infectieux de la bactérie peut être divisé en deux temps, durant les 10 premières heures suivant l'infection la bactérie se localise dans les cellules mais ne s'y réplique pas, ce n'est que par après que se produit une phase de croissance exponentielle où une réplication massive est amorcée. La majorité des travaux se sont focalisés sur la première partie de ce cycle.

Lors des premiers instants après l'internalisation (c'est à dire moins de 15 minutes après l'inoculation) *Brucella* se situe dans des phagosomes porteurs des marqueurs de l'endosome précoce (EEA1 et la transferrine)(Pizarro-Cerdà *et al.*, 1999). 30 minutes après infection, *Brucella* va se loger dans un compartiment dépourvu des marqueurs endosomaux tardifs (mannose 6 phosphate receptor et rab7) confirmant que la bactérie module le processus de maturation normal du phagosome (Pizarro-Cerda *et al.*, 1998).

A la deuxième heure suivant l'infection, une caractérisation du compartiment dans lequel se loge la bactérie montre que ce dernier accumule le marqueur LAMP. Pour confirmer l'absence d'interaction entre le phagosome contenant la bactérie et le lysosome, une étude de la distribution du marqueur lysosomal, cathepsine D a été réalisée. Il a été prouvé que seulement 10% des phagosomes dans lesquels on retrouve la bactérie sont positifs pour ce marqueur. L'ensemble des données nous permettent de conclure que la bactérie transite par la voie de l'endosome précoce mais détourne celle de l'endosome tardif et ce en utilisant un compartiment LAMP positif et cathepsine négatif. Cette vésicule ressemble à un autophagosome et est porteuse de marqueurs sec 61 $\beta$  (marqueur du RE) suggérant une origine réticulienne. Mais cet autophagosome ne constitue pas le compartiment final de *Brucella*, puisque 8 heures postinfection on assiste à l'exclusion des marqueurs LAMP supposant des modifications dans les propriétés de l'autophagosome ou un changement de compartiment (Pizarro-Cerda *et al.*, 1998). Dès que ce compartiment a subi les modifications conduisant à un compartiment LAMP négatif, la bactérie débute sa réplication. Une caractérisation plus précise de cette vésicule a permis de montrer que non seulement elle est dérivée du RE mais

qu'elle en partage certaines caractéristiques fonctionnelles. Pour démontrer cela, on procède à un traitement à la brefeldine A, composé activant une redistribution des constituants du Golgi vers le RE. Après traitement, les compartiments du Golgi sont redistribués vers le RE et sont associés aux compartiments où se trouve le pathogène. *Brucella* finit donc son voyage intracellulaire dans un compartiment semblable au RE en lieu et place du lysosome (figure 1.12) (Pizarro-Cerdà *et al.*, 1998; Pizarro-Cerdà *et al.*, 1999; Pizarro-Cerdà *et al.*, 1997).

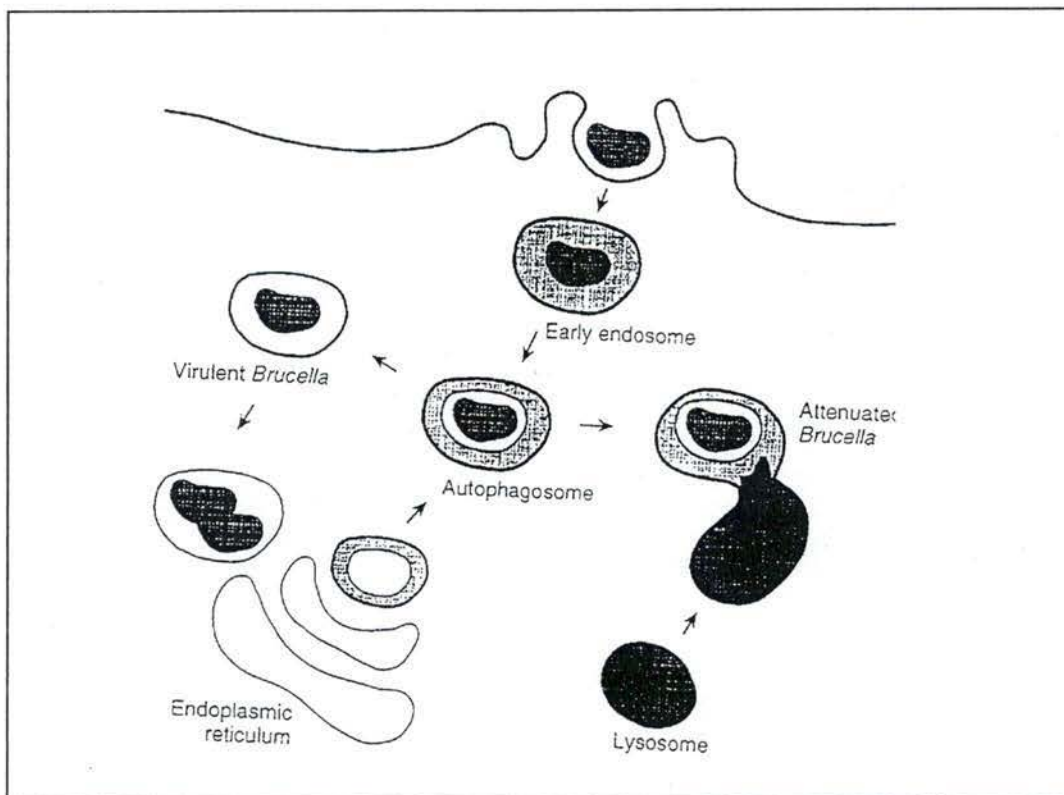


Figure 1.12 : Représentation du trafic intracellulaire de *Brucella* à l'intérieur de cellules non phagocytaires (Pizarro-Cerdà, 1999).

### 2.2.3 Multiplication et transmission des bactéries.

L'issue de la relation symbiotique chez *Rhizobium* se manifeste de façon moins perverse que la relation établie par *Brucella* avec son hôte. En fait, son aboutissement consiste en la création du nodule. Le nodule est une structure bien individualisée par rapport au végétal. Ce nodule se développe surtout au niveau de l'apex du système racinaire. Il est formé de cellules épidermiques constituant un organe vascularisé comprenant deux types de tissus qui sont : le tissu périphérique et le tissu central dans lequel on assiste au processus de différenciation des bactéries endocytées.

Pour aboutir à un nodule fonctionnel ( excroissance en surface racinaire réductrice d'azote), plusieurs modifications se déclenchent aussi bien dans les cellules du végétal que chez les bactéries. Avant d'aborder ces modifications, il est intéressant de préciser qu'il existe deux types de nodule différant entre eux par l'organisation des tissus (Patriarca *et al.*, 2002), en effet on retrouve :

- le nodule indéterminé (figure1.13) caractérisé par une forme allongée due à la persistance du méristème apical. De par cette forme on peut y détecter plusieurs sections correspondant aux différents stades de différenciation de la bactérie (détaillé plus loin).
- le nodule déterminé ou globose présentant une forme sphérique dans lequel on retrouve aussi les bactéries aux différents stades de différenciation mais à la différence du nodule indéterminé ces stades ne présentent pas d'organisation précise dans le nodule.

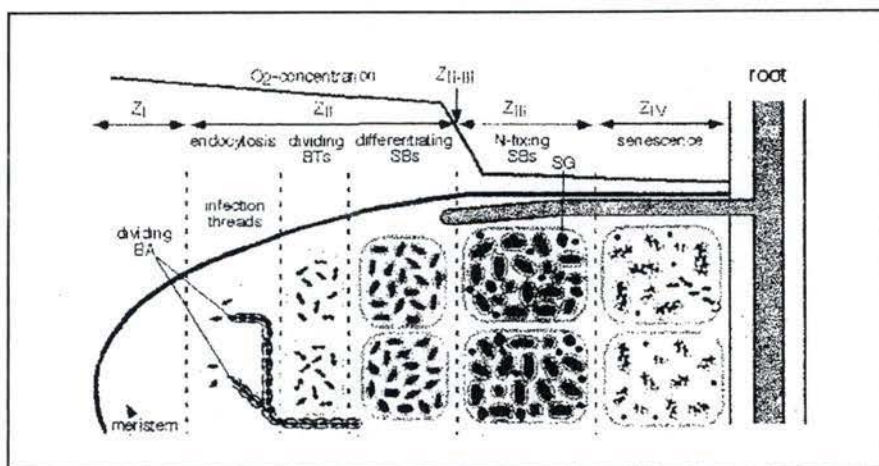


Figure1.13 :Représentation du nodule indéterminé avec les diverses zones de différenciation des bactéries (Patriarca, 2002).

Quelles modifications se produisent au cours de la nodulation ? Du point de vue de la plante, on assiste à des proliférations cellulaires suite à de nombreuses mitoses conduisant au nodule primordium.

De leurs côtés, les bactéries entrent dans un mécanisme de différenciation progressif (figure 1.13). Après leur libération du cordon d'infection elles prennent le nom de bactéroïdes. Dans le cytoplasme de l'hôte, les bactéroïdes se divisent plusieurs fois puis arrêtent leurs divisions. Simultanément, on observe des modifications morphologiques et physiologiques rendant le bactéroïde capable de réduire l'azote moléculaire. Un ensemble d'enzymes et de protéines dites accessoires (activées pour des concentrations faibles en oxygène) sont de ce fait produites comme par exemple les cytochromes et la nitrogénase (enzyme servant dans la fixation de l'azote) (Oke and Long, 1999).

Le second stade correspond aux symbiosomes qui sont des bactéroïdes entourés par une membrane d'origine végétale. Au sein du tissu central, les symbiosomes peuvent contenir plusieurs bactéroïdes, c'est à ce stade précis que se mettent en place les échanges entre la bactérie et le végétal. Après cette différenciation, les bactéroïdes entrent dans une zone de sénescence où la destruction se fait par la lyse du bactéroïde (Patriarca *et al.*, 2002). Il est admis que dans les nodules les plus vieux il existe une zone de sénescence où il y a une dégradation des cellules végétales et des bactéries. Pourtant malgré cette observation, le mécanisme de transmission de *Rhizobium* reste encore un sujet à débats. Certains avancent qu'il existe des populations bactériennes au sein du nodule ne passant pas par un processus de différenciation. Ces bactéries interviendraient dans la transmission suite à leurs libérations dans le sol. D'autres suggèrent que certains bactéroïdes localisés dans les zones mortes du nodule ont une capacité de dédifférenciation permettant de recommencer des nouvelles divisions chez un nouvel hôte (Oke and Long, 1999).

*Brucella* bien qu'étant décrite comme un parasite intracellulaire, est capable de survivre dans une vaste gamme d'environnements. Cette aptitude à coloniser divers milieux assure la pérennité de son cycle infectieux. La capacité de résistance aux variations du milieu de *Brucella* est étonnante. En effet, elle peut survivre de quelques jours à quelques mois hors de son hôte. Il a été décrit qu'elle peut vivre dans le sol, le lait, les pâtures et le fumier,... (tableau 1) avant d'entreprendre sa phase de vie parasitaire (Verger, 1993). Dès qu'elle a pénétré à l'intérieur de l'hôte, la bactérie se dirige vers les organes pour lesquels elle présente un tropisme important, soit les organes reproducteurs. Au sein de ces organes, elle prolifère principalement dans le RE des cellules trophoblastiques. La multiplication de la bactérie

aboutit à la mort des cellules trophoblastiques permettant à la bactérie de se disperser dans les tissus et les fluides placentaires. On assiste alors à un cycle sans fin où la bactérie recommence une nouvelle infection à l'intérieur de son hôte conduisant aux avortements chez les femelles gestantes (Anderson and Cheville, 1986). L'avortement ne constitue pas l'unique symptôme dont la bactérie est responsable, puisque en plus des troubles de la reproduction détectés chez les femelles et les mâles ( stérilité, épидидymite,...) on note aussi de nombreux problèmes articulaires (hygromas brucellique, sorte d'abcès au niveau de l'articulation). Les mécanismes de transmission de la bactérie sont variés: ingestion d'aliments contaminés, aérosols infectés, léchage du placenta et du nouveau né par la femelle ayant mis bas, mais l'avortement est considéré par les épidémiologistes comme le relais principal de multiplication de l'infection.

Milieu	Conditions	Viabilité
sol	sec	4 jours
	humide	2 mois
	froid	5-6 mois
eau	<4°C	4 mois
	37°C	<1 jour
foetus	à l'ombre	6 mois
urine	37°C (8°C)	16 heures (6 jours)
fumier	été	1 jour
	25°C	1 mois
	hiver (-3°C à 8°C)	2 mois à 1 an
laines	en entrepôt	4 mois
poussières de rue	/	plusieurs jours
barrières-sols en bois	/	4 mois
pâtures	ensoleillée	15 jours
	ombragée	35 jours
lait	72°C	5-15 secondes
	35-37°C	1 jour
	0°C	18 mois
fromages	selon le type	6 jours à 6 mois

Tableau1 : illustrant la capacité de *Brucella* de résistance aux différentes conditions environnementales (Verger, 1993).

### 2.3 Identification moléculaire des acteurs de la virulence et de la symbiose.

Au terme de ce paragraphe traitant des moyens établis par *Brucella* et *Rhizobium* pour interagir avec leurs hôtes pendant le processus infectieux, il paraît évident que ces bactéries n'usent pas des mêmes mécanismes. Si d'un point de vue macroscopique les processus d'infection sont différents, les mécanismes moléculaires sont conservés chez ces deux

bactéries. Nous ne présenterons ici que quelques exemples de gènes homologues ou de systèmes proches pouvant être utilisés aussi bien chez *Brucella* que chez *Rhizobium*.

### 2.3.1 Systèmes de sécrétion.

On estime que 20% des protéines synthétisées par les bactéries sont destinées à une localisation externe (Henderson *et al.*, 1999). L'architecture de l'enveloppe bactérienne des bactéries gram négatives impose à la bactérie de pouvoir développer divers systèmes pour sécréter au travers de ces différentes barrières (c'est à dire les membranes externe et interne, l'espace périplasmique et le peptidoglycan) les différentes protéines à destination externe. Par conséquent, les procaryotes ont mis en place une multitude de moyens pour transférer ces protéines, ce sont les systèmes de sécrétion de type I, II, III (figure 1.14). La classification se fait en outre sur base de leur dépendance par rapport à la voie de sécrétion générale (GSP) au cours de laquelle les protéines exportées doivent passer au travers de la membrane cytoplasmique (Henderson *et al.*, 1999).

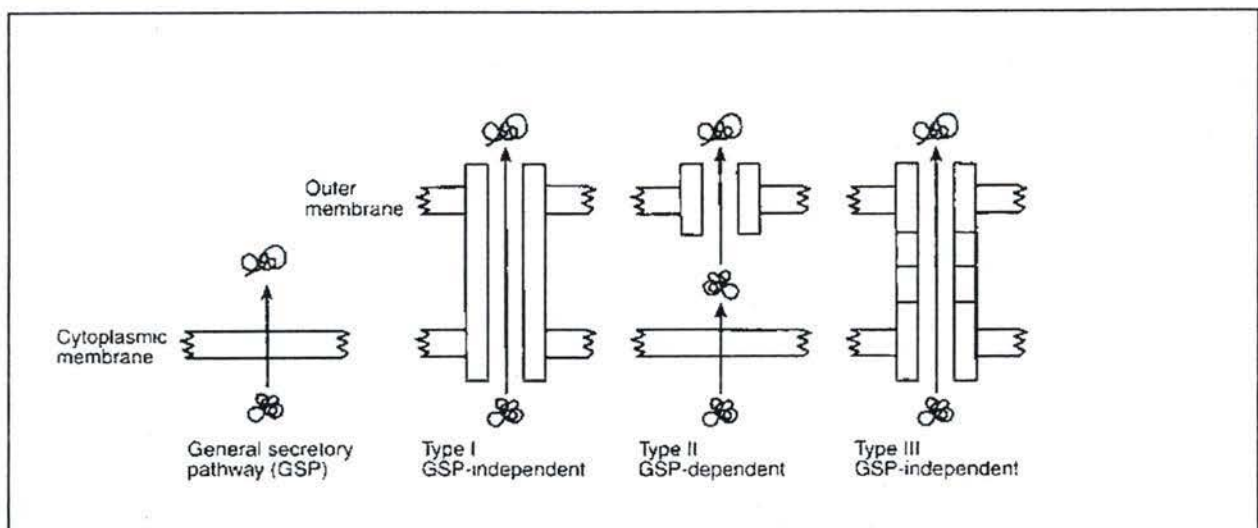


Figure 1.14 : Représentation comparative des systèmes de sécrétion (Henderson, 1999).

#### a) système de sécrétion de type III.

Un des systèmes de sécrétion le plus étudié est celui de type III, vu son implication fréquente dans le transport d'effecteurs protéiques depuis le cytosol bactérien directement dans le cytosol de la cellule cible (Galan and Collmer, 1999). Des homologies ont été observées entre les gènes codant pour le système de type III et ceux encodant pour la base du système flagellaire, laissant suggérer une origine évolutive commune. Le système de type III est souvent acquis par transfert horizontal étant donné sa localisation fréquente sur des plasmides et sur des îlots de pathogénicité (Hentschel *et al.*, 2000).

Un système de type III a été identifié sur un plasmide symbiotique de la souche NGR234 de *Rhizobium*. Le cluster de gènes codant pour ce système contient dix ORFs homologues aux gènes *hrc*<sup>2</sup>. Chez différentes bactéries, ces gènes interviennent dans la production de protéines requises dans la sécrétion de facteurs de virulence. Des techniques d'hybridation sur le génome ont révélé que toutes les espèces de *Rhizobium* ne possèdent pas ces gènes *hrc* (Marie *et al.*, 2001). Le système de type III sécrète des protéines (y4xl et NolX) suite à la perception des flavonoïdes. Ce système serait donc déterminant au cours de l'initiation de la nodulation plus précisément dans le développement du cordon d'infection (Perret *et al.*, 2000a).

Sur base de la séquence du génome, on peut dire que *Brucella* ne possède pas de système de sécrétion de type III au sens strict. Cependant bien qu'étant une bactérie non-mobile, l'analyse de son génome montre que tous les gènes nécessaires à la fabrication d'un flagelle sont présents, à l'exception des systèmes chemotactiques (D. Fretin, thèse en cours). On note de plus que les trois locus flagellaires de *Brucella* sont presque parfaitement synténiques avec ceux de *Mesorhizobium loti* et de *R. meliloti*.

De plus, il a été montré au laboratoire qu'un mutant du gène *fliF* est atténué en modèle murin et que ce gène est induit en macrophages (D.Fretin, thèse en cours et A.Dricot, mémoire). Les systèmes de sécrétion de type III et le système d'exportation de l'appareil flagellaire présentant des homologies structurales et moléculaires, l'ensemble de ces données suggèrent que chez *Brucella* l'appareil d'exportation flagellaire pourrait servir de système de sécrétion.

#### b) système de sécrétion de type IV.

---

<sup>2</sup> Les gènes *hrc* sont en fait des gènes *hrp* qui ont été renommés vu leur conservation importante (*hrp Conserved*). Les gènes *hrp* codent pour un système de sécrétion de type III chez les phytopathogènes. (Boucher, 2001).

Ce système est défini comme un mécanisme de transport de macromolécules. Il a fait l'objet de nombreuses études chez *A. tumefaciens* où il est encodé par l'opéron *vir B*. Cet opéron est constitué d'un arrangement colinéaire de onze gènes, encodant pour une structure semblable à un pilus nécessaire au transfert du plasmide Ti vers le cytoplasme de la cellule végétale (Sieira *et al.*, 2000). Chez *Rhizobium*, le pSymA est porteur d'un opéron homologue à l'opéron *virB* d'*A. tumefaciens*. On ne connaît pas encore la fonction du type IV chez *R. meliloti*, mais la capacité de nodulation et de fixation de l'azote ne sont pas affectées chez des mutants *virB* (Barnett *et al.*, 2001). *Brucella* possède également l'opéron *virB* (figure 1.15) (O'Callaghan *et al.*, 1999). Chez celle-ci le système de type IV intervient au cours du trafic intracellulaire puisque des mutants *vir B* persistent dans un compartiment ressemblant à l'autophagosome et sont incapables d'atteindre leur niche de répllication (Delrue *et al.*, 2001).

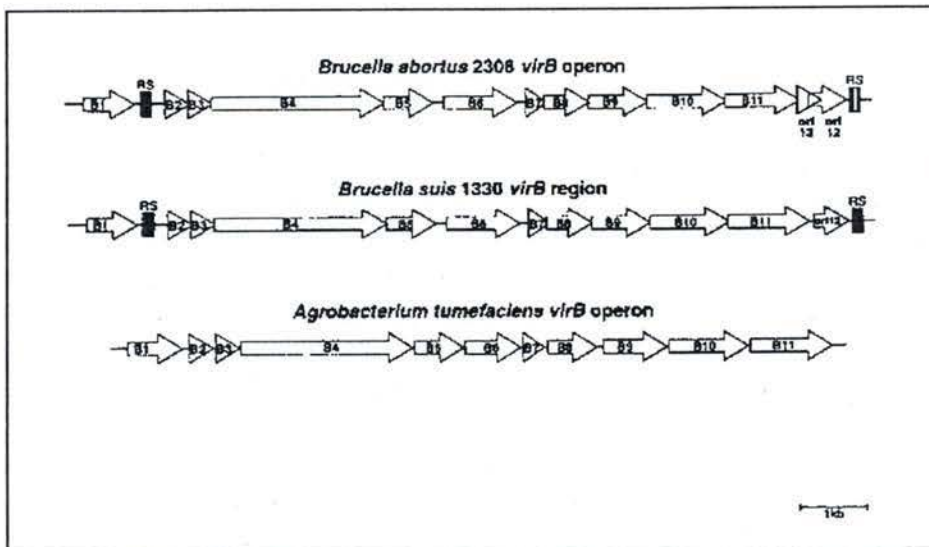


Figure 1.15 : Comparaison des opérons *Vir B* de *B. abortus* S2308, *B. suis* 1330 avec l'opéron d'*A. tumefaciens* (Sieira, 2000).

### 2.3.2 Autres facteurs communs à *Brucella* et *Rhizobium*.

#### Protéine bacA :

(LeVier *et al.*, 2000; LeVier and Walker, 2001)

Le gène *bac A* codant pour une protéine dont la fonction reste encore à préciser a été identifiée chez *R. meliloti*. Un homologue hautement conservé à ce gène a été retrouvé chez *B. abortus*.

La protéine partage des similitudes avec une protéine d'*E. coli* servant de transporteur de la bléomycine (Smb A). Elle possède sept domaines transmembranaires et pourrait donc jouer un rôle de transporteur. Des souches *bacA*<sup>-</sup> de *R. meliloti* sont capables de s'échapper du

cordon d'infection et d'envahir le nodule mais sont incapables d'établir une relation symbiotique. Il semble également que cette protéine affecte l'intégrité de la membrane. L'ensemble de ces données suggère que Bac A pourrait jouer un rôle dans le transport de composants de la cellule vers la bactérie.

Des expériences réalisées avec les mutants *bac A* de *Brucella* montrent que ceux-ci sont incapables de persister en souris plus de quinze jours. Il semble donc que la protéine Bac A soit un des éléments indispensables à l'établissement de l'infection chronique par la bactérie chez son hôte.

### Le bêta-1,2glucan.

Le cyclic  $\beta$ -1,2 glucan est un polysaccharide présentant un haut degré de polymérisation et est produit par de nombreuses  $\alpha$ -protéobactéries. Un des gènes codant pour une enzyme (cyclic glucan synthetase) impliquée dans la voie de synthèse du glucan a été particulièrement étudié chez les *Rhizobiaceae*. On parle des gènes *chv B* chez *Agrobacterium*, *ndv B* pour *Rhizobium* et des gènes *cgs* chez *Brucella*.

Des souches d'*Agrobacterium* incapables de synthétiser ce composé deviennent avirulentes, cette constatation est à mettre en relation avec le fait que des mutants *chv B* montrent une incapacité d'accumuler la protéine transmembranaire Vir B10 nécessaire dans l'assemblage des complexes du système de sécrétion de type IV d' *A. tumefaciens* (Banta *et al.*, 1998).

Chez *Rhizobium*, des mutants dans les gènes *ndv B* présentent des effets pléiotropiques. Les mutants *ndv B* sont affectés dans leur croissance sur milieu hypoosmotique (Spaink, 2000) et montrent des problèmes d'interaction avec leurs hôtes puisque les souches sont incapables de déclencher la nodulation.

Chez *Brucella*, les mutants de gènes *cgs* ont une plus grande sensibilité aux surfactants, suggérant des altérations de la surface cellulaire (Inon de Iannino *et al.*, 1998). D'autre part, des études ont mis à jour le rôle de cette enzyme dans la virulence de *B. abortus*, puisque les mutants *cgs* montrent une atténuation en souris et ont un retard de répllication en cellules Hela (Briones *et al.*, 2001).

Des expériences de complémentation ont permis de prouver que ces gènes liés à la synthèse de la cyclic glucan synthetase sont hautement conservés entre ces trois bactéries. Les gènes *cgs* restaurent le phénotype sauvage des souches d' *Agrobacterium* et de *Rhizobium* mutées dans les gènes *chvB* et *ndvB* (Inon de Iannino *et al.*, 1998).

La fonction précise du  $\beta$ -1,2glucan n'est pas encore définie mais quelques données tendent à penser qu'elle intervient dans l'atténuation des défenses de l'hôte (Briones *et al.*, 2001; Spaink, 2000).

### **3. Rhizopine.**

Récemment, au laboratoire, l'implication des gènes *mosA* et *mocC* dans la virulence de *Brucella* a été démontrée (A.Dricot, thèse en cours). Ces deux gènes sont présents chez *Rhizobium*, chez qui ils interviennent respectivement dans la synthèse et le catabolisme d'un composé sucré, la rhizopine. Ce phénomène est décrit dans les lignes suivantes. Par contre, la compréhension du rôle de ces gènes dans la virulence de *Brucella* étant l'objet de ce travail, celui-ci sera abordé dans les parties résultats et discussion.

#### **3.1 Généralités.**

L'origine du concept de la rhizopine est liée à la découverte des opines chez *A. tumefaciens*. Cette bactérie phytopathogène provoque le développement de tumeurs chez les végétaux communément connues sous le nom de galle du collet (Prescott, 1995). Cet état tumoral est induit suite au transfert du plasmide Ti (tumor inducing) dans la cellule végétale. L'organisation des gènes portés par ce plasmide est particulièrement bien décrite. Le plasmide est pourvu d'une région dite ADN T constituant la région du plasmide s'intégrant au génome de la cellule eucaryote. Cette région T comprend les gènes requis pour la tumorigenèse ainsi que les gènes impliqués dans le métabolisme des opines (Lewin, 1994). Au cours de l'interaction plante bactérie, on assiste au transfert du plasmide Ti dans le noyau de la cellule. Les gènes de synthèse des opines sont alors exprimés, permettant la production de ces composés à partir de métabolites déjà présents dans la plante. On détecte plusieurs types d'opines dont les principales sont l'agrocinopine, la nopaline et l'octopine différant entre elles par leurs structures (figure 1.16) (Dessaux *et al.*, 1992). Les opines pourront être dégradées et utilisées par la bactérie (possédant le plasmide Ti) comme source de carbone ou d'azote (Beauchamp *et al.*, 1991) suite à l'expression des gènes de catabolisme présents sur le plasmide Ti hors de la région T (Lewin, 1994).

Le plasmide Ti apparaît donc comme un élément génétique intéressant pour une bactérie. En effet, il permet la création d'une niche unique qui est la tumeur et la production de substrats

inhabituels, les opines. Pourtant, au sein de la population d'*A. tumefaciens* toutes les souches ne sont pas porteuses de ce plasmide. Mais, *A. tumefaciens* possède la capacité d'acquérir ces plasmides par un transfert interbactérien suite à l'expression des gènes *tra*. Une autre fonction attribuée aux opines consiste en la régulation de ce transfert (Oger and Farrand, 2002). Les opines agissent comme un premier signal activateur se liant à une protéine (comme par exemple *occR* dans le cas de plasmides à octopine) régulant de cette manière la transcription du régulateur des gènes *tra* : *traR*. D'autre part, l'activation de *traR* n'est possible qu'en présence d'un signal de quorum sensing (homoserine lactone) produit à partir d'une certaine densité bactérienne. En somme, on peut dire que les opines sont indispensables à l'échange du plasmide Ti. Cette idée est soutenue par le fait que l'addition d'opines dans le milieu de culture des bactéries déclenche une augmentation de la fréquence de transfert du plasmide (Dessaux *et al.*, 1992).

Par la suite, les scientifiques se sont focalisés sur d'autres composés susceptibles d'être synthétisés au cours l'interaction plante-bactérie. Les études se sont portées sur *Agrobacterium* puis *Rhizobium* pour plusieurs raisons ; tout d'abord parce que ces bactéries sont liées phylogénétiquement et ensuite parce que les interactions qu'elles développent avec les végétaux nécessitent des plasmides et redirigent la morphogenèse des végétaux (Murphy and Saint, 1992).

Ces études ont permis de découvrir chez *R.meliloti* un composé « opine-like » spécifique aux nodules, la rhizopine. Parmi les *Rhizobiaceae* toutes ne possèdent pas la capacité de métaboliser ce composé puisque seulement 11% des biovars de *R.meliloti* et 12% de *R.leguminosarum* peuvent synthétiser et cataboliser ce composé (Wexler *et al.*, 1995).

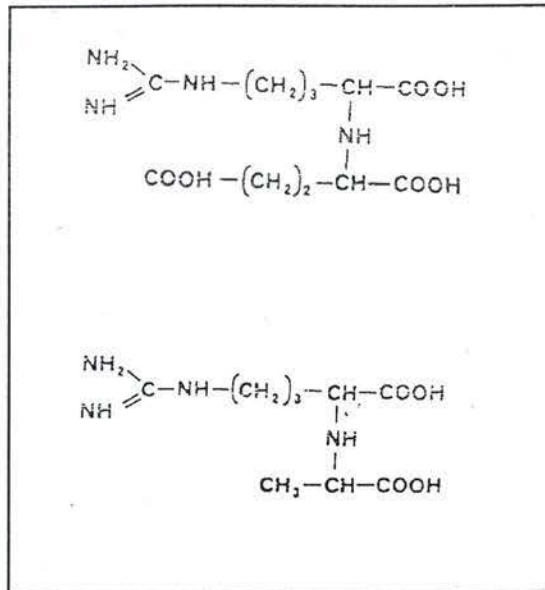


Figure 1.16 : Structure de la nopaline (haut) et de l'octopine (bas) (Dessaux, 1992).

### 3.2 Structure et fonction de la rhizopine.

Au point de vue de sa caractérisation, la rhizopine est décrite comme un sucre simple dérivé de l'inositol. Il existe 2 types de rhizopine connues à ce jour la L-3-O-méthyl-*scyllo*-inosamine (3-O-MSI) et la *scyllo*-inosamine (SI), ne différant entre elles que par la présence d'un groupe méthyl sur le carbone 3 du 3-O-MSI ( figure 1.17) (Heinrich *et al.*, 2001).

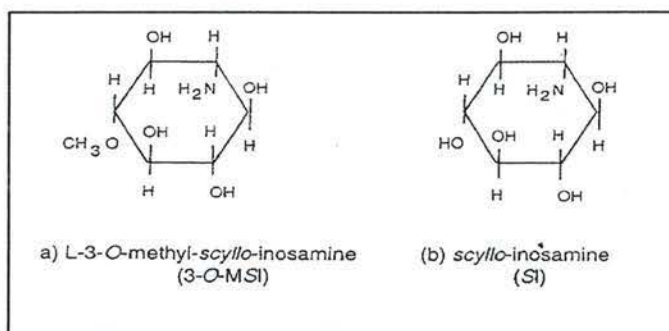


Figure 1.17 : Représentation des molécules de rhizopine synthétisées par l'espèce *R. meliloti* (Heinrich, 2001).

Il semble difficile d'attribuer une fonction précise à cette molécule. Quelques données expérimentales suggèrent qu'elle joue un rôle semblable aux opines, à la différence dans ce cas que la rhizopine est synthétisée par la bactérie. Sa production se fait par des bactéries

libres du sol mais c'est surtout à l'intérieur des nodules qu'elle est produite par les bactéroïdes exprimant les gènes *mos*. A l'opposé, sa dégradation prend place hors du nodule chez les bactéries libres suite à l'expression des gènes de catabolisme *moc* (figure 1.18).

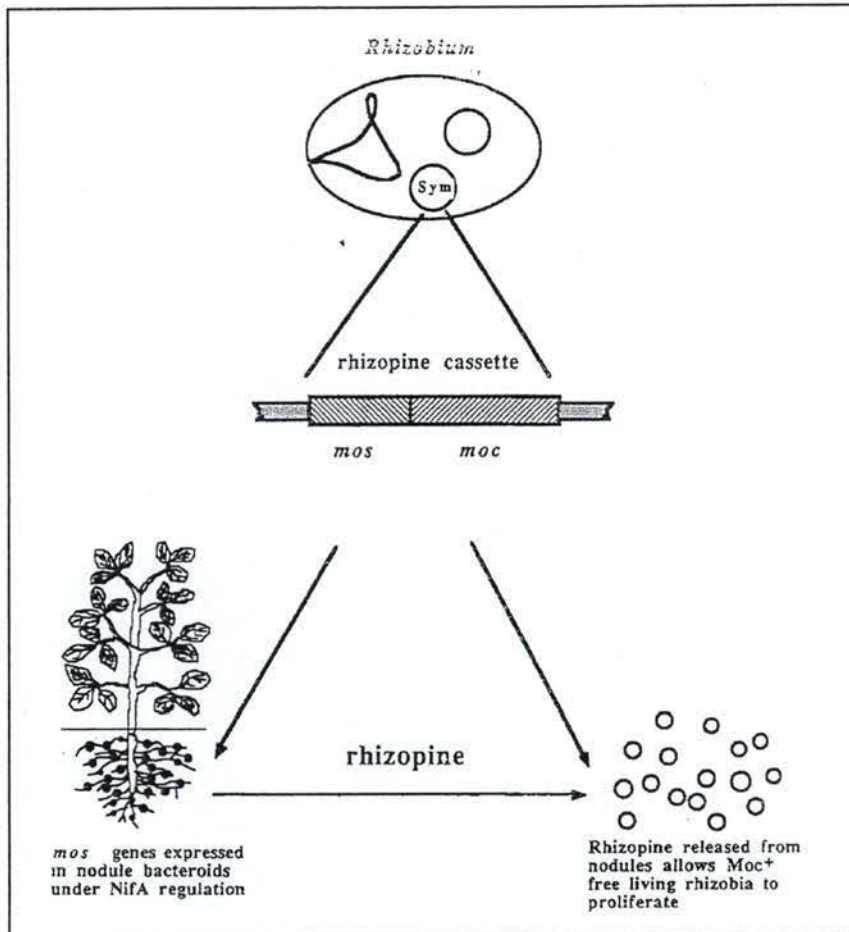


Figure 1.18 : Concept de la rhizopine. Cette figure résume la relation entre les bactéries libres et les bactéroïdes à propos de leur utilisation de la rhizopine (Murphy, 1992).

L'étude de la régulation du métabolisme de la rhizopine a permis d'énoncer quelques pistes au sujet de sa fonction. Plusieurs travaux ont confirmé que la capacité des bactéries à utiliser la rhizopine comme substrat leur confère un avantage compétitif (ce point sera détaillé plus loin). Certaines études ont également mis en évidence chez *R. leguminosarum*, que la rhizopine est synthétisée quelques jours après la mise en présence de la bactérie avec le végétal. Cette production est initiée alors que le nodule n'est pas encore formé. Puisque la synthèse de la rhizopine est antérieure à la nodulation, cela nous porte à croire que la rhizopine pourrait jouer un rôle de signal entre la bactérie et son hôte lors de l'interaction de ces deux partenaires. De bas niveaux de rhizopine seraient responsables des effets précoces de la nodulation. Par la suite, lorsque le nodule s'est développé la concentration en rhizopine augmente de façon progressive grâce à l'induction micro-aérobique des gènes *mos* chez les bactéries contenues dans les cordons d'infection, nodule,...(Heinrich *et al.*, 2001).

### 3.3 Synthèse de la rhizopine.

Les gènes impliqués dans la synthèse de la rhizopine, connus sous le terme du locus *mos* ont été localisés sur le plasmide symbiotique pSymA (Murphy, 1986). Il s'agit d'un opéron composé de 4 ORFs ( *ORF1/ mosA/ mosB/ mosC* ) d'une taille approximative de 5Kb

#### 3.3.1 Organisation des gènes *mos*.

(figure 1.19 )

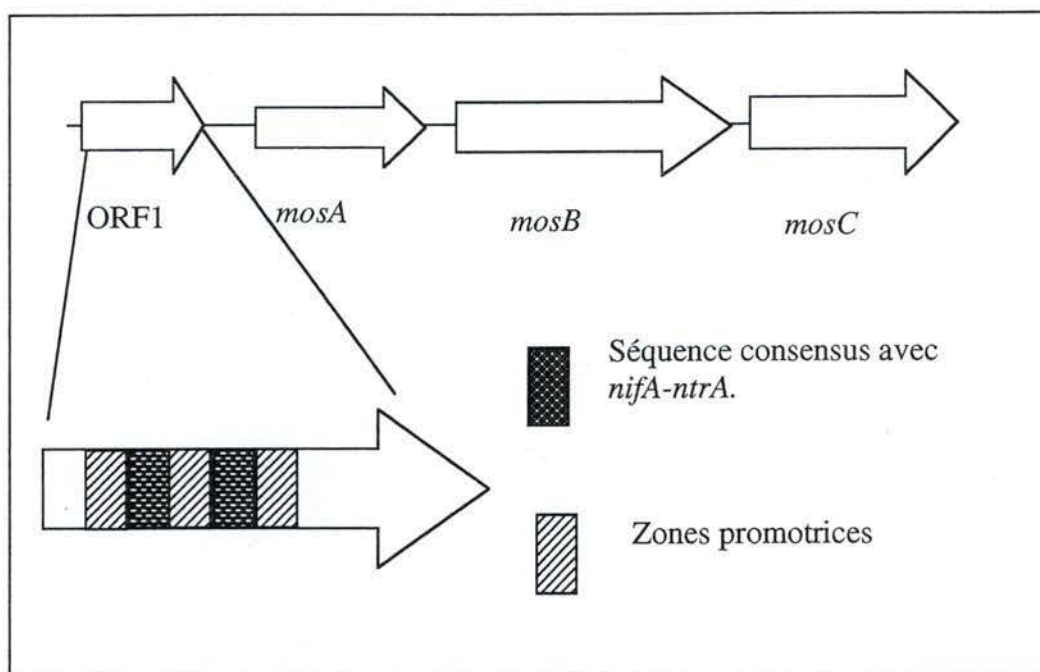


Figure 1.19 : Représentation du locus *mos* de *R. meliloti* L5-30 (Murphy, 1992).

L'*ORF1* est d'une longueur de 306pb et encode une protéine d'une taille de 11KDa de fonction inconnue (Murphy *et al.*, 1988).

*mosA* est séparé par une région intergénique de 187pb de l'*ORF1*. En amont de *mosA* on retrouve une séquence de Shine-Dalgarno permettant de réinitier la traduction des protéines encodées par l'*ORF1*, *mosA*, *B* et *C* (Murphy and Saint, 1992).

Sur base de la séquence en acides aminés de MosA celle-ci montre de fortes homologies avec des protéines ( par exemple Dap A d' *E. Coli* ) connues pour utiliser le pyruvate comme substrat. Etant donné que l'inositol est un dérivé du pyruvate, il a été proposé que MosA soit impliquée dans la condensation du pyruvate en inositol (Murphy *et al.*, 1993).

D'autre part, vu l'absence de gène *mos A* dans le locus *mos* de *R. meliloti* RM220-3, connu pour synthétiser la SI (la forme non méthylée de la rhizopine), il a été proposé que le gène *mos A* (présent chez la souche L5-30) code pour une méthylase capable de greffer un groupe méthyl sur la SI afin de former le 3-O-MSI (Saint *et al.*, 1993).

MosB est une protéine hybride de fonction inconnue et dont les domaines présentent des homologies à des protéines de fonctions très diverses.

Le domaine N-terminal montre des homologies avec les protéines de fonctions inconnues (*fix U* de *R. leguminosarum* et *NifT* de *Klebsiella pneumoniae* ).

Le domaine central possède quant à lui de nombreux homologues dont les fonctions sont soit liées au métabolisme des carbohydrates, soit à la synthèse de la paroi ou d'antibiotiques (Murphy *et al.*, 1993).

La protéine Mos C est définie comme une protéine hydrophobe comprenant douze régions transmembranaires. Cette structure fait penser aux protéines de transport de sucres, dès lors il est probable que cette protéine ait une fonction dans le transfert de la rhizopine hors du bactéroïde ou dans le transport de précurseurs de la rhizopine de la plante en direction du bactéroïde (figure 1.20) (Murphy *et al.*, 1993).

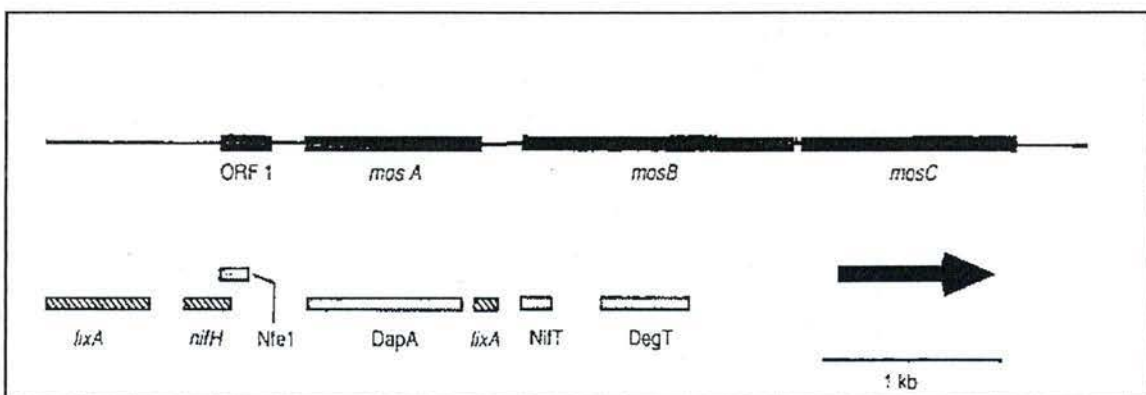


Fig1.20 : Représentation schématique de la structure en mosaïque du locus *mos* . Les homologies éventuelles avec d'autres protéines sont mises en évidence (Murphy, 1993).

### 3.3.2 Régulation des gènes *mos*

Puisque les gènes sont portés par le plasmide symbiotique, leur expression pourrait être contrôlée par un même circuit de régulation que les gènes de symbiose.

La régulation des gènes de fixation de l'azote chez *R.meliloti* (*nif* et *fix*) est réalisée par deux protéines qui sont NifA( régulateur transcriptionnel des gènes *nif* encodant pour la nitrogénase) et NtrA (facteur sigma). Le séquençage de la région 5' des opérons *nif HDK* et *fix ABCX* révèle une région de 160pb hautement conservée, considérée comme le promoteur symbiotique. La séquence consensus de ce promoteur a été identifiée en amont du locus *mos*, suggérant que les gènes de synthèse de la rhizopine sont sous le contrôle des facteurs NifA et NtrA (Murphy *et al.*, 1988).

D'autres expériences tendent à confirmer cette observation, un plasmide porteur des gènes *mos* a été transféré dans une souche mutée dans le gène codant NifA. L'analyse des nodules induits par la souche mutante montre que ceux-ci ne contiennent pas de 3-0-MSI, ce qui permet de conclure que les gènes *mos* sont régulés de façon symbiotique (Murphy *et al.*, 1988).

## 3.4 Catabolisme de la rhizopine.

La rhizopine peut être utilisée comme source de carbone et/ou d'azote par la bactérie capable de la dégrader. Cette dégradation suite à l'expression des gènes de catabolisme *moc* permet à la bactérie d'exploiter un substrat inhabituel mais surtout augmente la compétitivité des souches en terme de colonisation de l'hôte. Cet avantage compétitif est par conséquent lié à la capacité de catabolisme et non à celle de synthèse de la rhizopine (Gordon *et al.*, 1996).

Les gènes *moc* sont étroitement liés au locus *mos* sur le plasmide symbiotique pSymA. Ceci suggère qu'ils auraient coévolué comme une seule unité fonctionnelle et qu'ils pourraient être importants pour la symbiose (Saint *et al.*, 1993).

### 3.4.1 Organisation des gènes *moc*.

L'analyse du locus *moc* chez *R. meliloti* révèle la présence de six ORFs pour ce locus dont quatre sont essentielles pour le catabolisme de la rhizopine, ce sont *mocABR* et *mocC*.

Le rôle des protéines encodées par ces ORFs a été déterminé sur base de comparaisons de séquence présentes dans des banques de données.

- MocB est homologue à une protéine de liaison périplasmique qui servirait dans le transport de la rhizopine.

- MocR est un régulateur possédant un domaine de liaison à l'ADN ayant une homologie avec des protéines de répression.

- *mocA* et *mocC* sont des gènes encodant pour des enzymes impliquées dans la dégradation de la rhizopine et partagent de nombreuses similitudes avec des protéines encodées par des gènes *iol* présents dans l'opéron catabolique du myo-inositol de *B.subtilis* (Galbraith *et al.*, 1998).

Etant donné les similitudes concernant les structures moléculaires des dérivés de l'inositol (*myo*-inositol et rhizopine) ainsi que les homologies entre les gènes *moc* et *iol* (gènes de dégradation du *myo*-inositol). On se pose la question de savoir si il existe une connexion entre les voies de catabolisme du *myo*-inositol et celles du métabolisme de la rhizopine. Les résultats ont montré que chez *R. meliloti* le gène *idhA* codant pour la *myo*-inositol déshydrogénase, soit la première enzyme de la voie de dégradation de ce composé, est essentiel pour l'utilisation de la rhizopine. Des mutants des gènes *idhA* sont incapables de dégrader le *myo*-inositol comme source de carbone et sont également inaptes à cataboliser la rhizopine. L'ensemble de ces données nous laisse croire que les mécanismes intervenant dans les voies de dégradation du *myo*-inositol sont nécessaires à l'utilisation de la rhizopine comme substrat. Il est probable que le *myo*-inositol soit un composé intermédiaire dans la dégradation de la rhizopine (Galbraith *et al.*, 1998).

De plus, il est intéressant de noter que la protéine IdhA de *Sinorhizobium fredii* partage des similarités du point de vue de sa séquence avec les séquences codantes pour les protéines MocA et IdhA de *R. meliloti* et avec IolG encodée par l'opéron *iol* de *B. subtilis* (Jiang *et al.*, 2001).

### 3.4.2 Régulation des gènes *mos*

Les mécanismes par lesquels s'exercent la régulation des gènes *mos* sont encore mal compris, seules quelques informations sont à ce jour disponibles à propos d'un réseau éventuel de régulation de leur expression. On sait que ces gènes s'expriment uniquement dans les bactéries libres, c'est à dire celles qui ne sont pas impliquées dans le processus symbiotique. Par conséquent, une régulation semblable à celle décrite pour les gènes *mos* paraît peu probable. En effet, des mutations dans le gène *nifA* n'affectent pas l'expression des gènes *mos*, ce qui semble logique puisque les gènes *nifA* sont en relation avec la fixation de l'azote se produisant lors de la symbiose (Murphy and Saint, 1992).

En résumé, il existe dans la rhizosphère diverses bactéries possédant les gènes *mos / mos*, d'autres par contre ne disposent que des gènes *mos*. Quoiqu'il en soit, seules les bactéries dites « *mos* positives » ont un avantage dans la compétition en ce qui concerne les interactions avec leurs hôtes par rapport aux autres bactéries présentes dans la rhizosphère.

Au terme de ce chapitre, nous pouvons conclure que les processus d'infection développés par les deux bactéries considérées ne montrent que très peu de points communs et que les interactions avec leurs hôtes sont totalement différentes. Par contre, cette observation n'est plus valable lorsque l'on aborde d'un point de vue plus moléculaire ces processus. Etant donné les nombreuses similitudes concernant les bases moléculaires mises en jeu lors des interactions procaryotes / eucaryotes ainsi que les homologies importantes entre *Brucella* et *Rhizobium*, il semble intéressant pour l'étude de la virulence de *Brucella* d'exploiter ces similitudes avec *Rhizobium* dans l'espoir de mieux cerner les moyens grâce auxquels *Brucella* infecte et assure sa survie dans son hôte.

Au laboratoire, plusieurs mécanismes impliqués dans la virulence de ce pathogène sont particulièrement étudiés. L'aspect auquel nous nous intéressons tend à comparer les mécanismes de virulence communs à *Brucella* et *Rhizobium*. Dans notre cas, nous nous attardons à la question de savoir quel est l'intérêt pour *Brucella* d'avoir dans son génome des homologues aux gènes de métabolisme de la rhizopine. Est ce que tout comme chez *Rhizobium* la rhizopine sert de signal pendant l'interaction entre la bactérie et la cellule ? Ou bien est ce utilisé comme substrat par la bactérie ? Toutes ces questions offrent des nombreuses perspectives de recherches à propos de la virulence de *Brucella*.

## 2.Objectif du mémoire.

Depuis plusieurs années le séquençage des génomes bactériens a permis de mettre en évidence de nouveaux gènes en relation avec la virulence des bactéries pathogènes. Le thème principalement développé au sein du laboratoire est la compréhension des mécanismes moléculaires liés à la virulence de *Brucella*. Différents gènes impliqués dans les mécanismes de virulence de *B. melitensis* y sont par conséquent étudiés. Parmi ces gènes susceptibles d'être liés à la virulence de la bactérie, certains montrent de fortes similitudes avec des gènes intervenant dans le processus de symbiose de *Rhizobium*.

L'analyse du génome de *B. melitensis* a révélé la présence d'un groupe d'ORFs partageant un pourcentage élevé de similitude avec les gènes *mos* de *R. leguminosarum*. Chez *Rhizobium*, ces gènes interviennent dans les voies de dégradation d'un composé, la rhizopine. Il a été montré que la capacité de cataboliser la rhizopine confère un avantage compétitif à la bactérie possédant cette aptitude (Gordon *et al.*, 1996).

Des données expérimentales nous ont permis de découvrir qu'un gène homologue à *mos A* est indispensable à la virulence de *Brucella* (A.Dricot, mémoire 2000). Des recherches au niveau du génome n'ont pas permis de révéler d'opéron *mos* comme c'est le cas chez *Rhizobium*, mais par contre un homologue du gène *mosC* a été mis en évidence. A l'opposé des gènes *mos*, les gènes *mos* sont quant à eux impliqués dans la synthèse de la rhizopine chez *Rhizobium*. Nous nous sommes donc interrogé sur les fonctions potentielles des gènes *mos/moc* décrits pour *B. melitensis*. Durant ce travail, nous nous sommes proposé d'étudier cinq gènes qui sont: *mosA*, *mosC*, *mosC*, *mos A* et *rpiR*. En d'autres termes, nous avons caractérisé deux gènes homologues aux gènes de synthèse de la rhizopine, deux gènes appartenant à l'opéron putatif *mos* de *B. melitensis* et un gène *rpiR* situé à proximité de l'opéron *mos* dont la fonction supposée est de coder pour un régulateur de cet opéron.

Concrètement, les objectifs fixés au sein de ce travail peuvent être résumés en deux points :

- la création des mutant des gènes *mos/moc* par disruption intégrative chez *B. melitensis*.

Puis l'analyse de ces mutants dans différentes conditions ( *in vitro* / *in vivo* ).

- la construction des systèmes rapporteurs en vue de l'analyse des variations dans l'expression des gènes considérés.

## 3. Résultats.

### Méthodologie du travail.

Deux approches différentes ont été mises en place pour étudier les gènes en relation avec le métabolisme de la rhizopine. La première approche consiste à créer des mutants de ces gènes en vue de définir une fonction précise à ces derniers, tandis que le second volet de l'étude (sur lequel nous nous sommes plus particulièrement concentré) consiste à employer des systèmes rapporteurs permettant de déterminer les conditions d'induction de ces gènes.

### 3.1. Caractérisation des gènes *mos* /*moc* chez *B. melitensis*.

#### 3.1.1 Organisation des gènes *mos* et *moc* chez *B. melitensis*.

##### 3.1.1.1 Les gènes *moc*.

En utilisant une méthode de « piège à promoteur » Eskra et al., 2001 ont montré qu'un gène *moc C* (mannityl opine catabolism) présent chez *B. abortus* est spécifiquement induit après 24h lors d'infection en macrophage. Ce gène partage 67% de similarité avec le gène *moc C* de *R. leguminosarum* chez qui il intervient dans le catabolisme de la rhizopine. L'analyse du génome de *Brucella melitensis* 16M, nous a permis de déterminer l'environnement de cette ORF. *mocC* est l'avant dernier gène d'un groupe de 5 phases ouvertes de lecture (figure 3.1) situé sur le chromosome II de *B. melitensis*. L'orientation identique de ces 5 gènes et le fait qu'ils soient chevauchants, nous laisse penser qu'il pourrait s'agir d'un opéron. On notera qu'un homologue du gène *mocA* est directement adjacent à cet « opéron » mais dans une orientation inverse. Le tableau 1 reprend la taille ainsi que la fonction (attribuée sur base d'homologie de séquence) de chaque ORF.

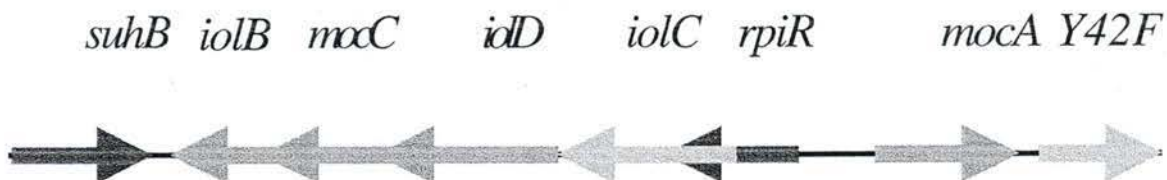


Figure 3.1 : Représentation schématique du locus *moc* chez *B. melitensis*.

ORF	Taille	Similarité	Fonction assignée
Y42F	1068	<i>y4ct</i> de <i>R. meliloti</i>	Inconnue
<i>mocA</i>	1005	<i>myo</i> -inositol déshydrogénase de <i>R.meliloti</i> .	Inositol déshydrogénase
<i>rpiR</i>	831		Répresseur de la famille <i>rpiR</i>
<i>iolC</i>	1905	<i>iol C</i> de <i>B. subtilis</i>	Fructokinase
<i>iolD</i>	1890	<i>iol D</i> de <i>B. subtilis</i>	Oxydoréductase
<i>iolE</i>	903	<i>mocC</i> de <i>R. meliloti</i>	Catabolisme de la rhizopine
<i>iolB</i>	810	<i>iolB</i> de <i>B. subtilis</i>	Inconnue
<i>suhB</i>	801		Myo-inositol-1-monophosphatase

Tableau 1: Tableau décrivant la fonction et la taille de chaque ORF présente au locus *moc* de *B. melitensis*.

Une comparaison avec le locus impliqué dans la dégradation de la rhizopine chez *R. leguminosarum* montre qu'il y a synténie entre *Brucella* et ce dernier (figure 3.2).

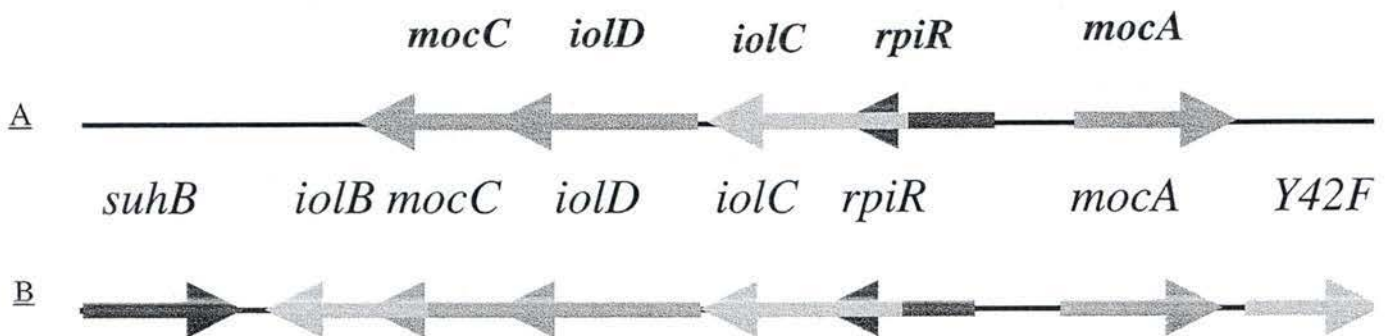


Figure 3.2 : Comparaison des loci *moc* de *R. leguminosarum* (A) et de *Brucella* (B).

### 3.1.1.2 Les gènes *mos*.

Au laboratoire, il a été montré qu'un mutant dans un gène homologue au gène *mosA* était atténué en souris et en macrophage (A. Dricot, mémoire 2000). Dès lors nous avons analysé l'environnement génomique de ce gène, afin de voir si d'autres gènes *mos* étaient présents dans son entourage. Chez *Brucella*, le gène *mosA* est localisé sur le chromosome I et partage 75% de similarité avec *mosA* de *R. meliloti*, aucune ORF n'a été détectée à proximité directe

de celui-ci (en-deça de 500 pb). Cependant par homologie nous avons pu déceler la présence d'un gène codant pour une protéine homologue à celle encodée par le gène *mosC* sur le chromosome I et présentant 32% d'identité et 47% de similarité avec le gène *mosC* chez *R. meliloti*.

### 3.1.2 Etude des mutants *mos/moc*.

Afin d'élucider les fonctions des gènes *mos* et *moc*, différents mutants ont été réalisés dans le cadre de ce travail, il s'agit des mutants : *mos C* et *moc C*. La technique employée pour l'obtention des mutants est l'intégration disruptive.

#### 3.1.2.1 Constructions des mutants.

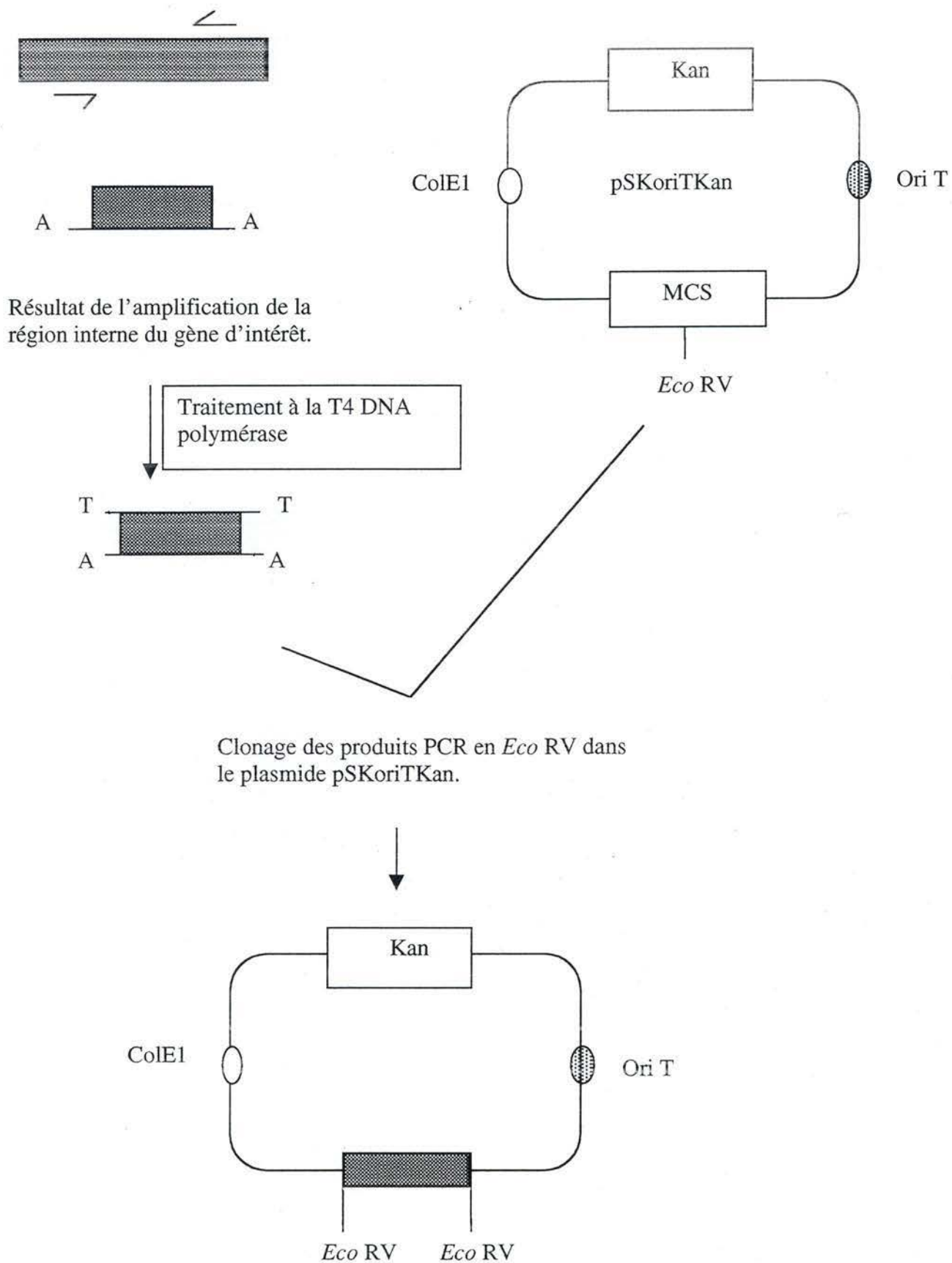
##### 3.1.2.1.1 Principe

L'intégration disruptive est une technique consistant à disrupter un gène d'intérêt grâce à l'intégration d'un plasmide, dans ce cas le pSKoriTKan qui est suicide chez *Brucella*. Les différentes étapes nécessaires à la construction des mutants sont rapidement énoncées dans les lignes suivantes. Premièrement, une amplification des régions internes (qui sont d'environ 237pb pour *mosC* et de 350pb pour *mocC*) du gène étudié a été réalisée par PCR. Les produits PCR ont ensuite été clonés dans le plasmide, pSKoriTKan. Ce plasmide présente plusieurs avantages : il est porteur du gène de résistance à la kanamycine (Kan) permettant la sélection des souches qui l'ont intégré. Il est mobilisable vu la présence d'une origine de transfert (*oriT*) et son origine de réplication (*ColE1*) le rend répliatif chez *E. coli* et suicide chez *Brucella*. Le plasmide recombinant a été introduit dans la souche *B. melitensis* Nal<sup>R</sup> par conjugaison. Les mutants de *Brucella* sont obtenus par un événement de recombinaison entre la région du gène amplifiée par PCR et la région homologue présente dans le génome de la bactérie. La sélection des clones recombinant se fait sur milieu Nal/Kan, ensuite les candidats mutants ont été validés par la technique du Southern blot.

##### a) Construction du plasmide recombinant.

Pour chacun des gènes d'intérêt, un couple d'amorces a été défini afin d'amplifier un fragment de 237pb de la région interne du gène *mosC* et de 350pb pour le gène *mocC*. Cette région interne a été amplifiée par la *Taq* Polymérase. Cette polymérase est connue pour ajouter des adénines en fin de polymérisation. Etant donné que le clonage se fait au site *EcoRV* du pSKoriTKan c'est à dire dans un site à bouts francs, un traitement à la T4DNA

polymérase a été effectué afin d'obtenir des bouts francs aux extrémités de l'amplicon (figure 3.3). Les produits de ligation ont ensuite été transformés dans la souche d'*E. coli* DH10B. Les souches transformées ont été étalées sur milieu X-gal/IPTG/Amp. Les plasmides recombinants (soit les colonies blanches) ont été repris en vue de réaliser des minipréparations d'ADN plasmidique. Un échantillon de ces minipréparations a été envoyé au séquençage. Les résultats de ce séquençage nous ont permis de confirmer que l'insert cloné dans le plasmide correspond à la séquence interne des gènes *mos C* et *moc C*.



Résultat de l'amplification de la région interne du gène d'intérêt.

Traitement à la T4 DNA polymérase

Clonage des produits PCR en *Eco RV* dans le plasmide pSKoriTKan.

Figure 3.3 : Clonage de la région interne du gène amplifié par PCR dans le pSKoriTKan.

b) Transfert conjugatif des plasmides dans la souche *B. melitensis* 16M Nal<sup>R</sup>.

Afin d'obtenir les mutants de nos différents gènes chez *Brucella* une conjugaison a été réalisée. Pour se faire, des *E. coli* S17 ( au préalable transformées avec le plasmide recombinant) et *B. melitensis* Nal<sup>R</sup> ont été déposées sur un filtre mettant ainsi en contact les deux bactéries. Au cours de la conjugaison, le plasmide recombinant est transféré de la souche donneuse *E. coli* S17 vers la souche receveuse *B. melitensis* 16M Nal<sup>R</sup>. Etant non répliatif chez *Brucella* le plasmide pSKoriTKan recombinant est obligé de s'intégrer au génome bactérien pour se maintenir dans cette souche. L'intégration dans le génome se fait par une recombinaison entre l'insert porté par le pSKoriTKan et sa copie chromosomique présente dans *Brucella*. Cet événement de recombinaison aboutit à la disruption du gène d'intérêt (figure3.4).

Pour sélectionner les candidats disruptants, le filtre ayant servi à la conjugaison est transféré sur un milieu de sélection Nal/Kan. Ces deux antibiotiques additionnés au milieu permettent uniquement la croissance des *Brucella* ayant intégré le plasmide dans leur génome.

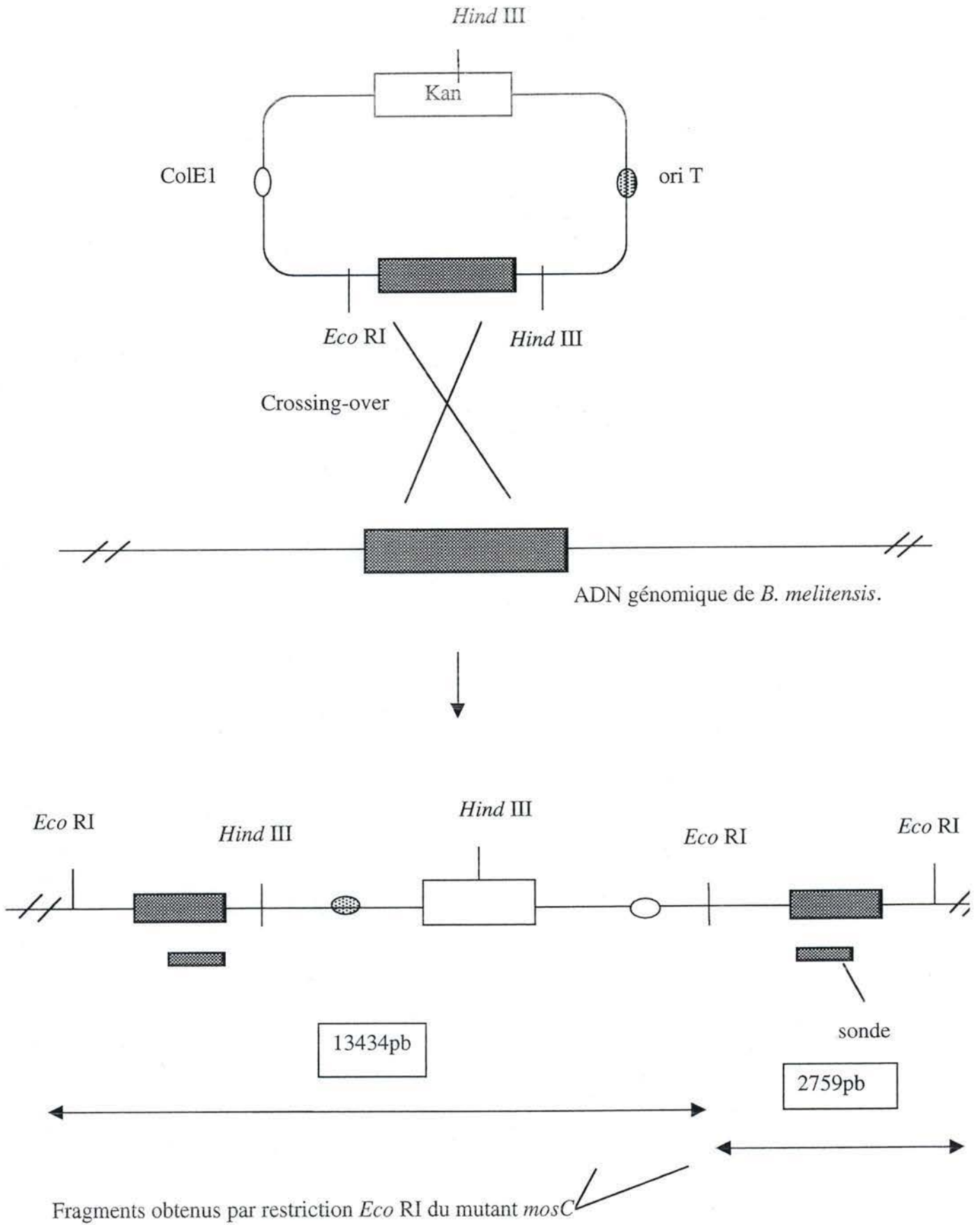


Figure 3.4: Schéma représentatif de l'intégration du pSKoriTKan dans le génome de *B. melitensis* 16M.

c) Validation des mutants.

La technique du Southern blot a été employée afin de certifier que l'intégration du plasmide recombinant s'est produite au bon locus dans le génome de *Brucella*.

L'ADN génomique de chacun de nos candidats mutants a été extrait puis restreint par l'enzyme *Eco* RI. De nombreux sites de restriction de cette enzyme sont présents dans le génome de la bactérie et un site de restriction pour *Eco* RI est présent dans le pSKoriTKan.

Sur base de données génomiques nous pouvons déterminer la position de ces différents sites de restriction ce qui nous permet d'estimer les tailles des fragments révélés suite à l'hybridation de la sonde. La sonde employée ici correspond à la région interne du gène étudié amplifiée et marquée radioactivement. Cette sonde se lie spécifiquement aux bandes contenant les fragments du gène disrupté. Pour la restriction *Eco* RI la taille des fragments obtenus doivent être de 3500pb et 5196pb pour le mutant *moc C* et la taille de la bande unique du contrôle (souche sauvage) est de 4150pb. La restriction *Eco* RI du mutant *mos C* donne deux fragments d'une taille de 13434pb et 2759pb, pour le contrôle la restriction isole un fragment de 11814pb.

Sur base de ce film autoradiographique, nous pouvons confirmer que la taille des bandes observées (estimées à l'aide du marqueur de poids moléculaire) concorde bien avec celles attendues ( figures 3.5 et 3.6).

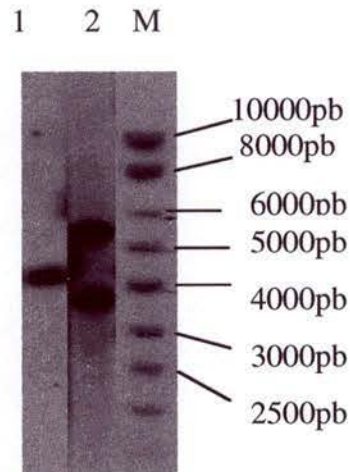


Figure 3.5: Résultat du Southern obtenu pour le mutant *mocC*.  
Piste 1: souche sauvage *B. melitensis* 16M.  
Piste 2: mutant *mocC*.  
Piste M: marqueur de poids moléculaire.

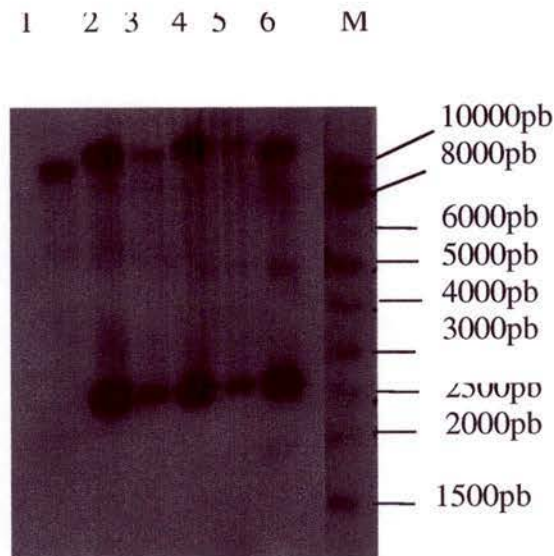


Figure 3.6: Résultat du Southern obtenu pour les mutants *mosC*.  
 Piste M: marqueur de poids moléculaire.  
 Piste 1: souche sauvage de *B. melitensis* 16M.  
 Pistes 2 à 6: plusieurs candidats mutants *mosC* montrant tous le profil attendu.

### 3.1.3 Caractérisation des mutants dans les systèmes *mos/moc*.

#### 3.1.3.1 Analyse de la virulence résiduelle en souris.

##### a) Principe.

Il a été montré que *mosC* est induit en macrophage (Eskra *et al.*, 2001) et qu'un mutant *mosA* est atténué en souris (A. Dricot, mémoire 2000). La virulence des mutants *mosC* et *mosA* a été évaluée en modèle murin. Pour chacun des mutants ainsi que pour la souche parentale (*B. melitensis* Nal<sup>R</sup>), quatre souris BALB/c âgées de 7 semaines ont été infectées par voie intrapéritonéale à l'aide d'une suspension bactérienne de  $5 \cdot 10^5$  CFU. Après 4 semaines d'infection, les rates ont été récupérées et des dilutions des broyats de celle-ci ont été étalées afin de dénombrer le nombre de bactéries vivantes présentes dans chaque rate (CFU/rate).

##### b) Résultats.

Les résultats présentés figure 3.7, montrent qu'en comparaison à la souche parentale 16M les mutants sont atténués. L'atténuation observée correspond à une diminution de 1,5 log pour le mutant *mosC* et d'environ deux log pour le mutant *mosA*. On estime qu'une atténuation devient significative lorsque le mutant présente une diminution d'au moins un logarithme. Ces résultats suggèrent que les gènes homologues aux gènes de synthèse (*mosC*) et de catabolisme (*mosA*) de la rhizopine décrits chez *Rhizobium* sont impliqués dans la virulence de *Brucella*.

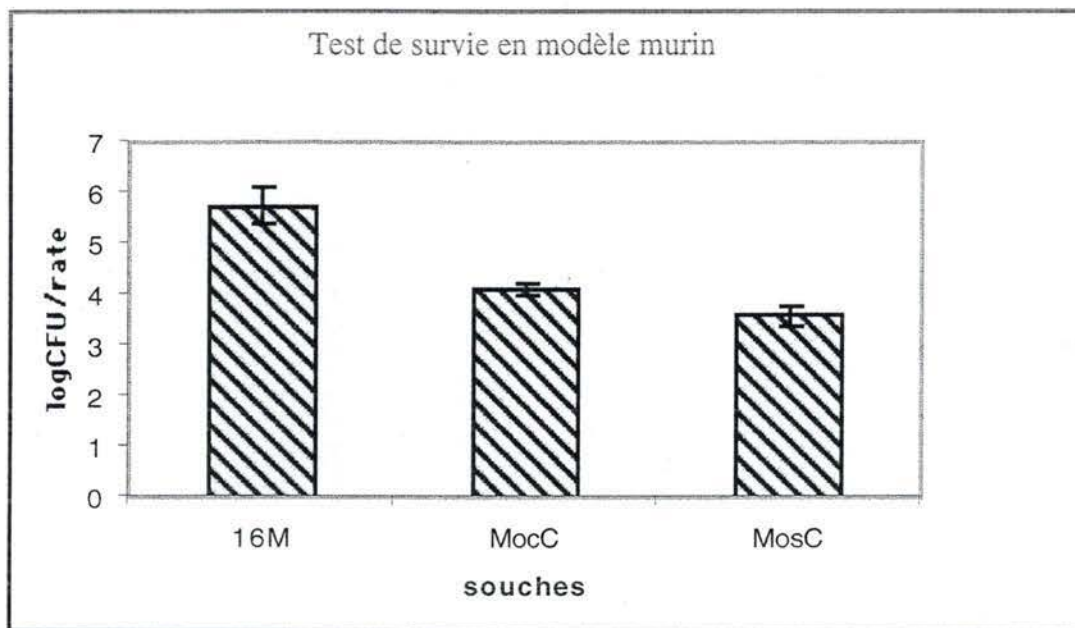


Fig 3.7 : Résultats obtenus lors de l'infection en modèle murin. Les résultats représentent la moyenne logarithmique du nombre CFU/rate calculées pour chacun des mutants en comparaison avec la souche parentale (16M).  
 $\text{LogCFU/rate} = \log_{10}$  du nombre de bactéries par rate.

### 3.1.3.2 Phénotype métabolique des mutants.

#### a) Principe.

Plusieurs publications à cette date ont déjà confirmé le rôle des gènes *mos/moc* dans la synthèse et la dégradation de la rhizopine chez *Rhizobium*. La rhizopine peut être dégradée comme source de carbone ou d'azote chez cette bactérie (Gardener and de Bruijn, 1998). Nous avons donc voulu savoir si dans un premier temps *Brucella* était capable d'utiliser la rhizopine comme source de carbone ou d'azote. Des mutants des gènes *mos*, *moc* et *rpiR* ont été réalisés pour nous permettre de savoir si ces gènes sont impliqués ou non dans la synthèse ou la dégradation de l'inositol ou la rhizopine. Afin de déterminer la fonction précise des différents gènes, les mutants ont été testés sur plusieurs milieux de composition variables (milieux contenant diverses sources de carbone ou d'azote sous des formes différentes).

#### b) Résultats.

Nous avons à notre disposition plusieurs mutants, tous acquis par intégration disruptive, il s'agit des mutants: *mosA* (A.Dricot, mémoire 2000), *rpiR* (V.Haine, thèse en cours) dont la

fonction présumée est de coder pour un régulateur de l'opéron *mosC* (cfr figure 3.1) ainsi que *mosC* et *mosC* (tous deux obtenus au cours de ce travail).

Chaque mutant ainsi que la souche sauvage ont été striés sur des milieux dont les sources de carbone ou d'azote ont été remplacées par de l'inositol ou de la rhizopine. Tandis que la source d'azote a été substituée par la rhizopine.

Le milieu minimum complet (c'est à dire contenant le glycérol et l'acide glutamique comme source de carbone et d'azote respectivement) nous sert de contrôle positif pour cette expérience. Ce test permet de s'assurer de la viabilité des souches mutantes et de celle de la souche sauvage.

Des milieux minimums sans glycérol et sans acide glutamique ont d'abord été utilisés afin de vérifier que nos souches sont bien incapables de pousser sur un milieu dépourvu de carbone et d'azote. Aucune croissance sur ce milieu n'a été détectée.

Afin de déterminer si l'inositol est une source de carbone pour *Brucella* et préciser si la rhizopine peut être exploitée comme source de carbone ou comme source d'azote par la bactérie, ces deux composants ont été additionnés à raison de 20µg/ml aux milieux minimums dépourvus de glycérol ou d'acide glutamique. Aucune colonie n'a été observée sur ces milieux. Ces données nous laissent supposer que ni l'inositol, ni la rhizopine ne représentent des sources de carbone et d'azote pour *Brucella*. Ce résultat reste à considérer avec précaution étant donné que nous n'avons pu essayer qu'une seule concentration de rhizopine soit 20µg/ml alors que les quantités de carbone et d'azote additionnées habituellement au milieu sont respectivement de 30mg de glycérol par ml de milieu et de 1,5mg/ml pour l'acide glutamique. La quantité de rhizopine ajoutée au milieu est donc très faible en comparaison des quantités de glycérol et d'acide glutamique. Il est donc possible que la concentration testée soit insuffisante pour permettre une croissance bactérienne. D'autre part, il n'est pas à exclure que l'induction de ces gènes requiert plusieurs facteurs( comme par exemple la microaérobie). L'activation des gènes considérés peut être de ce fait dépendante de plusieurs facteurs qui ne sont toujours pas identifiés à l'heure actuelle. Or, au cours de cette expérience nous n'avons testé qu'un seul facteur qui est le substrat.

### 3.2. Construction de systèmes rapporteurs.

Une des possibilités offertes par la biologie moléculaire pour l'étude des variations de l'expression des gènes de virulence est l'utilisation de gènes rapporteurs. Les données dont nous disposons nous permettent de dire que le gène *moc C* est induit chez *B. melitensis* biovar abotus 24H après infection en macrophages. A l'inverse, aucune étude ne s'était encore attardée sur les variations potentielles dans l'expression des gènes de synthèse de la rhizopine (les gènes *mos*). Le laboratoire s'est donc penché sur la question de la régulation de ces différents gènes.

En vue de préciser les conditions sous lesquelles les gènes *mos* et *moc* sont exprimés et ce principalement au cours du processus infectieux, nous avons utilisé la technique des systèmes rapporteurs. Les gènes rapporteurs employés sont: les gènes codant pour la GFP ( green fluorescent protein) et *cat* ( pour chloramphénicol acétyl-transférase, conférant la résistance au chloramphénicol). Ce système rapporteur est porté par un plasmide, le pBBR1-GFP (figure3.8) (Khöler, 1999). Les séquences amont des gènes étudiés (*moc A*, *mos A*, *mos C*, *rpil* et *moc C* ) ont été clonées de façon directionnelle en amont du gène de la GFP, résultant en une fusion transcriptionnelle. Les constructions ainsi obtenues serviront à la visualisation des conditions d'induction des gènes étudiés chez *B. melitensis* grâce à la fluorescence émise par la GFP (sous une longueur d'onde de 480nm).

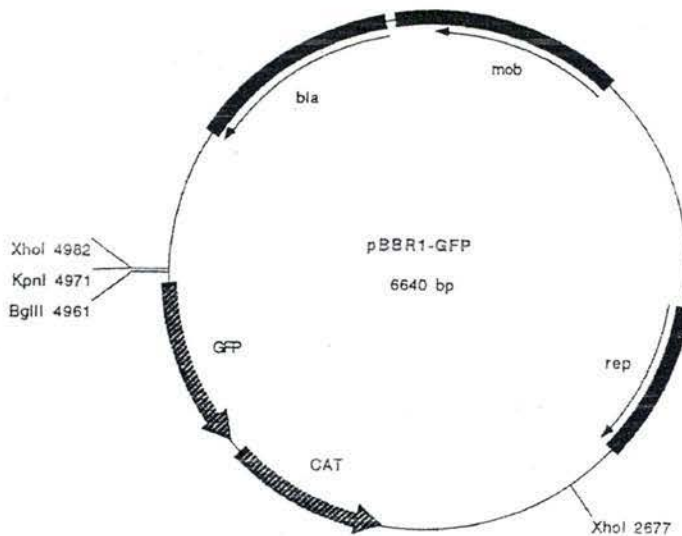


Fig 3.8 : Carte du pBBR1-GFP [Khöler, 1999 #121].

### 3.2.1. Amplification des régions promotrices.

#### 3.2.1.1 Définition des primers.

Etant donné que les régions promotrices des gènes étudiés ne sont pas clairement localisées, un ensemble de couples d'amorces a été choisi afin d'amplifier les 500pb en amont de l'ATG des gènes suivants : *mos,A*, *mos C*, *rpir*, *moc A* et *moc C* . Par facilité pour le reste du travail, les séquences amplifiées seront dénommées : régions promotrices. Afin d' obtenir un contrôle positif, nous avons amplifié le promoteur du gène *ctrA* puisque ce gène est décrit comme étant exprimé constitutivement chez *B. abortus* (Bellefontaine *et al.*, 2002).

Pour réaliser le clonage directionnel, un site de restriction *Bgl* II a été additionné à l'extrémité 5' de la séquence de l'amorce aval tandis que pour l'amorce amont un site de restriction *Kpn* I a été ajouté (figure 3.9). Les séquences complètes des amorces sont données dans le matériel et méthodes.

<u>Primer amont</u>	<u>Primer aval</u>
5' <u>agatct</u> ....amorce3'	5' <u>ggtacc</u> ...amorce 3'
<i>Kpn</i> I	<i>Bgl</i> II

Fig 3.9: Représentation des positions des sites de restriction des amorces.

#### 3.2.1.2 Amplification des inserts.

Les régions promotrices de chaque gène ont été amplifiées. Plusieurs tentatives infructueuses ont été réalisées avec différentes polymérases proofreading c'est à dire à faible taux d'erreurs (*Tgo* et *Pfx* ).Ces régions promotrices ont finalement été amplifiées avec la *Taq* polymérase. Bien que cette polymérase ne soit pas proofreading, la taille des fragments à amplifier ne dépassant pas les 500pb, le risque d'erreur est relativement faible. De plus, même si l'enzyme est connue pour engendrer des mutations celles-ci seront détectées lors du séquençage et n'affecteront pas une région codante. L'analyse des produits PCR sur gel d'agarose montre des fragments de 500pb correspondant à la taille attendue (figure 3.10). Les amplicons ont été récupérés du gel et purifiés en vue du clonage dans le pGEM-T Easy.

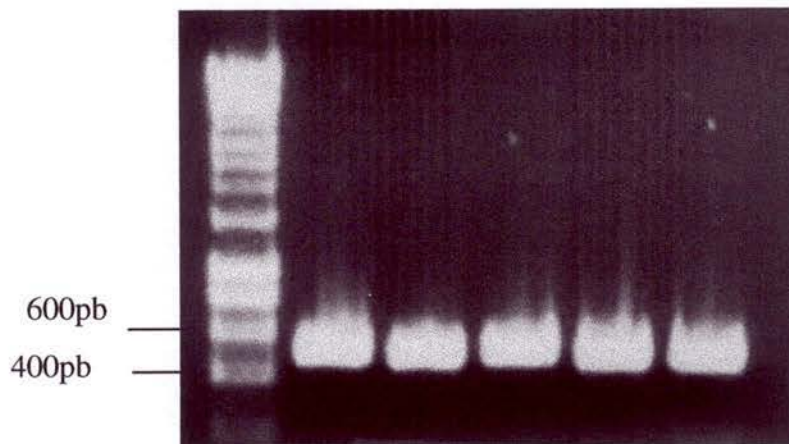


Fig 3.10 : Migration électrophorétique des produits PCR des régions promotrices des gènes étudiés.

Piste 1 : Produit PCR *mos C*, piste 2 : Produit PCR *rpir*, piste 3 : Produit PCR *moc A*,  
 piste 4 : Produit PCR *mos A*, piste 5 : Produit PCR *moc C*, piste M : marqueur hyperladder.

### 3.2.2 Clonage dans le pGEM-TEasy.

#### 3.2.2.1 Principe.

En vue du clonage directionnel dans le pBBR1-GFP les produits PCR doivent être restreints par *Bgl* II et *Kpn* I. Etant donné que les sites de restriction sont aux extrémités des amorces, ils se trouvent donc aux extrémités libres des produits amplifiés. Or on sait que *Bgl* II et *Kpn* I ont une activité de clivage de l'ADN nulle sur les extrémités libres. Pour contourner ce problème nous avons sous cloné les produits PCR purifiés dans le pGEM-T (figure 3.11), permettant un clonage rapide des produits PCR. En effet, le plasmide linéarisé en *Eco* RV possède à chacune de ses extrémités des thymines protrudantes. Celles-ci pourront facilement s'apparier aux adénines ajoutées en 3' par la *Taq* polymérase au cours de la réaction d'amplification des séquences promotrices.

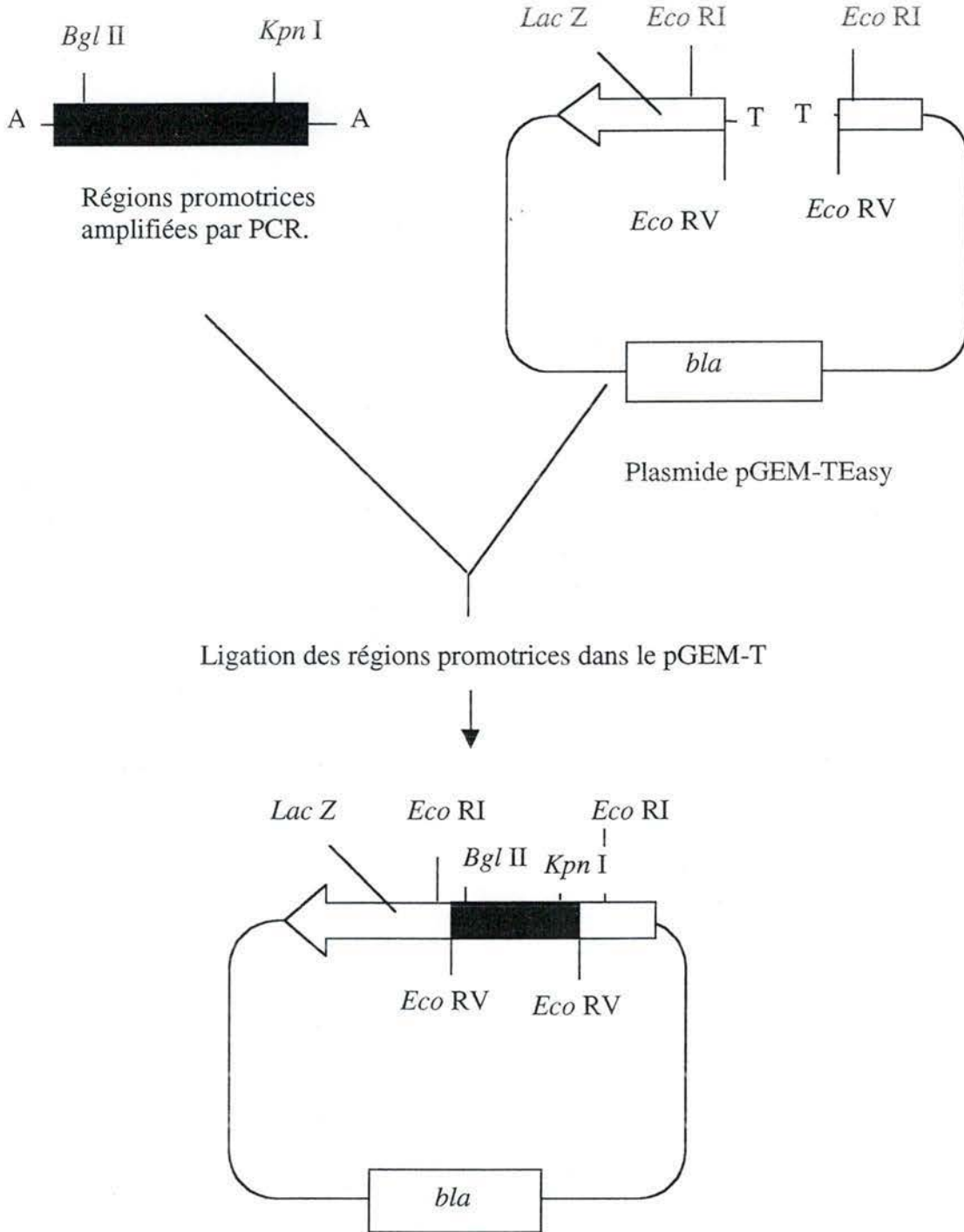


Figure 3.11: Schéma du clonage des régions promotrices dans le plasmide pGEM-TEasy.

### 3.2.2.2 Résultats.

Chaque produit PCR après sa purification a été ligué dans le vecteur pGEM-TEasy. Le produit de ligation a été transformé dans des DH10B CaCl<sub>2</sub> compétentes. La sélection des clones recombinants s'est faite sur un milieu Amp/ Xgal-IPTG en ayant recours au test blanc/bleu. Pour chacun des vecteurs, trois colonies blanches (soient celles ayant intégré l'insert) de la transformation ont été choisies pour réaliser des minipréparations d'ADN plasmidique. Afin d'isoler les régions promotrices clonées au préalable dans le pGEM-T Easy, une double restriction par *Bgl*II et *Kpn* I a été effectuée sur les minipréparations d'ADN plasmidique. L'analyse du profil électrophorétique des plasmides restreints montre deux fragments. Un premier fragment de 3000pb représente le plasmide vide restreint et l'autre fragment de 500pb correspond à la taille attendue pour la région promotrice amplifiée.

### 3.2.3 Préparation de la matrice.

Dans un premier temps, une restriction diagnostic par *Xho* I a été réalisée afin de s'assurer de l'identité du plasmide. Les fragments obtenus après restriction ont une taille de 5000pb et de 2305pb environ. Il semble que le plasmide ait 700pb supplémentaires situées hors de la cassette *Xho* I contenant les gènes rapporteurs. Après contact avec la personne ayant construit ce plasmide, nous avons pu conclure qu'il y avait bien une erreur dans la description du plasmide. Nous avons donc du continuer à travailler avec ce plasmide pour élaborer les systèmes rapporteurs.

En vue du clonage des régions promotrices dans le pBBR1-GFP, celui-ci a été restreint par *Bgl* II et *Kpn* I (figure 3.12). Les sites de restriction de ces enzymes n'étant distant que de quelques paires de base, il est difficile de détecter le fragment compris entre ces deux sites et donc de s'assurer que la matrice a été restreinte correctement aux deux sites de restriction. Afin de contrôler l'efficacité de la double restriction, le plasmide coupé a été reliqué sur lui-même et transformé dans *E. coli* DH10B. En parallèle, une quantité égale de plasmide doublement restreint mais non ligué ainsi que le plasmide non restreint ont été transformés dans la même souche. Après transformation, les bactéries ont été étalées sur le milieu LB Amp. Le comptage du nombre de colonies pour les trois préparations permet de détecter le taux de plasmide doublement restreint. En effet, si le pBBR1-GFP est restreint aux sites *Bgl* II et *Kpn* I et reliqué, le pourcentage de ces clones poussant sur milieu doit être faible par rapport au plasmide non restreint et en proportion équivalente aux nombres de clones obtenus dans le cas du plasmide restreint mais non ligué. Les résultats obtenus nous ont permis de conclure qu'un taux important de plasmide avait bien subi la double restriction.

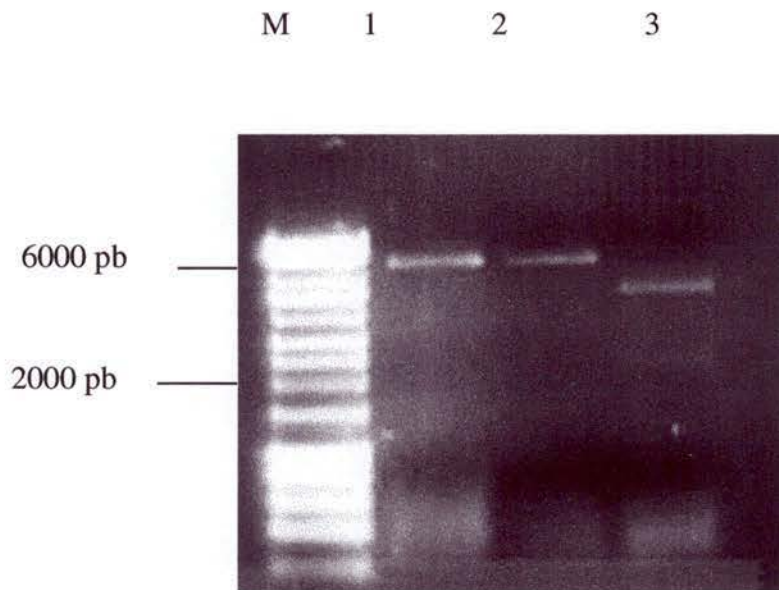


Figure 3.12: Restriction du plasmide pBBR1-GFP.  
 Piste M : marqueur hyperladder, piste 1 : restriction du pBBR1-GFP par *Bgl* II, piste 2 : restriction du pBBR1-GFP par *Kpn* I, piste 3 : restriction du pBBR1-GFP par *Xho* I.

### 3.2.4 Construction des systèmes rapporteurs.

#### 3.2.4.1 Clonage des régions promotrices dans le pBBR1-GFP.

( figure 3.13)

Les bandes isolées du pGEM-T Easy ont été récupérées du gel d'agarose et purifiées en vue du clonage dans le pBBR1-GFP. Ces fragments restreints par *Bgl* II et *Kpn* I ont été ligués dans le plasmide pBBR1-GFP restreint par ces mêmes enzymes. Les plasmides ligués ont ensuite été transformés dans des souches *E. coli* DH10B et étalés sur milieu sélectif Amp.

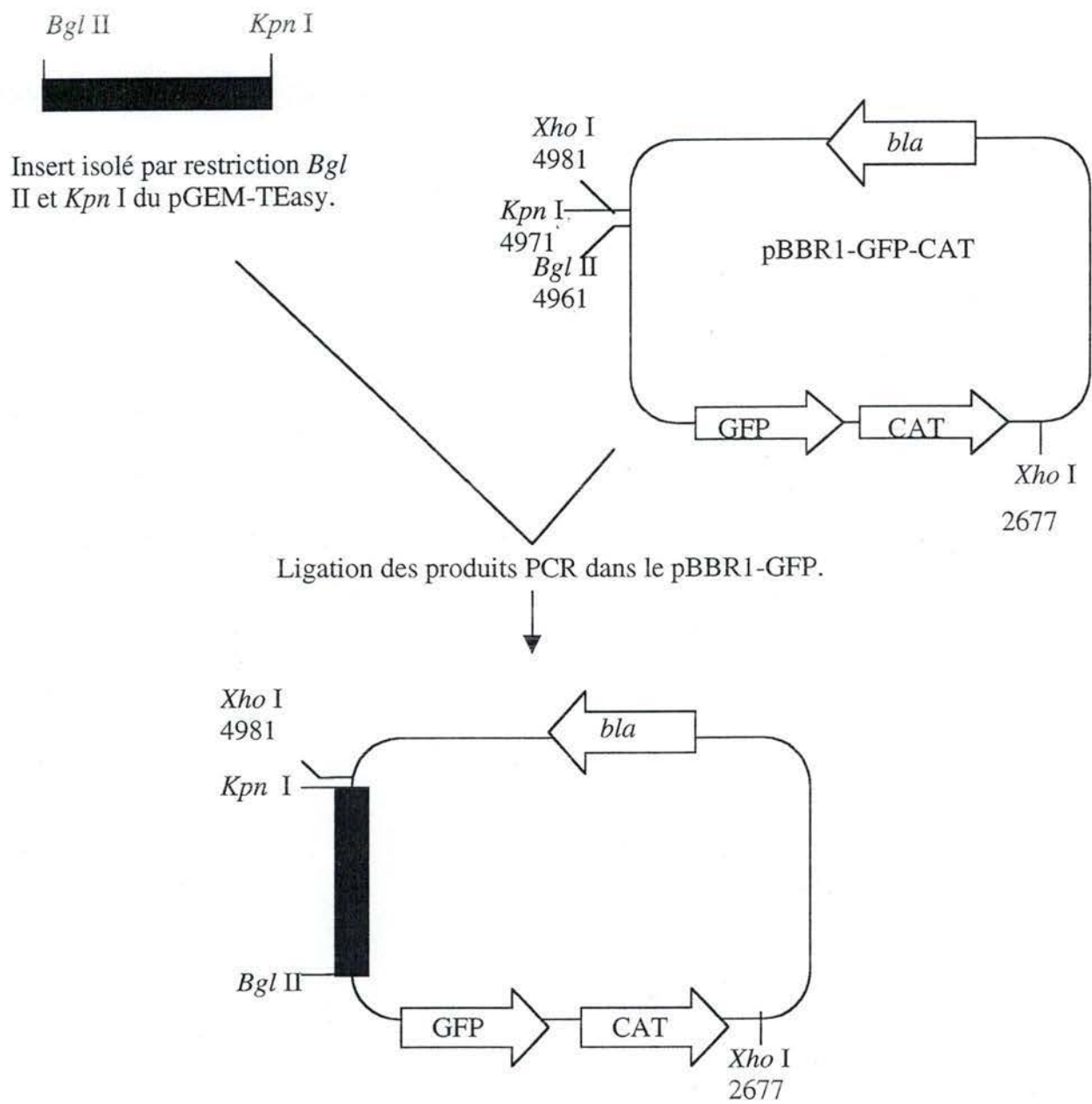


Figure 3.13: Schéma du clonage des produits PCR dans le pBBR1-GFP-CAT.

### 3.2.4.2. Vérification de la présence de l'insert.

Pour identifier parmi les clones ayant poussé sur le milieu sélectif uniquement ceux contenant les plasmides recombinants, une PCR sur colonies a été effectuée. Pour ce faire, cinq colonies du milieu de sélection ont été choisies. L'amplification s'est faite avec les amorces définies pour les amplifications des régions promotrices. Un contrôle négatif constitué du plasmide vide a été utilisé et ce pour chaque paire d'amorce. Une bande de 500pb est détectée pour certains clones confirmant la présence de l'insert dans ceux-ci (figures 3.14a et 3.14b). Les différentes constructions obtenues seront désormais désignées pmosC, pmocC, pmosA, pmocA, prpiR et pctrA dans la suite du travail.

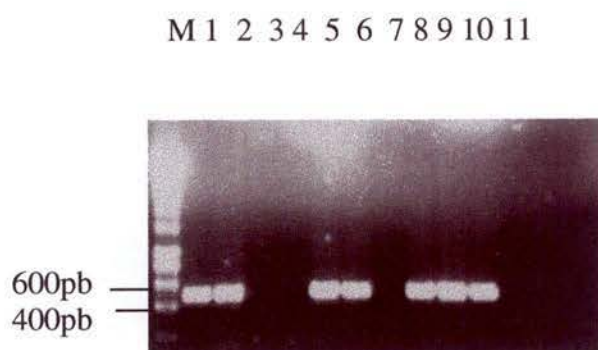


Figure 3.14a: Profils électrophorétiques des PCR sur colonies.  
Piste M : marqueur hyperladder, pistes 1-10 : amplification du promoteur *mos A*, piste 11 : produit PCR du contrôle négatif amplifié avec les amorces définies pour *mos A*.



Figure 3.14b: Profils électrophorétiques de PCR sur colonies.  
Piste M : marqueur hyperladder, pistes 1-5 : amplification du promoteur *moc C*, pistes 6-10 : amplification du promoteur *moc A*, pistes 10-13 : amplification du promoteur *rpiR*.

#### 3.2.4.3 Validation des constructions.

La PCR nous a permis de sélectionner parmi les clones positifs (c'est à dire présentant le fragment de 500pb) un clone pour chacune des constructions. Chacun de ces clones a ensuite été séquencé. L'amorce utilisée pour le séquençage vient s'hybrider 200 pb de base en aval de l'ATG de la GFP. Les séquences clonées ont été comparées par alignement pairé aux séquences du génome de *B. melitensis* à l'aide du programme « pairwiseBlast » (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>). L'analyse des séquences montre que les inserts de pmos A, pctrA et pmos C ne présentent aucune mutation. Par contre l'insert de prpiR diffère de la séquence génomique, en effet dans celui-ci une thymine a été substituée par une adénine. Malgré cette mutation nous avons décidé de continuer à travailler avec cette construction puisque la mutation se situe dans une région promotrice soit non codante. En ce qui concerne pmocA, l'analyse de la séquence a permis de montrer que celui-ci s'est ligué à l'envers (dans le sens opposé au sens de transcription) ainsi que la présence d'une mutation dans la séquence. Il s'est avéré que cela était dû à une erreur dans la définition des amorces, les sites *Bgl* II et *Kpn* I ayant été mal placés. De ce fait, nous disposons de deux constructions identiques prpiR (toutes deux mutées mais à des sites différents dans la séquence). Aucune séquence n'a pu être obtenue pour le vecteur pmocC.

Finalement, les constructions pour quatre promoteurs (prpir, pmosA pctrA et pmosC) ont été obtenues. Les problèmes de séquençage du vecteur pmocC n'ayant pu être résolus, la construction a été recommencée. A ce jour, la construction pmocA est obtenue mais aucun tests n'a été effectué avec cette construction.

#### 3.2.5. Transformation des vecteurs dans *B.melitensis*.

Les constructions prpiR, pmosC, pmosA et pctrA ont été électroporées dans *B. melitensis*. Dans ce cas, nous avons privilégié l'électroporation à la conjugaison étant donné que le plasmide utilisé est répliatif chez *Brucella*. Les transformants ont été étalés et sélectionnés sur milieu 2YT Amp (grâce à la présence du gène *bla* porté par le pBBR1-GFP). Des clones isolés ont été obtenus pour chacune des électroporations. Dans la suite du travail, un clone de chaque construction a été utilisé pour les différents tests.

### 3.3. Etude des conditions d'induction des gènes.

Les gènes impliqués dans la virulence des bactéries pathogènes sont sujets à d'importants mécanismes de régulation. Ces gènes subissent une régulation dans l'espace et dans le temps. Un des objectifs de ce travail est donc de déterminer les conditions sous lesquelles les gènes *mos/moc* sont susceptibles d'être induits et nous nous sommes principalement attardés sur leur expression au cours d'un cycle infectieux.

#### 3.3.1 Utilisation du gène rapporteur *cat*.

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer si les promoteurs sont activés *in vitro*. Pour ce faire, chaque clone a été déposé sur milieu 2YT solide supplémenté de différentes concentrations en chloramphénicol (1,3,6,9 et 12µg/ml). En plus des différents clones, un contrôle négatif constitué par *B. melitensis* portant le pBBR1-GFP-CAT vide a été déposé sur chaque boîte. Les clones *pmosA*, *pmosC*, *prpiR* ainsi que le contrôle négatif sont incapables de pousser aux diverses concentrations en chloramphénicol testées. Si les clones n'expriment pas le gène *cat* cela sous entend que les promoteurs des gènes étudiés ne sont pas activés dans ces conditions de culture. De façon plus générale ces gènes ne semblent pas induits *in vitro*.

#### 3.3.2 Effet de l'inositol et de la rhizopine.

La rhizopine et le *myo*-inositol ont été décrits comme source de carbone ou d'azote pour de nombreuses bactéries appartenant à la rhizosphère (Murphy and Saint, 1992). Nous avons testé les trois constructions sur des milieux contenant ces deux substrats, afin de visualiser si les promoteurs pouvaient être activés suite à leur présence dans le milieu. Il a été décrit que chez *Rhizobium* les gènes *moc* sont induits en présence de leur substrat (la rhizopine). Ne disposant pas de la construction *pmoc*, nous nous sommes focalisé sur la construction *prpiR*. De part la position du gène *rpiR* par rapport à l'opéron *moc*, nous pensons que ce dernier pourrait intervenir en tant que régulateur de cet opéron. Il paraît donc intéressant de savoir si le promoteur de ce gène est activé en présence des substrats de l'opéron *moc* en d'autres termes la rhizopine.

Les constructions *pmos A/C* ont quant à elles été testées, bien que l'on s'attend a priori à ce que les promoteurs de ces gènes ne soient pas activés en présence de la rhizopine. Par contre,

sur milieu avec inositol il est possible que les promoteurs de *mosA* et *mosC* soient induits. En effet, le gène *mosA* est décrit comme codant pour une méthylase, il est donc possible que ce gène soit exprimé sur milieu inositol, en supposant qu'il se produit une méthylation de l'inositol pour former la rhizopine. La protéine codée par le gène *mosC* intervient probablement comme un transporteur de l'inositol ou de la rhizopine. Le promoteur de *mosC* pourrait donc être induit en présence d'une de ces substances.

Les différentes constructions et le contrôle négatif ont été étalés sur un milieu 2YT supplémenté en différentes concentrations en chloramphénicol (c.f. supra) ainsi que de myo-inositol ou de rhizopine à la concentration de 20µg/ml.

Aucun des clones n'est capable de pousser sur ces milieux, suggérant que ni l'inositol ni la rhizopine n'ont d'effet inducteur à la concentration testée. Le 2YT étant un milieu empirique, nous avons recommencé ces expérimentations sur deux milieux synthétiques différents ; le milieu minimum de *Brucella* et du RPMI (milieu de culture cellulaire), les résultats observés restent négatifs. Dans tous les cas étudiés, aucune croissance sur les différents milieux n'a pu être visualisée. Ces données permettent de conclure que les promoteurs de gènes étudiés ne sont pas activés par les concentrations testées de la rhizopine et du myo-inositol.

### 3.3.3. Utilisation de la GFP.

Un autre aspect du travail est de déterminer si les gènes étudiés sont exprimés lors d'une infection et de préciser quels sont les moments d'induction de ces gènes au cours du processus infectieux. L'activité (éventuelle) des promoteurs des gènes *mosC*, *mosA*, *mosC* et *rpiR* lors du voyage intracellulaire de *Brucella* peut être mise en évidence grâce à l'utilisation du gène rapporteur GFP.

L'observation de la fluorescence émise par la GFP se fait au microscope à fluorescence sous une longueur d'onde de 395nm.

#### 3.3.3.1 Etude de l'activité des promoteurs en macrophages.

Même si aucune induction *in vitro* n'a pu être démontrée par l'utilisation du gène rapporteur *cat*, nous avons vérifié cette donnée pour le gène rapporteur *gfp*. Des cultures liquides de nos systèmes rapporteurs et du contrôle négatif ont été fixées sur lamelle porte-objet en vue de visualiser l'émission éventuelle de fluorescence. Quelque soit la construction considérée aucun signal GFP n'est visualisé, confirmant l'absence d'activation des promoteurs *in vitro*.

Des macrophages cultivés sur des lamelles couvre objet ont été infectés avec les trois souches porteuses des plasmides recombinants *pmosC*, *pmosA* et *ppir* ainsi qu'avec le contrôle positif *pctrA*. Afin de suivre l'expression éventuelle de la *gfp* au cours du temps, une cinétique d'infection a été mise en place en faisant choix des points 2, 12 et 24H correspondant à des localisations différentes de la bactérie dans la cellule. Pour faciliter l'observation, les bactéries intracellulaires ont ensuite été marquées à l'aide d'un anticorps dirigé contre le LPS, la présence de ces anticorps étant révélée par un anticorps secondaire marqué au texas-red.

Pour les trois temps testés, nous avons pu observé le signal *gfp* pour le contrôle positif et on peut voir que ce signal colocalise avec celui des anticorps anti-LPS (figure 3.15). L'observation au microscope des constructions a révélé une émission de fluorescence pour la construction *pmosA* aux points 24 et 48H post-infection (figure 3.16). Suite à ce résultat, nous pouvons conclure que le gène *mosA* est induit lors du processus infectieux de la bactérie. Par contre, pour les autres constructions quelque soient les temps d'infection pris en compte aucune fluorescence n'est émise par la GFP, tandis que les bactéries sont bien détectées par le marquage du LPS. Ces données suggèrent dès lors que les séquences clonées n'ont pas d'activité promotrice dans les conditions testées.

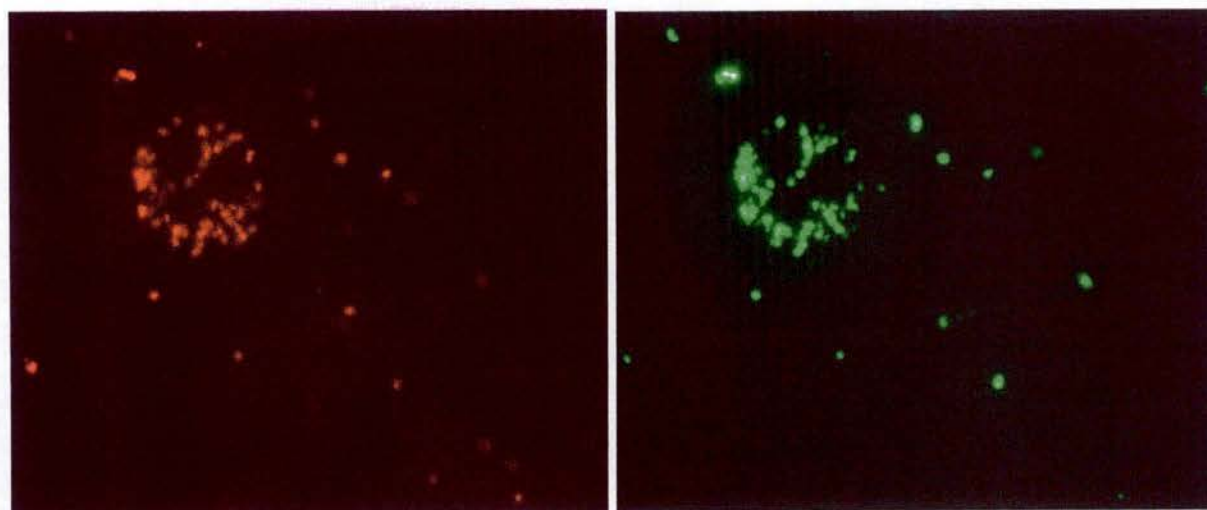


Figure 3.15 : Observations au microscope à fluorescence du point 24h de l'infection des macrophages par *B. melitensis* porteuses de la construction pctrA.

Photo de gauche : observations des macrophages infectés par les bactéries marquées pour le LPS (grossissement 1000X).

Photo de droite : observations de la fluorescence émise par la GFP (grossissement 1000X).

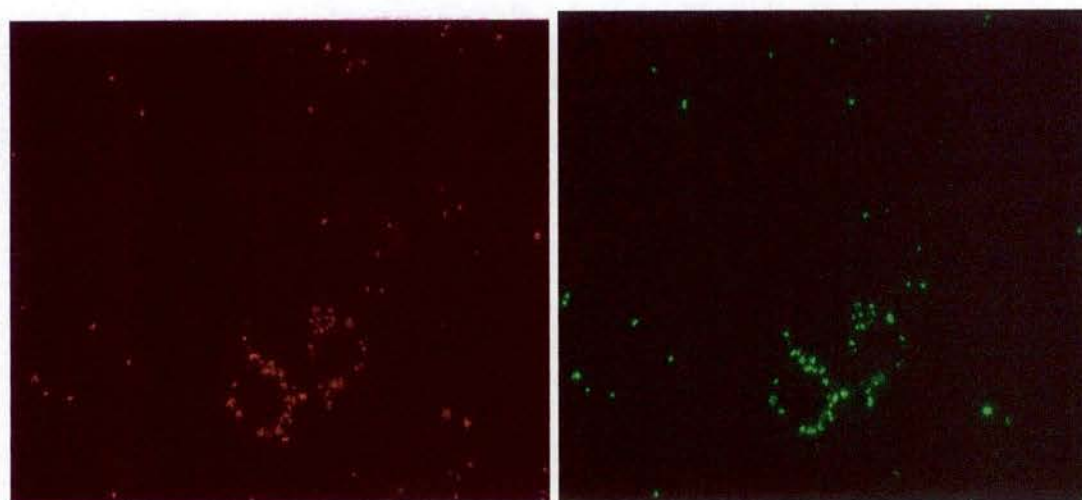


Figure 3.6 : Observations au microscope à fluorescence du point 24H post-infection des macrophages infectés par la souche *B. melitensis* électroporées avec la construction pmosA.

Photo de gauche : observations des macrophages infectés avec la souche porteuse de pmosA et marquée pour le LPS (grossissement 600X).

Photo de droite : observations de la fluorescence émise par la souche porteuse de pmosA (grossissement 600X).

## 4. Conclusions et perspectives.

La découverte dans le génome de *B. melitensis* d'homologues aux gènes *mos* et *moc* présents chez *Rhizobium*, tend à nous interroger sur le rôle de ces gènes chez *Brucella*. Bien que la fonction de gènes *mos* et *moc* soit partiellement connue chez *Rhizobium* puisque l'on sait qu'ils interviennent respectivement dans la synthèse et le catabolisme de la rhizopine. La fonction potentielle de ces gènes chez *Brucella* reste encore à élucider. Une donnée préliminaire acquise au laboratoire : l'atténuation du mutant *mosA*, (A.Dricot, mémoire 2000) et l'induction du gène *mocC* en macrophages (Eskra *et al.*, 2001), nous porte à croire que ces gènes pourraient intervenir dans le caractère virulent de la bactérie. La question à laquelle nous avons donc tenté de répondre au cours de ce mémoire est de déterminer si les gènes *mos* et *moc* présents chez *B. melitensis* sont susceptibles de jouer un rôle dans la virulence de ce pathogène?

Au terme des diverses expériences menées durant ce travail aucune fonction précise n'est encore attribuée aux gènes *mos* /*moc* de *B. melitensis*. Par contre, l'implication de ces gènes dans la virulence de cette souche a été confirmée. En effet, les mutants *mosC*, *mocC* créés par la technique de disruption intégrative et testés en modèle murin, montrent une atténuation par rapport à la souche sauvage.

Après avoir confirmé le rôle de ces gènes dans la virulence de *Brucella*, une caractérisation phénotypique des mutants (*mosC*, *rpiR*, *mosA* et *mocC*) a été mise en place dans le but de découvrir la fonction potentielle de ces gènes chez *B. melitensis*. Etant donné que la fonction attribuée aux gènes *mos* et *moc* de *Rhizobium* est de produire et de dégrader la rhizopine (Murphy, 1992), une fonction similaire a été présumée chez *Brucella*. Nous avons donc strié les mutants ainsi que la souche sauvage sur des milieux pour lesquels les sources de carbone ou d'azote "habituelles" (glycérol et acide glutamique) ont été remplacées par la rhizopine afin de déterminer si les gènes *mos* et *moc* sont liés à la capacité de synthèse ou de dégradation de ce composé chez *B. melitensis*. Parallèlement, nous avons testé ces mêmes milieux mais en y ajoutant cette fois de l'inositol à la place de la rhizopine. Nous avons testé l'inositol, d'une part parce que la rhizopine est un dérivé de ce composé et d'autre part parce que plusieurs ORFs de l'opéron *moc* présent chez *Brucella* partagent des similitudes avec les gènes *iol* de *B. subtilis*. Les protéines encodées par ces gènes *iol* interviennent dans la voies

de dégradation du *myo*-inositol (Yoshida *et al.*, 1997). Aucune croissance n'ayant pu être observée sur les milieux contenant la rhizopine ou l'inositol, nous pouvons conclure que ni l'inositol, ni la rhizopine ne sont exploitées comme source de carbone ou d'azote par *B. melitensis*. Mais cette donnée doit être considérée avec précaution. En effet, il est possible que les concentrations des deux composés additionnées aux milieux soient trop faibles que pour supporter la croissance de différents clones (mutants et sauvage). En vue de déterminer la concentration en rhizopine ou inositol suffisante pour assurer la croissance de la souche considérée, une gamme de concentrations variables devrait être testée en augmentant progressivement la concentration en rhizopine ou inositol. Une autre hypothèse pourrait être que les conditions dans lesquelles les mutants ont été expérimentés ne soient pas représentatives des conditions sous lesquelles s'expriment ces gènes. Il est possible que l'activation de ces gènes nécessitent un ensemble de paramètres indispensables à leur expression. Il est donc envisageable de tester diverses conditions (autres que le substrat) qui sont susceptibles d'être requises pour permettre l'expression des gènes.

Puisque l'implication des gènes *mos* et *moc* dans la virulence de *Brucella* a été démontrée, nous avons abordé l'aspect de la régulation de ces gènes et ce principalement pendant le processus infectieux. Comme déjà précisé le profil d'expression de ces gènes a été suivi grâce à la technique des gènes rapporteurs. Les gènes rapporteurs utilisés dans notre cas, sont: le gène *cat* codant pour la résistance au chloramphénicol ( utilisé pour l'étude *in vitro* ) et le gène *gfp* pour l'analyse *ex vivo* (étude en macrophages). Cette technique présente plusieurs avantages dont un particulièrement intéressant pour les infections. A la différence d'autres méthodes de détection (comme par exemple les anticorps) les bactéries produisant la GFP peuvent être visualisables (de par l'émission de fluorescence) à l'intérieur des cellules sans nécessiter de traitements susceptibles d'altérer les composants cellulaires (Valdivia and Falkow, 1997).

Pour construire ces systèmes rapporteurs, les régions promotrices putatives des gènes considérés soient: *mosA*, *mosC*, *mocC*, *mocA* et *rpiR* ont été clonées en amont de l'unité transcriptionnelle formée des deux gènes rapporteurs (*gfp/cat* ).

La première expérience effectuée avec les systèmes rapporteurs consistait à préciser si les gènes sont exprimés *in vitro*. Pour ce faire les constructions (*pmosA*, *pmosC* et *prpiR*) et la souche porteuse du plasmide vide ont été déposées sur milieu minimum avec chloramphénicol. Etant donné qu'aucune croissance n'a été obtenue dans ces conditions on conclut que les gènes étudiés ne sont pas exprimés *in vitro*.

D'autre part, pour savoir si les gènes sont induits en présence de rhizopine ou de *myo*-inositol, ces substances ont été additionnées au milieu. Aucun clone n'étant obtenu sur ces milieux, on en déduit que les promoteurs des gènes ne sont pas activés en présence de ces substances. Plusieurs hypothèses peuvent être énoncées pour expliquer ce manque d'activation des promoteurs. D'une part, les régions clonées dans le plasmide pBBR1-GFP sont des régions promotrices putatives. La séquence qui a été amplifiée correspond aux 500pb en amont de l'ATG du gène il est donc possible que seulement une partie du promoteur ait été clonée, et de ce fait que la séquence « manquante » contient au moins une partie de la séquence consensus reconnue par le(s) facteur(s) de transcription. De plus, les concentrations éventuelles de rhizopine ou de *myo*-inositol à partir desquelles on peut observer une induction des gènes n'étant pas connues, la quantité de rhizopine ou d'inositol ajoutées aux différents milieux était totalement aléatoire. De ce fait, les quantités de rhizopine ou de *myo*-inositol peuvent être trop faibles que pour permettre une activation des promoteurs.

D'autre part, les gènes bactériens sont sujets à de nombreuses variations dans leur expression. Cette expression peut être contrôlée par divers réseaux complexes de régulation, des stimuli différents peuvent donc intervenir dans cette régulation. Parmi les différents stimuli, la microaérobie nous semble la plus prometteuse en résultat. En effet, même si peu de données sont à l'heure actuelle disponibles concernant l'expression des gènes *mos*, il a été décrit dans la littérature que ces gènes sont exprimés chez *Rhizobium* lorsque les bactéries sont localisées dans le cordon d'infection et dans le nodule suggérant une induction de ces gènes en microaérobie (Heinrich *et al.*, 2001). Les constructions *pmos* pourraient donc être testées afin de visualiser l'activation éventuelle des promoteurs de ces gènes sous cette condition chez *Brucella*. Pour cette expérience, il nous suffirait de strier les constructions ainsi qu'un contrôle positif sur milieu solide contenant différentes concentrations en chloramphénicol et de laisser pousser les colonies en microaérobie.

Les données récoltées suite à l'étude de mutants *mos* et *moc* nous ont montré que des mutants de ces gènes sont atténués en modèle murin. Ce qui nous porte à croire que les gènes *mos* et *moc* sont importants pour le cycle infectieux de *Brucella*. Des variations dans le profil d'expression de ces gènes sont donc possibles. Pour les mettre en évidence, nous avons procédé à une cinétique d'infection en macrophages en faisant choix des points 2, 12 et 24 heures dans l'espoir de visualiser une activation des promoteurs en intracellulaire. Les macrophages ont été infectés avec les souches contenant les constructions et un contrôle positif. Au terme des infections, nous avons pu conclure que le promoteur de *mosA* est activé

aux points 24 et 48H après infection en macrophages. Suite au fait que le mutant *mosA* soit atténué en modèle murin (A.Dricot, mémoire2000) et que l'induction de ce gène pendant l'infection a pu être observée, nous pouvons confirmer que le gène *mosA* est essentiel à la bactérie pour qu'elle puisse établir son cycle infectieux. Pour les autres constructions (*pmosC* et *prpiR*) nous n'avons pas visualisé de signal fluorescent émis par la GFP. Cela reflète l'absence d'activation des promoteurs étudiés, suggérant que les gènes *mosC* et *rpriR* ne sont pas exprimés au cours du processus infectieux. Plusieurs explications concernant cette absence de signal peuvent être données. Deux optiques différentes peuvent être envisagées: soit on remet en cause les constructions, soit on estime que la façon d'étudier l'expression de ces gènes doit subir quelques modifications.

En ce qui concerne les constructions, une hypothèse identique à celle énoncée pour les tests *in vitro* (suggérant que l'entièreté du promoteur n'a pas été cloné) peut être avancée.

L'autre manière d'interpréter l'absence de signal émis par la GFP est liée à la façon de travailler. En fait, nous avons fait choix pour nos infections de trois points (2, 12 et 24h) il n'est pas à exclure que les moments où sont activés les promoteurs des gènes étudiés puissent être des temps intermédiaires à ces trois points. Suite à cette observation une des perspectives serait de recommencer une cinétique d'infection plus serrée dans le temps, en prenant par exemple un point toutes les heures. De plus, les infections ont été réalisées dans des macrophages bovins or l'atténuation des gènes *mos / moc* a été prouvée pour un modèle murin. Pour déterminer si les gènes sont exprimés au cours du cycle infectieux il pourrait être intéressant d'infecter les souris avec les souches porteuses des systèmes rapporteurs. L'observation du signal fluorescent se ferait au microscope à fluorescence à partir de coupes des rates des souris infectées.

A propos des perspectives à mettre en place à court terme, il serait intéressant d'un point de vue pratique d'obtenir la construction *pmocC*. Puisque l'induction du gène *mocC* au cours d'une cinétique d'infection en macrophages a déjà été démontrée chez *B. abortus* (Eskra *et al.*, 2001). Un profil d'expression similaire est susceptible de se produire chez *B. melitensis*.

Par la suite, étant donné que l'induction du gène *mosA* durant le processus infectieux de *Brucella* a été prouvée, l'étape ultérieure consiste à préciser le moment précis à partir duquel le promoteur du gène est activé. Pour répondre à cette question, une nouvelle cinétique d'infection peut être réalisée en prenant plusieurs points antérieurs au point 24H.

Toutes ces perspectives sont des perspectives pouvant être réalisées à court et à moyen terme. D'autres manipulations visant à préciser les conditions exactes de l'expression des gènes *mos* et *moc* semblent des pistes intéressantes à exploiter.

Dans un premier temps, des infections avec les nouvelles constructions (*pmocA*, *prpiR*, *pmosC* et *pmocC*) ainsi que le nouveau contrôle positif sont à recommencer. Ces nouvelles infections devraient nous permettre de nous assurer de la validité de nos données. La construction *pmocC* nous permettrait de confirmer si ce gène est induit chez *B. melitensis* tout comme chez *B. abortus* en macrophages 24H post-infection.

Par la suite, il serait intéressant d'analyser plus en détails les constructions pour lesquelles un signal GFP a pu être détecté (c'est à dire *pmosA*). Des expériences de marquage des organites intracellulaires permettraient de colocaliser nos bactéries avec les compartiments intracellulaires en vue d'identifier à quels moments précis du cycle infectieux de la bactérie les promoteurs sont activés.

Etant donné que le laboratoire dispose de souches de *Rhizobium* nous pourrions penser à réaliser une co-culture en microaérobie des souches de *Rhizobium* avec *B. melitensis* contenant les systèmes rapporteurs. Grâce à cette manipulation, nous pourrions déterminer si *Brucella* est capable de dégrader la rhizopine synthétisée par *Rhizobium* (la rhizopine n'est donc plus synthétique) grâce à l'analyse au microscope à fluorescence du signal GFP. A l'inverse pour savoir si *Brucella* produit la rhizopine, nous pourrions infecter des souris avec des souches sauvages de *Brucella* et des souches mutées dans les gènes supposés être en relation avec la synthèse de rhizopine. Des techniques d'extraction et de purification de rhizopine semblables à celles utilisées pour isoler la rhizopine des nodules (Heinrich *et al.*, 2001) pourraient être appliquées à partir des rates d'animaux infectés.

Même si de plus en plus d'informations s'accroissent au sujet des gènes *mos* et *moc* de nombreuses questions restent sans réponses.

## 5. Matériel et méthodes.

### 5.1. Matériel biologique.

#### 5.1.1 Souches bactériennes et plasmides.

##### 5.1.1.1 Souches bactériennes.

###### *Escherischia coli*

###### DH10B

La souche bactérienne DH10B de *E. coli* répond au phénotype suivant : F<sup>-</sup> *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ 80*dlac*Δ*lac*x74 *endA1 recA1 deoR* Δ(*ara, leu*)7697 *araD139 galU galK nupG rpsL* λ. Cette souche est utilisée pour la transformation par divers plasmides et produits de ligation.

###### S17 -1

La souche d' *E. coli* S17-1 est entre autre, résistante à la streptomycine (Sm<sup>R</sup>) et possède, intégré dans son chromosome bactérien, le plasmide RP4 qui encode différentes protéines indispensables au transfert d'ADN vers une bactérie receveuse. Cette souche est notamment utilisée pour le transfert d'ADN plasmidique à *Brucella*, par conjugaison.

###### *Brucella sp* :

Deux souches de *Brucella* ont été utilisées, la première est la souche *Brucella melitensis* 16M et la seconde est une souche *B. melitensis* 16M Nal<sup>R</sup>. *B. melitensis* 16M est une souche de phénotype lisse, l'agglutination se produit avec un anti-sérum M. Elle a été reçue de A. MacMillan et a été isolée sur le terrain en 1955. Cette souche a récemment été rendue résistante à l'acide nalidixique (Nal<sup>R</sup>) au laboratoire de biologie moléculaire, FUNDP.

###### Identification de *Brucella*.

###### a) 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 types bactériens au niveau de la couche de muréine. Après traitement au lugol et à l'éthanol, seules les bactéries à Gram positif gardent le

colorant. Une contre-coloration à la safranine permet de colorer les bactéries à Gram négatif en rouge.

- Déposer une goutte d'eau 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).
- Éliminer l'excès de colorant et couvrir de lugol (1 minute).
- 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 à Gram positif (elles restent colorées en bleu violet). Les bactéries perdant la coloration bleue sont dites à Gram négatif.

#### b) test d'agglutination

On peut distinguer deux types d'antigènes de surface dominant chez *Brucella*, on retrouve les antigènes A principalement présents chez *B. abortus* et les antigènes M grâce auxquels on peut détecter les souches *B. melitensis*.

Toutes les espèces de *Brucella sp.* ayant des antigènes de surface A réagissent au test d'agglutination avec un anti-sérum A. Les *Brucella sp.* dominantes en antigène M ne sont pas agglutinées par l'anti-sérum A.

- Une goutte de chaque sérum adéquatement dilué dans du NaCl 0,9% est placée sur une lame porte-objet.
- Amener avec une pipette boutonnée les *Brucella sp.* à tester, déposer les bactéries à proximité de la goutte de sérum.
- Homogénéiser doucement afin de ne pas surcharger en bactéries le sérum.
- Placer la lame dans une boîte de Pétri et après 5 minutes examiner au binoculaire pour visualiser l'agglutination.

#### 5.1.1.2 Plasmides.

##### Le pBBR1-GFP.

Le plasmide d'origine du pBBR1-GFP est le pBBR1MCS (Köhler, 1999).

Le pBBR1-GFP est porteur du gène de la  $\beta$ lactamase (*bla*) codant pour la résistance à l'ampicilline. Ce plasmide est aussi porteur de la cassette *gfpmut3* (la *gfp* dépourvue de son promoteur) codante pour la GFP (Green Fluorescent Protein) clonée dans ce plasmide, immédiatement en amont du gène *cat* (encodant pour la résistance au chloramphénicol).

Notons que ce plasmide est low copy (réplicatif à faible taux).

Ce plasmide est un outil biologique performant, étant donné que la présence de deux gènes rapporteurs (dépourvus de promoteurs) permet de sélectionner les bactéries recombinantes sur base de la résistance au chloramphénicol ou sur la fluorescence émise par la GFP.

De plus, la GFP permet d'étudier par des moyens simples, les conditions sous lesquelles s'expriment certains gènes (figure 5.1).

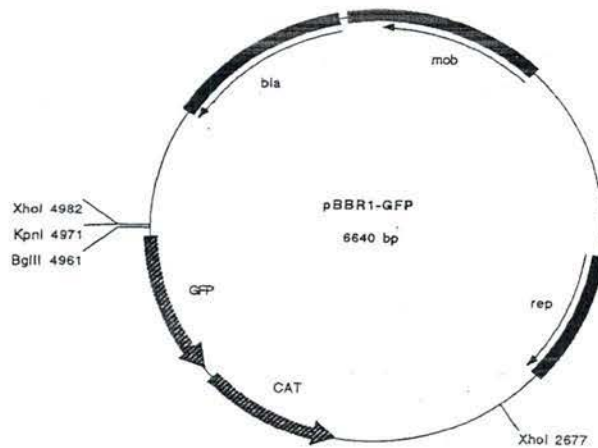


Fig 5.1 : Carte physique du pBBR1-GFP[Köhler, 1999 #132].

### Le pGEM-T Easy.

Ce plasmide est commercialisé par la firme Promega.

Il provient du pGem-5Zf(+) linéarisé en EcoRV au niveau du gène *lacZ* $\alpha$ , ce qui permet de détecter les plasmides recombinants grâce à un test blanc/bleu. Une thymidine a été ajoutée aux extrémités 3' permet d'éviter que le plasmide ne se referme sur lui-même et de liguer avec une grande efficacité un fragment PCR. En effet, l'enzyme ADN polymérase Biotools ajoute une base A aux extrémités 3' des fragments PCR.

C'est un plasmide à haut taux de réplication, d'une taille de 3015 pb, porteur du gène de résistance à l'ampicilline (*bla*) et du gène *lacZ* (figure 5.2).

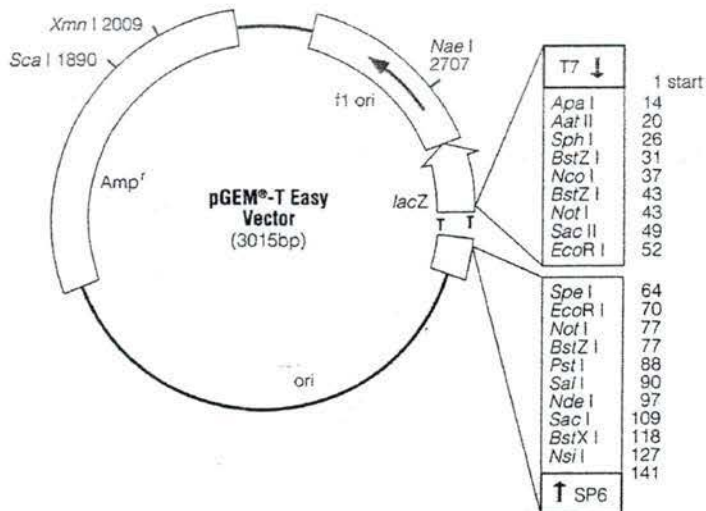


Figure 5.2 : Carte physique de pGEM-T Easy.

#### Test blanc/bleu :

Ce test permet de détecter facilement les bactéries DH10B portant un plasmide recombinant. En effet, les éléments génétiques portés par la souche DH10B ( $\_80dlacZ\_lacX74$ ) ne lui permettent pas d'avoir une activité  $\beta$ -galactosidase normale. Il peut néanmoins y avoir une complémentation intragénique avec un plasmide apportant *LacI* (fragment non opérationnel du gène de régulation de l'opéron lactose) et un fragment du gène *lacZ* (partie N-terminale de la  $\beta$ -galactosidase). Lorsque cette complémentation est effectuée, la bactérie possède une  $\beta$ -galactosidase fonctionnelle. Celle-ci est mise en évidence par son action sur le X-gal (20g/ml dilué 1000 fois dans le milieu) substrat chromogène donnant un composé bleu lorsqu'il est clivé. Quand le test est blanc, il met en évidence les bactéries présentant un plasmide qui contient un insert car celui-ci disrupte le gène *lacZ'*, la  $\beta$ -galactosidase n'est donc plus fonctionnelle. Quand le test est bleu, la  $\beta$ -galactosidase est fonctionnelle, le gène *lacZ'* n'est pas disrupté. L'IPTG, dans le milieu de culture, permettra l'expression de *lacZ*. Une des conditions pour appliquer ce test est d'utiliser des souches bactériennes qui au départ ne possèdent pas le gène *LacZ* fonctionnel.

#### Le pSKoriTKan.

Ce plasmide est un dérivé de pBluescript SK(-) dans lequel une origine de transfert conjugatif oriT a été clonée (Anne Tibor.) (Figure 5.3). Il porte une origine de répllication ColE1 non fonctionnelle chez *Brucella* ; c'est donc un plasmide non réplificatif chez cette bactérie. Il porte la cassette de résistance à la kanamycine (V. Haine, mémoire de licence 2000).

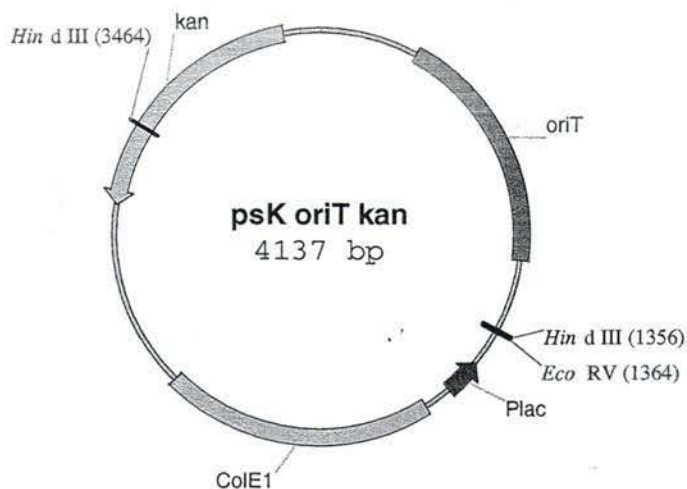


Figure 5.3 : Carte physique du pSKoriTKan.

## 5.1.2 Milieux de culture.

### 5.1.2.1 Milieux de culture pour *E. Coli* :

#### Milieu Luria Bertani (LB)

Forme liquide :	- Hydrolysate de caséine (peptone)	10 g/ L
	- NaCl	5 g/ L
	- Yeast extract	5 g/ L
Forme solide :	- Hydrolysate de caséine (peptone)	10 g/ L
	- NaCl	5 g/ L
	- Yeast extract	5 g/ L
	- Agar	20 g/l

### 5.1.2.2 Milieux de culture pour *Brucella* :

#### Milieu 2YT

Forme liquide :	- mix pour LB liquide	20 g/ L
	- Hydrolysate de caséine (peptone)	6 g/ L
	- Yeast extract	5 g/ L
Forme solide :	- mix pour LB agar	32 g/ L
	- Hydrolysate de caséine (peptone)	6 g/ L
	- Yeast extract	5 g/ L
	- Agar	1 g/ L

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

### Milieux minimums

Forme solide : - Préparer 500 ml de la composition suivante concentrée 5X :

- NaCl	7,5 g
- Dipotassium phosphate	10 g
- Thiosulfate de sodium	0,1 g
- Glycérol	30 g
- Acide lactique	5 g
- Acide L-glutamique	1,5 g
- Composé 1 (métaux)	1 ml
- Composé 2 (vitamines)	1ml
- Composé 3 (biotine)	1 ml

- Ajuster le pH à 6.8-7.0

- Stériliser le milieu par filtration

- Mélanger 100 ml de milieu avec 400 ml d'une solution d'agar (12 g)

stérilisé par autoclavage.

Composé 1 : - MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	8,330 g/100ml
- FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,050 g/100ml
- MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	0,040 g/100ml
- Ca pantothénate	0,004 g/100ml

Composé 2 : - Thiamine HCl	20 mg/100ml
- Acide nicotinamidique	20 mg/100ml

Composé 3 : -Biotine	0,01 mg/ml
----------------------	------------

### 5.1.2.3 Solutions et antibiotiques :

Noms et abréviations	Solution de dissolution	Concentration stock	Concentration finale
Acide nalidixique / Nal	NaOH 0,2N	25mg/ml	25µg/ml
Kanamycine / Kan	H <sub>2</sub> O	50mg/ml	50µg/ml
Ampicilline / Amp	H <sub>2</sub> O	50mg/ml	50µg/ml
Streptomycine/ Sm	H <sub>2</sub> O	10mg/ml	10µg/ml
Chloramphénicol / Cm	EtOH 100%	30mg/ml	10µg/ml
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside/ IPTG	H <sub>2</sub> O	1M	1mM
5-bromo,4-chloro,3-indolyl,β-D-galactoside/X-gal	N <sub>2</sub> N <sub>2</sub> diméthylformamide	2%	0,002%

#### 5.1.2.4 Milieux de culture des cellules eucaryotes.

##### Milieu RPMI 1640

Milieu synthétique (RPMI 1640+25mM Hepes buffer + L-glutamine) pour la culture de cellules eucaryotes commercialisé par Invitrogen life technologies. Nous y ajoutons 10% de Fœtal Calf Serum (FCS) décomplémenté (30 minutes à 56°C).

## **5.2. Méthodes.**

### 5.2.1 Tehniques relatives à l'ADN.

#### 5.2.1.1 Préparation de cellules électrocompétentes.

L'électroporation est une méthode qui permet de faire entrer de l'ADN exogène dans une souche bactérienne ( dans notre cas les DH10B) suite à un choc électrique.

##### *Mode opératoire :*

Jour -1 :

- Lancer dans 5 ml de milieu LB (avec l'antibiotique adéquat) une colonie bactérienne et la laisser une nuit à 37°C à agitation forte.

Jour 0 :

- Diluer 100 fois la préculture dans 100 ml de LB frais additionné de l'antibiotique.
- Mettre sous agitation à 37°C et laisser incuber jusqu'à obtenir une D.O. entre 0,4 et 0,6 à 600 nm.
- Transférer la culture dans deux falcons stériles préalablement refroidis sur glace et arrêter la croissance bactérienne en laissant sur glace 15 minutes.
- Centrifuger 15 minutes à 4000 rpm à 4°C.
- Enlever le surnageant et resuspendre le culot dans 50ml d'eau stérile à 4°C.
- Centrifuger 15 minutes à 4000 rpm à 4°C.
- Enlever le surnageant et resuspendre le culot dans 50 ml d'eau stérile à 4°C.
- Centrifuger 15 minutes à 4000 rpm à 4°C.
- Enlever le surnageant.
- Resuspendre dans 4 ml d'eau avec glycérol (10%) à 4°C.
- Centrifuger 15 minutes à 4000 rpm à 4°C.
- Retirer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 2ml d'eau avec glycérol (10 %) à 4°C.
- Aliquoter la solution et passer les échantillons à l'azote liquide.
- Conserver à -80°C.

#### 5.2.1.2 Préparation de cellules CaCl<sub>2</sub> compétentes.

Les cellules DH10B sont traitées avec une solution de CaCl<sub>2</sub> 60mM + glycérol 15% froid afin de fragiliser la membrane plasmique.

- Lancer une préculture:ensemencer 20 ml de LB avec une colonie de cellules DH10B et laisser incuber une nuit à 37°C sous agitation.
- Le matin, inoculer 400 ml de LB avec 20 ml de la préculture et incuber à 37°C sous agitation jusqu'à atteindre une DO à 600nm de 0,3 à 0,4.
- Laisser la culture 10 minutes sur glace.
- Centrifuger 10 minutes à 3000 rpm afin de culoter les cellules. Eliminer le surnageant.

- Resuspendre les bactéries culotées dans 80ml final de CaCl<sub>2</sub> 60mM + glycérol 15% stérile et froid.
- Centrifuger pendant 5 minutes à 2500 rpm. Eliminer le surnageant.
- Resuspendre les cellules dans 90ml final de CaCl<sub>2</sub> 60 mM + glycérol 15% froid.
- Laisser 30 minutes sur glace.
- Centrifuger pendant 5 minutes à 2500 rpm.
- Resuspendre dans 16 ml final de CaCl<sub>2</sub>+glycérol 15%.
- Aliquoter en 0.2 ml et 0,4ml et stocker à -80°C.

### 5.2.1.3 Transformation de cellules compétentes.

#### Transformation des cellules électrocompétentes.

- Laisser dégeler les cellules électrocompétentes sur glace.
- Placer dans un eppendorf stérile froid 100 µl de cellules électrocompétentes et ajouter l'ADN plasmidique ou le mélange de ligation.
- Pipeter pour mélanger et placer le mélange 1 minute sur glace.
- Transférer dans la cuvette d'électroporation, refroidie sur glace, le contenu de l'eppendorf.
- Placer la cuvette dans l'électroporateur (BIO RAD Gene Pulser™).
- Régler l'appareil sur : capacitance 25 µF  
résistance 200 Ω  
différence de potentiel 22,5 Kv/cm
- Décharger le condensateur (choc électrique).
- Ajouter rapidement 1 ml de 2YT.
- Transférer dans un eppendorf et laisser 30 minutes à 37°C.
- Etaler sur milieu sélectif et laisser pousser une nuit à 37°C.

#### Electroporation de *Brucella*.

Jour -2 : Ensemencer une colonie de *Brucella* dans 5 à 10ml de 2YT (avec ampicilline) et laisser une nuit sous agitation dans l'étuve à 37°C

Jour -1 : Reprendre 1 ml de préculture que l'on ajoute à 50ml dans 2YT dans un erlen à contrepales et mettre à l'étuve sous agitation à 37 c°.

Jour 0 : - Culotter la culture bactérienne en falcon.

- Resuspendre le culot dans l'eau distillée stérile à 4 °C.
- Centrifuger 10 minutes à 4000 rpm à 4°C.
- Répéter cette opération de lavage 3 fois.
- Resuspendre le culot final dans 200 µl d'eau distillée stérile à 4 °C.
- Utiliser ces 200 µl de Brucelles pour l'électroporation suivant le même mode opératoire que celui décrit précédemment. Il est à noter cependant, que les Brucelles après électroporation, doivent pouvoir récupérer de 3 à 12 heures dans une étuve à 37 °C et sous agitation constante.

### Transformation de cellules CaCl<sub>2</sub> compétentes.

Le but de la transformation est de faire pénétrer de l'ADN exogène plasmidique à l'intérieur d'une bactérie ( *E. Coli* DH 10B ) grâce à un lavage avec une solution de CaCl<sub>2</sub> qui perméabilise et fragilise la paroi bactérienne (figure 5.4).

#### *Mode opératoire :*

- Ajouter 1 à 10 µl de la solution contenant le plasmide (mélange de ligation, ADN préparé, mélange de mutagenèse, etc.) à 50 µl de cellules compétentes de la souche désirée.
- Laisser sur glace environ 30 minutes.
- Ajouter de 1 à 10 µl de la solution contenant le plasmide à 50µl de cellules compétentes de la souche désirée.
- Laisser sur glace pendant environ 30 minutes.
- Procéder à un choc thermique : plonger les cellules dans un bain à 42°C durant une minute et les remettre dans la glace.
- Ajouter 0,5ml de milieu LB.
- Incuber au moins 20 minutes à 37°C.
- Etaler de 200 µl de cellules sur LB sélectif.

#### Témoin de transformation

- Un témoin de compétence. Des cellules compétentes transformées avec une quantité précise d'un plasmide non restreint sont étalées sur milieu sélectif.
- Un témoin de viabilité des cellules compétentes: des cellules compétentes après transformation « à vide » (sans le plasmide), sont étalées sur milieu LB.

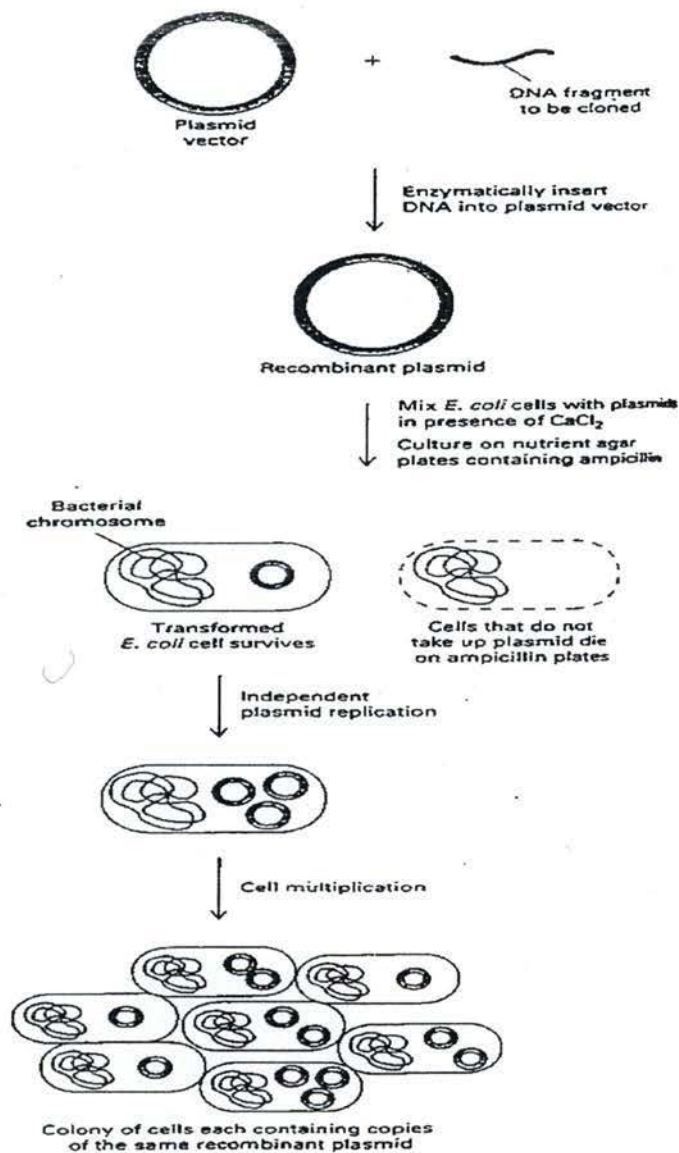


Figure 5.4 : Schéma représentatif du principe de la transformation bactérienne.

#### 5.2.1.4 Conjugaison bactérienne.

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 à un site d'origine de transfert reconnu par la machinerie de transfert sur le plasmide conjugatif.

Les plasmides transférés lors de ce travail est le pSKOriTKan. Les contrôles de résistance antibiotique utilisés sont les suivants : les bactéries donneuses (*E. coli*) sont étalées sur un

milieu sélectif contenant de l'acide nalidixique et les *Brucella* (Nal<sup>R</sup>) receveuses sont étalées sur un milieu additionné de l'antibiotique à laquelle résiste les *E. coli* donneuses (dans ce cas-ci, la kanamycine) (figure 5.5).

#### Mode opératoire

- Préparer une préculture d'*E. coli* S17-1 (RP4<sup>+</sup>) donneuses contenant le plasmide à transférer dans du LB + antibiotique, ainsi qu'une culture de *Brucella* receveuse (Nal<sup>R</sup>).
- 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 dans du milieu sans antibiotique le culot bactérien dans 1/10 du volume de la culture de départ.
- Placer un filtre stérile 0,22 µm de 42 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 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 2YT.
- Etaler sur un milieu 2YT sélectif.
- Incuber 3-4 jours à 37°C et repiquer les clones obtenus sur milieu 2YT sélectif.

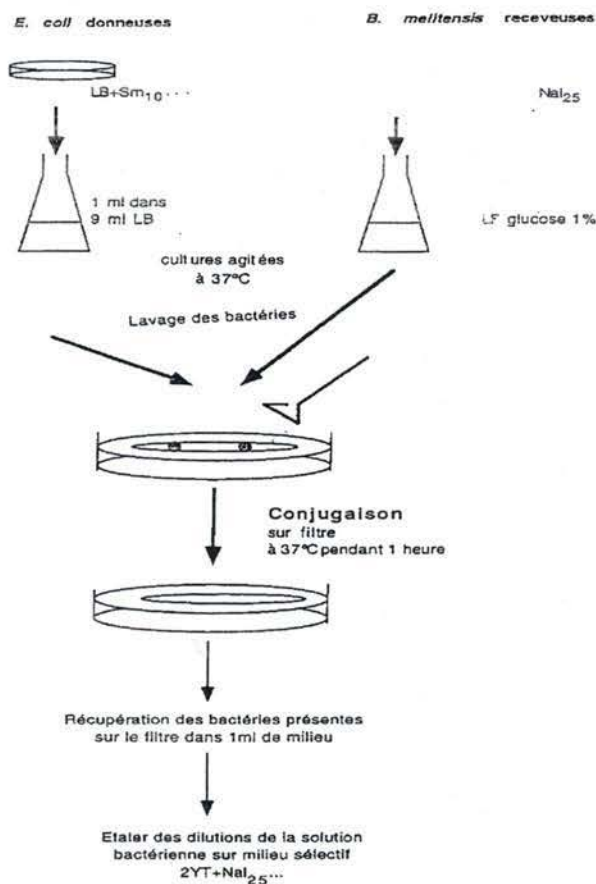


Figure 5.5 : Principe de la conjugaison.

### 5.2.1.5 Extraction de l'ADN plasmidique.

Ces techniques permettent d'isoler et de purifier les plasmides produits par les bactéries. La préparation d'ADN plasmidique se déroule en 5 étapes : la lyse alcaline des bactéries, l'élimination des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, le lavage de l'ADN et enfin sa resuspension.

#### Minipréparation d'ADN plasmidique d'*E. Coli*.

Jour -1 :

- Ensemencer 5 ml de milieu LB liquide (+ antibiotiques) avec une colonie isolée.

b) Incuber la culture liquide à 37°C sous forte agitation pendant une nuit

Jour 0 :

- Centrifuger 1,5ml de la culture liquide dans un eppendorf à une vitesse de 14000 rpm pendant 5 minutes. Ensuite éliminer le surnageant.

- Resuspendre le culot cellulaire dans 300 µl de S1.

- Ajouter 300 µl de S2 pour lyser les bactéries. Mélanger doucement en inversant 10X, incubé 5 minutes à température ambiante.

- Ajouter 300 µl de S3 et mélanger doucement en inversant, incubé 5 minutes sur glace.

- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 14000 rpm et récupérer le surnageant.

- Précipiter l'ADN en ajoutant 0,6 volume d'isopropanol. Vortexer.

- Laisser 20 minutes à température ambiante.

- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 14000 rpm. Eliminer le surnageant.

- Ajouter 1ml d'éthanol 70% froid pour le lavage (afin d'éliminer les résidus d'isopropanol)

- Centrifuger 10 minutes à 14000 rpm. Eliminer prudemment le surnageant.
- Sécher le culot 30 minutes à 37°C.
- Resuspendre dans 30µl d'H<sub>2</sub>O distillée stérile avec 1µl d'RNAase.
- Stocker à -20°C.

*-composition des tampons utilisés :*

- \*S1(tampon de lyse) : 50mM Tris-Hcl, 10mM EDTA, RNAse A 100 µg /ml, pH8,0 (sauf si on l'additionne à l'eau de la minipréparation). Se conserve à 4°C.
- \*S2 (tampon de lyse): 200mM NaOH, 1% SDS . Se conserve à t° ambiante.
- \*S3(tampon de précipitation des protéines) : 3M KAc, pH=4. A conserver à 4°C.

Midipréparation d'ADN plasmidique d'*E. Coli*.

Cette technique nécessite l'emploi du kit Nucleobond AX100. Le kit comprend une colonne échangeuse d'anions grâce à laquelle on récupère de l'ADN plasmidique dépourvu de contaminants tels que les protéines, l'ARN et l'ADN génomique,...

*Mode opératoire :*

Jour -1 : Ensemencer 5 ml de milieu LB avec antibiotique adéquat avec une colonie bactérienne.

Jour 0 :

- Ensemencer 100ml de milieu LB liquide ( + antibiotiques) dans un erlen de 500ml avec 1ml de préculture bactérienne.
- Incuber la culture liquide une matinée à 37°C sous forte agitation.
- Centrifuger la culture pendant 10 minutes à 4000 rpm. Eliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 4ml de S1.
- Ajouter 4ml de S2 et mélanger doucement en inversant.
- Laisser incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 4ml de S3, mélanger par retournements, laisser 5 minutes sur glace.
- Equilibrer une colonne NUCLEOBOND AX100 avec 2,5 ml de N2.
- Déposer le surnageant sur la colonne équilibrée, l'ADN s'accroche à la résine.
- Laver la colonne 2 fois avec 5ml de N3.
- Eluer l'ADN avec 5ml de N5 afin de décrocher les plasmides de la colonne. Répéter l'opération.
- L'éluat est récupéré et est réparti dans des eppendorfs de 1ml.
- Ajouter 0,6 volume d'isopropanol tout en mélangeant pour précipiter l'ADN.
- Centrifuger à 14000 rpm à 4°C pendant 30 minutes.
- Ajouter 1ml d'éthanol 70% froid par eppendorfs.
- Centrifuger 5 minutes à 14000 rpm.
- Eliminer l'éthanol et sécher le culot.
- Resuspendre l'ADN contenu dans chaque eppendorfs dans 20 µl d'eau distillée stérile.
- Ensuite tout remettre dans un même eppendorf.
- Conserver à -20°C.

#### 5.2.1.6 Extraction d'ADN génomique de *Brucella sp.*

##### *Mode opératoire*

- En utilisant une anse, prélever des bactéries sur milieu solide et les resuspendre dans 567 µl de TENa (en eppendorf).
- Ajouter 30 µl de SDS 10% et 3 µl de protéinase K à 20 mg/ml.
- Homogénéiser en inversant doucement l'eppendorf et incubé à 37°C pendant 1 heure.
- Ajouter 600 µl de phénol saturé en tampon TENa, et agiter fortement l'eppendorf.
- Centrifuger 20 minutes à 4 °C à 13500 rpm.
- Récupérer la phase aqueuse supérieure sans emporter le voile à l'interface.
- Ajouter 80 µl de NaClO<sub>4</sub> 5M et 600 µl de chloroforme, agiter fortement.
- Centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 13500 rpm.
- Récupérer la phase aqueuse et ajouter 1 ml d'éthanol 100% (à -20°C).
- Mélanger en inversant l'eppendorf.
- Centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 13500 rpm.
- Eliminer le surnageant et ajouter 1 ml d'éthanol 70% (à -20°C).
- Centrifuger 10 minutes à 13500 rpm et éliminer le surnageant.
- Sécher sous vide et resuspendre dans 100 µl d'eau distillée stérile.
- Pour faciliter la resuspension, incubé l'eppendorf à 37°C.

#### 5.2.1.7 Purification de l'ADN.

##### Précipitation au phénol-chloroforme.

Le phénol-chloroforme permet d'extraire les protéines d'une solution d'ADN. Par cette méthode les protéines dénaturées après l'ajout de la solution se situent à l'interface entre la phase organique et la phase aqueuse.

##### *Mode opératoire :*

- Porter le volume de la solution à 200µl avec de l'eau bidistillée.
- Ajouter un volume de solution phénol saturée en chloroforme (soit la phase inférieure).
- Vortexer.
- Centrifuger 15 minutes à 14000 rpm à 4°C.
- Prélever la phase aqueuse ( phase supérieure) en veillant à ne prendre les protéines de l'interface.
- Précipiter l'ADN à l'éthanol.

#### 5.2.1.8 Restriction de l'ADN plasmidique.

Le clivage de l'ADN bicaténaire à des sites précis s'effectue par l'emploi d'endonucléases de restriction capables de reconnaître de courtes séquences souvent palindromiques.

##### *Mode opératoire :*

- Mettre la quantité d'ADN à restreindre.
- Ajouter le tampon(10X) adapté à l'enzyme dans une quantité correspondante à 1/10 du volume final.

- L'enzyme de restriction sera au maximum un dixième du volume final. Entre 2 à 10 unités d'enzyme par  $\mu\text{g}$  d'ADN.
- Amener au volume final avec de l'eau distillée.
- Incuber le mélange de restriction durant un temps et à une température optimale pour l'activité de l'enzyme (souvent une heure à  $37^\circ\text{C}$ ).

### 5.2.1.9 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 l'Hyper-Ladder (Bioline) et le SmartLadder commercialisé par Eurogentec (figure 5.6).

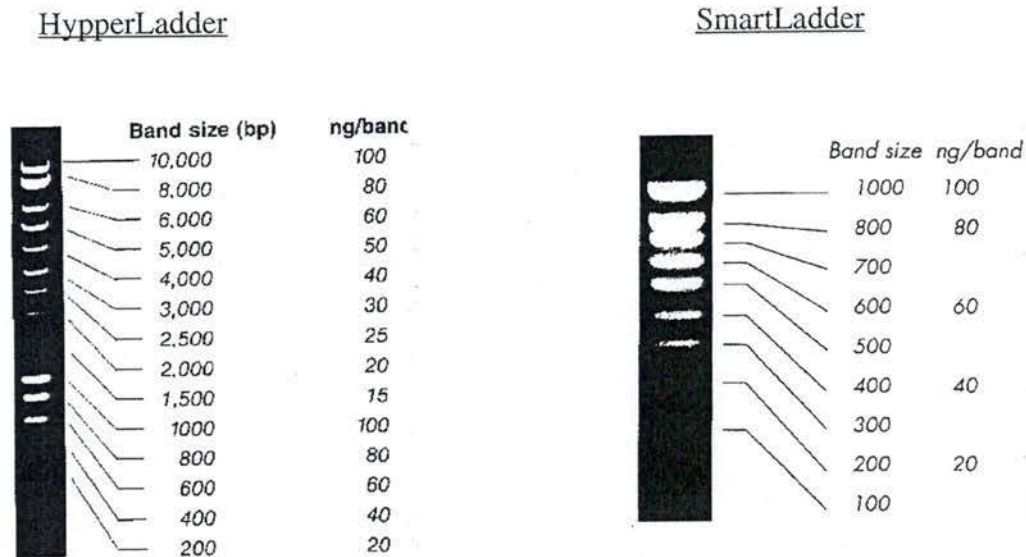


Figure 5.6 : Représentation des marqueurs de poids moléculaire.

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

#### Mode opératoire :

- Immerger le gel dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon TAE (dilué 50X), auquel on a ajouté quelques  $\mu\text{l}$  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.
- Visualiser le gel sous UV (transilluminateur longueur d'onde à 302 nm).

*-Solutions, tampons et matériel*

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

5.2.1.10 Extraction d'ADN sur gel et purification.

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

*Mode opératoire :*

- Exciser le fragment d'intérêt du gel à l'aide d'un scalpel. Peser le morceau d'agar
- Ajouter 3 volumes de *Binding solution* pour un volume de gel.
- Incuber 10 minutes à 55°C pour dissoudre l'agarose.
- Passer la solution de silice du kit au vortex pour bien resuspendre les billes de silice.
- Ajouter 2 µl de cette solution de silice par µg d'ADN.
- Passer au vortex.
- Incuber 10 minutes à 55°C.
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.
- Retirer le surnageant.
- Ajouter au culot 500 µl de solution de lavage du kit. Resuspendre au vortex.
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.
- Répéter 3 fois l'opération.
- Resuspendre le culot dans 20 µl d'eau stérile.
- Incuber à 55°C pendant 10 minutes.
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.
- Récupérer le surnageant.
- Conserver à - 20°C.

5.2.1.11 Réaction de ligation.

*Protocole classique.*

Pour lier de manière covalente deux fragments d'ADN, on utilise l'ADN ligase du phage T4 (Boehringer, 1U/µl). Elle catalyse la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyl 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' d'une extrémité proche. Pour être active, l'enzyme nécessite la présence d'ATP et d'ions Mg<sup>2+</sup>.

*Mode opératoire :*

- Mélanger dans un tube Eppendorf les fragments d'ADN à liguer dans un rapport de 3 à 5 inserts par vecteur.
- Ajouter 1/10<sup>ème</sup> 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 un minimum 3 heures à température ambiante pour des extrémités à bouts francs.

Protocole pour le pGEM-TEasy (Promega).

La ligation utilisant le vecteur pGEM-T Easy (promega) ne nécessite pas d'incubation d'une nuit à 16°C.

Le mix de ligation contient : - 3µl de produit PCR.

- 5µl de tampon.

- 1µl de ligase.

Monter le volume à 20 µl et laisser incuber 2 heures à température ambiante.

5.2.1.12 Amplification de l'ADN.

L'amplification d'un fragment d'ADN est réalisée au cours d'une réaction de polymérisation connue sous le nom PCR (Polymerase Chain Reaction).

Des amorces nucléotidiques d'environ 20 bases complémentaires de la séquence situées de part et d'autre de la région cible viendront chacune s'hybrider sur un des deux brins.

La longueur de la séquence à amplifier est définie par la distance séparant les deux amorces.

Une ADN polymérase thermostable est utilisée pour synthétiser un brin d'ADN à partir de l'extrémité 3'OH de chacune des amorces (figure 5.7).

PCR classique:

Cycles PCR :

Un cycle PCR est constitué généralement de 3 étapes :

- 1) la première étape est la dénaturation où la température atteint 95°C permettant de séparer les deux brins d'ADN.
- 2) l'hybridation des amorces s'effectue à une température définie en fonction des températures de melting des amorces utilisées. Cette température se situe souvent entre 50-72°C.
- 3) l'élongation à 72°C permet la polymérisation des brins.

Ce cycle est répété une trentaine de fois permet d'augmenter de façon exponentielle le nombre de copies de la séquence que l'on veut amplifier.

Souvent à la fin des cycles on ajoute une étape de 10 minutes à 72°C pour inactiver totalement la polymérase.

La température d'hybridation utilisée est inférieure à la température de melting  $T_m$  des amorces. Le  $T_m$  se calcule par la formule suivante :  $T_m = 4(C+G) + 2(A+T)$ . Les amorces devront contenir le même pourcentage en G-C que l'ADN cible.

Pour éviter au maximum les amplifications non spécifiques l'amorce doit contenir un excès en G-C à son extrémité et au centre. De plus, il faut que les 2 à 3 dernières bases de l'extrémité 3' soient des A/T, de manière à rendre l'ADN plus accessible à la polymérase puisque ces bases ne forment que deux ponts hydrogènes au lieu de 3 ce qui rend la liaison moins forte.

Mix pour PCR :

- Mettre 1µl de primer amont et 1µl de primer aval ( à une concentration de 100mM).
- Ajouter 2µl de dNTP 10mM.
- 1 µl d'enzyme (2 U /µl ).
- Ajouter 2µl d'ADN (500 ng).
- Porter à 50 µl avec de l'eau distillée stérile.
- Après les cycles PCR déposer 1/10<sup>o</sup> du volume sur gel d'agarose et conserver le reste à -20°C.

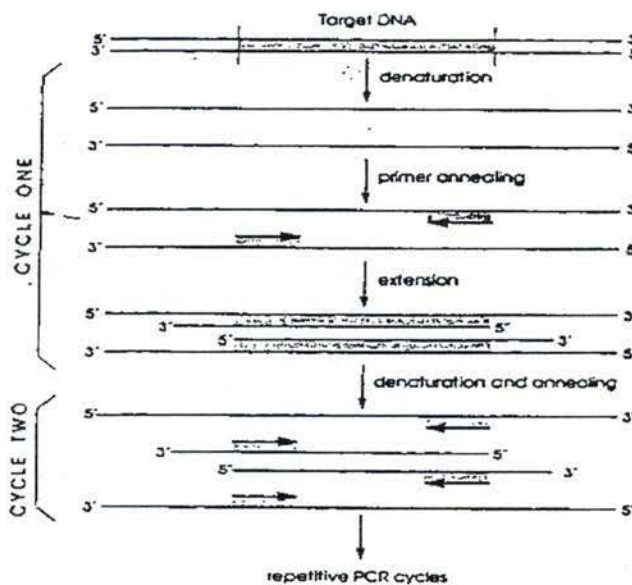


Figure 5.7 :Schéma de l'amplification d'un gène par PCR.

PCR sur colonies :

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

Les séquences employés au cours de ce travail sont données dans le point suivant :

#### Séquences de mocC

primer amont+*KpnI*: ggtaccAAGCACTGGCCGCACATGCC  
primer aval+*BglIII*: agatctCCTCGCGCGCGAAAGCCTT

#### Séquences de mosA

primer amont + *KpnI*:ggtacc GCGACGATTGGGCAAGTGAA  
primer aval +*Bgl II*:agatct CAGATAGACGGGACCCCACG

#### Séquences de mosC

primer aval+*BglIII*: agatctCCCTCAGTTGCGGTCCGCTG  
primer amont+*KpnI*: ggtaccCGCCGGTTTATTTCTACGGCC

#### Séquences rpiR

primer aval+*BglIII*: agatctCCTCCCGGAAGCGGTCATCC  
primer amont+*KpnI*: ggtaccCTACCTGCCGCTGTTTCACGC

#### Séquences de mocA

primer aval+*BglIII*: agatctCCTCCCGGAAGCGGTCATCC  
primer amont+*KpnI*: ggtaccCTACCTGCCGCTGTTTCACGC

#### Séquences de ctrA

primer aval+*Bgl II* : agatct GTCCCTCACGGCAGCACACG  
primer amont+ *KpnI* : ggtaccAAATCTCCTCGCGATTCCAG

#### 5.2.1.13 Séquençage.

Le principe est une amplification d'ADN par PCR avec assimilation de didéoxyribonucléotides marqués à la fluorescéine. Chacun de ces nucléotides possède son marquage propre (sa longueur d'onde d'émission), ce qui rend possible la lecture à partir d'une seule réaction PCR. Ce type de réaction permet par la suite l'utilisation d'un séquenceur automatique.

La réaction de PCR de séquençage est basé sur le principe de Sanger (1977).

L'incorporation des didéoxyribonucléotides arrête la réaction de polymérisation ce qui permet d'obtenir un population de brins tronqués représentant la séquence d'ADN

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

La concentration en ADN matrice doit être de 1 à 100 ng pour un produit PCR et de 200 à 500 ng pour de l'ADN plasmidique. Lorsqu'on utilise un produit PCR, une purification préalable est nécessaire, elle permet d'éliminer les amorces et les nucléotides susceptibles d'interagir avec la réaction de séquençage. La quantité d'amorce doit être de 3.2 pM

Les produits PCR sont séparés suivant leurs tailles par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée. Le résultat du gel sera détecté par un système optique relié à un ordinateur.

#### 5.2.1.14 Analyse par Southern blot.

Le Southern blot est une technique d'identification et de localisation de séquences spécifiques d'ADN (figure 5.8). Elle tire parti de la propriété qu'a l'ADN de former des structures en duplex stables, stabilité en relation directe avec la complémentarité des deux brins d'ADN. Le

procédé utilise des sondes d'ADN marquées qui vont s'hybrider avec les séquences d'intérêts.

Dans cette méthode, l'ADN est digéré par une enzyme de restriction et les fragments d'ADN bicaténaires sont séparés par une électrophorèse en gel d'agarose de façon à séparer les fragments selon la taille. Les fragments d'ADN sont visualisés grâce aux UV et dénaturés par incubation du gel dans une solution de dénaturation d'hydroxide de sodium. Le gel est ensuite immergé dans un bain de neutralisation. Les fragments d'ADN sont transférés sur une membrane de nylon dans une solution de haute concentration alcaline grâce à un transfert effectué par capillarité, on obtient donc une réplique du gel sur le film. L'ADN est ensuite fixé de manière covalente à la membrane de nylon par chaleur et par exposition aux UV.

L'hybridation de la sonde d'acide nucléique radiomarquée à l'ADN dénaturé et restreint fixé sur la membrane de nylon s'effectue dans des conditions de stringence données, après élimination par lavage de l'excès de sonde non fixée à la membrane.

La sonde hybridée au fragment d'ADN recherché est décelée par autoradiographie de la membrane. La position à laquelle s'est effectué l'hybridation spécifique de la sonde est donnée par un marqueur de taille.

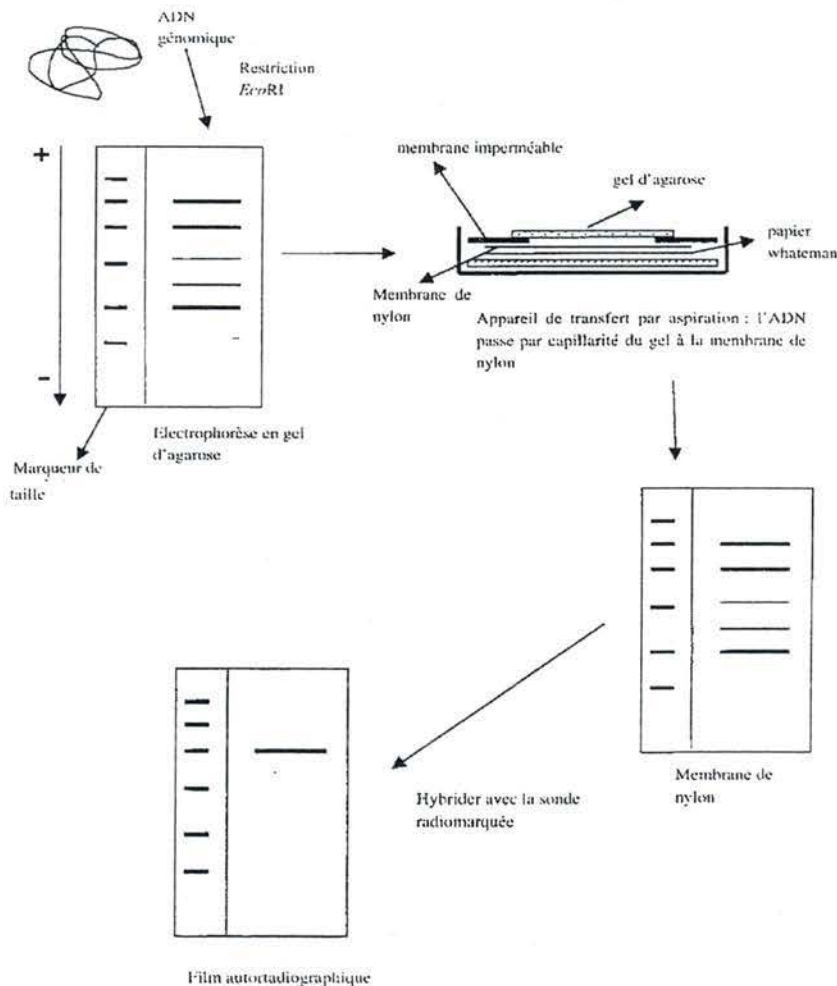


Figure 5.8 : Principe du Southern blot.

### Restriction de l'ADN génomique

Les préparations d'ADN génomique sont complètement restreintes par l'endonucléase de restriction appropriée. Les enzymes utilisées ici sont *HindIII* (40 U/  $\mu$ l), *EcoRI* (40 U/  $\mu$ l) (Roche).

#### *Mode opératoire*

- Prendre 6  $\mu$ l d'ADN génomique resuspendu dans de l'eau distillée.
- Ajouter 1.5  $\mu$ l d'enzyme concentrée (*HindIII* et *EcoRI*).
- Ajouter 3  $\mu$ l de tampon de restriction 10x associé à l'enzyme.
- Mettre à un volume de 30  $\mu$ l avec de l'eau distillée stérile.
- Incuber une nuit à 37 °C.

### Electrophorèse en gel d'agarose

La séparation des fragments d'ADN restreint est réalisée dans un gel d'agarose de 0,8 %. Le marqueur de taille HyperLadder (Biolone) est utilisé pour évaluer la taille des fragments de restriction.

### Transfert et immobilisation

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

#### *Mode opératoire :*

- Après l'électrophorèse, placer le gel d'agarose sous UV (302 nm) pendant 3 à 5 minutes. Les UV clivent l'ADN et facilitent ainsi le transfert.
- Immerger le gel dans la solution de neutralisation pendant 2x 20 minutes, sous faible agitation.
- Découper un morceau de membrane de nylon (Porablot NY membrane) chargée positivement de taille un peu supérieure à celle du gel.
- Par un montage de transfert, l'ADN est transféré sur la membrane en présence de SSC 20X overnight.
- Après le transfert, sécher la membrane entre deux feuilles de papier Whatman 3 MM.
- Incuber la membrane à 80 °C pendant 120 min et immobiliser l'ADN sur la membrane, en l'exposant aux UV pendant 5 secondes.

#### *Solutions :*

- \* Solution de dénaturation : - NaCl 1 M  
- NaOH 0.5 M
- \* Solution de neutralisation : - NaCl 1.5 M  
- Tris HCl 0.5 M pH 7.2

- EDTA 1 mM
- \* SSC 20X : - NaCl 3 M
- Na<sub>3</sub> citrate 0.3 M

### Préhybridation

La membrane est immergée dans une solution de préhybridation pendant 30 minutes à 65°C. Ceci permet de réduire le bruit de fond en hybridant de manière non-spécifique la membrane avec de l'ADN non marqué de thymus de veau.

*Solution de préhybridation :*

- |                             |         |
|-----------------------------|---------|
| - Denhard 50X               | 5 ml    |
| - SSC 20X                   | 12.5 ml |
| - SDS 10 %                  | 0.5 ml  |
| - ADN de thymus 100 µg / ml | 3.3 ml  |
| - H <sub>2</sub> O          | 28.7 ml |

L'ADN de thymus de veau est dénaturé dans de l'eau bouillante pendant 10 min. et incubé sur glace.

### Marquage de la sonde et hybridation

Le fragment d'ADN utilisé comme sonde est dénaturé et mis en présence de primers aléatoires. Une synthèse d'ADN est initiée par la polymérase Klenow, en incorporant des nucléotides dont le dCTP est marqué radioactivement au P<sub>32</sub>.

La sonde est réalisée en utilisant le kit Rad prime label system de Invitrogen et les α<sup>32</sup>P dCTP (10 mCi/ ml, 3000 Ci/ mmol) de Amersham Pharmacia Biotech.

### *Mode opératoire*

- Porter environ 25 µg d'ADN sonde à un volume finale de 10 µl avec de l'eau stérile.
- Faire bouillir pendant 5 min., faire un quick spin et ensuite conserver sur glace.
- Ajouter 1 µl de dATP, dGTP, dTTP et 20 µl de random primers (solution 2.5x).
- Ajouter 5 µl de dCTP marqué au P<sub>32</sub> et ajouter 11 µl d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mélanger.
- Ajouter 1 µl de klenow et faire un quick spin.
- Incuber 10 min. à 37 °C.

La membrane est incubée avec la sonde dans la solution de préhybridation, pendant une nuit, à 65 °C.

### Détection et révélation

Après hybridation, le mélange préhybridation-sonde peut être récupéré et conservé à -20 °C pour être réutilisé. La membrane est lavée deux fois, pendant 10 minutes, avec du SSC 20X SDS 0.1 %.

La membrane est ensuite placée, sous farde plastique, dans une cassette avec un film autoradiographique. La cassette est maintenue à -80 °C pendant au moins cinq heures. Ensuite, le film autoradiographique est immergé dans une solution de révélation pendant 10-15 secondes. Quand les bandes sont révélées, le film est rincé dans de l'eau, puis trempé dans une solution de fixation.

## 5.2.2 Manipulations relatives à l'émission de fluorescence.

### 5.2.2.1 Solutions et matériel.

#### Préparation des macrophages.

- Eliminer le milieu de culture RPMI+FCS10% .
- Détacher le tapis cellulaire en ajoutant 7ml de trypsine diluée 3 fois dans du PBS stérile.
- Laisser agir 5 à 10 minutes à 37°C.
- Stopper la réaction en ajoutant du milieu additionné de FCS.
- Centrifuger à 1000 rpm pendant 10 minutes.
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot cellulaire dans 1ml de RPMI+FCS10%.
- Effectuer un comptage du nombre de cellules grâce à une cellule de Thomas.
- Diluer la suspension cellulaire de façon à obtenir  $2.10^4$  bactéries /100 $\mu$ l
- 100 $\mu$ l de cette dilution soit  $2 \times 10^4$  cellules, sont déposés dans chacun des puits d'une plaque multipuits (Nucleon).

#### Préparations des solutions.

##### *\*Solution de paraformaldéhyde 3% (PFA) :*

- Faire chauffer 80 ml de PBS puis y ajouter 3g de paraformaldéhyde sous hotte.
- Chauffer jusqu'à dissolution puis ajouter 100  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  100mM et 100 $\mu$ l de  $\text{MgCl}_2$  100mM.
- Laisser refroidir
- Mettre à pH 7,4 et ajuster le volume à 100 ml avec du PBS.
- Aliquotter par 5ml et stocker à -20°C. Une fois décongelé, la solution de paraformaldéhyde ne peut pas être recongelée.

##### *\*Solution de PBS (1X concentré) :*

- 8g de NaCl
- 0,2g de KCl
- 1,44g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 0,24g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

- Monter le volume à 800ml avec de l'eau milliQ.
- Mettre à pH=7,4.
- Ajuster le volume à 1litre, si besoin autoclaver.

##### *\*Solution-BSA-Triton (100ml) :*

- Dissoudre 2g de BSA dans 100ml de PBS(1X).
- Ajouter 100 $\mu$ l de solution de triton 0,1% (100X).

### 5.2.2.2 Préparation des doses infectantes.

#### Quantification de la dose infectante

- La solution bactérienne utilisée pour l'infection est diluée de 10 en 10 et déposée sur milieu 2YT agar.
- Incuber à 37°C pendant 3-4 jours.
- Dénombrer les CFU (colony forming unit).

### Détermination de la dose infectante.

Cette manipulation sert à déterminer le nombre de bactéries capables d'infecter les macrophages. Pour cela, on effectue en parallèle à la cinétique d'infection des macrophages fixés sur coverslips une infection des macrophages non fixés qui seront lysés afin de libérer et dénombrer les bactéries intracellulaires.

Chacun des mutants testés est réalisé en duplicat.

Déposer 100µl de la dilution de la culture bactérienne (qui a servi à la cinétique d'infection des macrophages sur coverslips) dans la plaque multipuits.

- Laisser une heure d'incubation à l'étuve 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C.
- Ajouter la gentamycine diluée 1000X dans le RPMI.
- Procéder à la lyse cellulaire après un temps d'incubation déterminé en fonction des points choisis lors de l'infection cellulaire.

- Lyse cellulaire :-laver les puits contenant les macrophages avec 100µl de PBS(1X)
  - répéter l'opération 5X.
  - ajouter 100µl de PBS-Triton (triton est un détergent qui permet de lyser les cellules).
  - incuber 1 minute à 37°C.
  - resuspendre les macrophages dans cette solution.

- Ensuite on procède aux différentes dilutions des doses infectantes, les dilutions se font de 10 en 10 dans une solution de PBS (1X) jusqu'à une dilution de 10<sup>-6</sup>.
- Etaler 20µl de chacune de ces dilutions ( 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-6</sup>) sur un milieu 2YT.
- Incuber les boîtes sur lesquelles sont étalées les dilutions de 3 à 4 jours dans l'étuve à 37°C.
- Compter le nombre de CFU pour chaque dilution et chaque mutant.

### 5.2.2.3 Infection de macrophages.

Les macrophages sont infectés avec une dose infectante de *Brucella* comprenant au minimum 2,6.10<sup>8</sup> bactéries par ml.

#### *Mode opératoire :*

Jour-1 :Lancer une culture à partir d'une colonie de *Brucella* dans un volume de 2YT compris entre 5 à 10ml.

Jour 0 :

- Prendre les D.O de chaque culture à une longueur d'onde de 660nm.  
Souvent on travaille avec une valeur de D.O approximant 1 soit 2.10<sup>9</sup> bactéries.
- Diluer les cultures de sorte d'obtenir des valeurs de D.O équivalentes ( si possible une D.O de 1) pour toutes les cultures. Les dilutions se font dans un volume final de RPMI de 2ml en veillant à garder une valeur de 2,6.10<sup>8</sup> bactéries /ml.
- Déposer 300µl de la culture dans chacun des puits.
- Centrifuger la plaque de 24 puits pendant 10 minutes à 15000rpm.
- Mettre une heure à l'étuve à 37°C à CO<sub>2</sub>.
- Retirer le surnageant.
- Ajouter 600µl de gentamycine (dilué 1000X) pour éliminer les bactéries extracellulaires.

#### 5.2.2.4 Observations des *Brucella* au microscope à fluorescence.

##### Fixation des bactéries sur les coverslips.

On lance quelques jours avant l'étape de fixation une culture liquide de *Brucella* dans un volume de RPMI de 1,5ml. Une D.O de 1 correspond à une quantité de bactéries suffisante pour procéder à la fixation.

##### *Mode opératoire :*

- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm de manière à obtenir un culot bactérien.
- Enlever prudemment le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 1ml de PBS (1X) à pH=7,4.
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm.
- Répéter 3 fois ces deux dernières opérations.
- Après avoir resuspendu dans 1 ml de PBS on dépose la solution contenant les bactéries sur les coverslips préalablement incubés 1 heure à la polylysine (fixateur).
- Centrifuger 10 minutes à 15000 rpm pour précipiter les bactéries sur le coverslip.
- Retirer le surnageant.
- Ajouter 0,5ml de PFA( paraformaldéhyde ) à pH=7,4 et laisser incubé au maximum 20 minutes à température ambiante.
- Enlever la PFA et ajouter 1ml de PBS (1X).

##### Marquages des bactéries seules .

Afin de colocaliser les bactéries avec le signal émis par la GFP, nous avons procédé à un marquage du LPS bactérien. Ce marquage a été réalisé pour chacune des observations au microscope à fluorescence (dans le cas des bactéries seules et des infections).

##### *Mode opératoire :*

Tous les lavages se font avec du PBS concentré 1X à pH de 7,4.

- Laver les coverslips sur lesquels sont fixées les bactéries deux fois avec 1 ml de PBS.
- Déposer les coverslips sur 25µl d'anticorps anti-LPS de *Brucella* dilué 2000X dans une solution PBS-BSA 2%-Triton 100X 0,1%.
- Laisser incubé 45 minutes en chambre humide.
- Faire 3 lavages au PBS.
- Déposer les coverslips sur 25µl d'anticorps secondaires Tex-RED dilué 200X dans la même solution que l'anticorps primaire.
- Incuber 45 minutes en chambre humide.
- Laver 3X avec du PBS.
- Monter les coverslips sur les lames avec du Mowiol (fixateur).
- Laisser une nuit à l'obscurité à température ambiante avant l'observation au microscope.

#### 5.2.2.5 Observations de la fluorescence en cas d'infection.

##### Cinétique d'infection et fixation.

Au cours de ce travail, nous avons choisi les points d'observations pour la cinétique d'infection qui sont les suivants: 2H/ 24H/ 48H.

Pour chacun de ces points la procédure suivante est appliquée :

- Laver trois fois avec 1ml de PBS ( concentré 1X )
- Ajouter 500µl de PFA.
- Laisser incuber 20 minutes à température ambiante
- Remplacer la PFA par 1ml de PBS.

#### Marquage des bactéries en conditions d'infection.

Le marquage des bactéries se réalise de façon identique à celle des bactéries seules . Cependant les bactéries étant intracellulaires il faudra pour pouvoir marquer le LPS bactérien procéder à une étape de perméabilisation de la membrane du macrophage.

*Mode opératoire :*

- Perméabiliser les cellules avec une solution de PBS-BSA 2%-Triton 100X 0,1% que l'on dépose sur les coverslips.
- Laisser agir 5 minutes à température ambiante.
- Laver deux fois les coverslips sur lesquels sont fixées les bactéries avec 1 ml de PBS à pH=7,4 1X concentré.
- Déposer les coverslips sur 25µl d'anticorps anti-LPS de *Brucella* dilué 2000X dans une solution PBS-BSA 2%-Triton 100X 0,1%.
- Laisser incuber 45 minutes en chambre humide.
- Faire 3 lavages au PBS.
- Déposer les coverslips sur 25µl d'anticorps secondaires Tex-RED dilué 200X dans la même solution que l'anticorps primaire.
- Incuber 45 minutes en chambre humide.
- Laver 3X avec du PBS.
- Monter les coverslips sur les lames avec du Mowiol (fixateur)
- Laisser une nuit à l'obscurité à température ambiante avant l'observation au microscope.
- Après observation au microscope conserver les lames à -20°C.

### 5.2.3 Infection en souris.

Pour les tests de survie en souris de mutants *Brucella*, des souris BALB/c âgées de 7 semaines sont infectées avec  $5 \times 10^5$  bactéries et mises en incubation pendant quatre semaines. Ensuite, les souris sont sacrifiées et les rates dans lesquelles se trouvent les bactéries sont récupérées et broyées. Des dilutions successives de broyat de rate sont étalées sur milieu 2 YT solide et après 3-4 jours d'incubation, les bactéries sont comptées.

#### Préparation des doses infectantes

- La veille des infections, des cultures des mutants à tester sont lancées dans 5 ml de 2YT + antibiotique et incubées une nuit à 37 °C.
- Les cultures sont centrifugées à 3000 rpm pendant 12 minutes à température ambiante.
- Les surnageants sont éliminés et les culots sont resuspendus dans 5 ml de PBS 1X

- Les DO sont lues au spectrophotomètre à 600 nm, et les dilutions adéquates des cultures sont réalisées pour obtenir une concentration de  $5 \times 10^6$  bactéries / ml.

#### Infection des souris

- Des seringues stériles de 1 ml sont remplies avec les cultures diluées (jusqu'à 0.6 ml).
- 0.1 ml de culture est injecté à chaque souris (4 souris sont infectées par mutants testés)
- Les souris sont isolées dans une étuve à 25 °C et mises en incubation pendant 4 semaines.

#### Dilutions sériées et comptage des doses infectantes

- Des dilutions successives ( $10^{-1}$  à  $10^{-5}$ ) de chaque culture sont effectuées à partir des doses infectantes.
- 20 µl de chaque dilution sont étalés sur milieu 2YT solide et incubés 3-4 jours à 37 °C.
- Le nombre de colonies (CFU) obtenues pour chaque dilution est dénombré, et le nombre de bactéries de la dose infectante est évalué.

#### Récupération des bactéries et évaluation de la survie en souris

- Après 4 semaines, les souris sont sacrifiées par dislocation de la colonne vertébrale, et les rates sont récupérées.
- Les rates sont broyées dans des sachets en plastique et les broyats sont resuspendus dans 2 ml de PBS triton 0,1%.
- Des dilutions sériées ( $10^{-2}$  à  $10^{-7}$ ) des broyats de rates sont effectuées, et 20 µl de chaque dilution sont étalés sur milieu 2YT solide et incubés 3-4 jours à 37°C.
- Le nombre de CFU obtenues pour chaque dilution est dénombré, et le nombre de bactéries par rate est évalué.

## 6. Bibliographie.

- Anderson, T.D. and Cheville, N.F. (1986) Ultrastructural morphometric analysis of *Brucella abortus*-infected trophoblasts in experimental placentitis. Bacterial replication occurs in rough endoplasmic reticulum. *Am J Pathol*, **124**, 226-237.
- Andersson, S.G., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U.C., Podowski, R.M., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H. and Kurland, C.G. (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*, **396**, 133-140.
- Banta, L.M., Bohne, J., Lovejoy, D. and Dostal, K. (1998) Stability of the *Agrobacterium tumefaciens* Vir B10 protein is modulated by growth temperature and periplasmic osmoadaptation. *Journal of bacteriology*, 6597-6606.
- Barnett, M.J., Fisher, R.F., Jones, T., Komp, C., Abola, A.P., Barloy-Hubler, F., Bowser, L., Capela, D., Galibert, F., Gouzy, J., Gurjal, M., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R.W., Kahn, D., Kahn, M.L., Kalman, S., Keating, D.H., Palm, C., Peck, M.C., Surzycki, R., Wells, D.H., Yeh, K.C., Davis, R.W., Federspiel, N.A. and Long, S.R. (2001) Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9883-9888.
- Beauchamp, C.J., Kloepper, C.J., Lifshitz, R., Dion, P. and Antoun, H. (1991) Frequent occurrence of the ability to utilize octopine in rhizobacteria. *Can.J.Microbiol.*, 158-164.
- Bellefontaine, A.F., Pierreux, C.E., Mertens, P., Vandenhaute, J., Letesson, J.-J. and De Bolle, X. (2002) Plasticity of a transcriptional regulation network among alpha-proteobacteria is supported by the identification of CtrA targets in *Brucella abortus*. *Molecular Microbiology*, **43**, 945-960.
- Boucher, C., Genin, S. and Arlat, M. (2001) Concepts actuels sur la pathogénie chez les bactéries phytopathogènes. .
- Briones, G., Inon de Iannino, N., Roset, M., Vigliocco, A., Paulo, P.S. and Ugalde, R.A. (2001) *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect Immun*, **69**, 4528-4535.
- Clemens, D.L. (1996) Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Trends Microbiol*, **4**, 113-118.
- Corbel, M.J. (1997) Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis*, **3**, 213-221.

- Delrue, R.M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J.P. and Letesson, J.J. (2001) Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol*, **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., Goltsman, 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**, 443-448.
- Dénarié, J., Roche, P. Rhizobium nodulations signals, 295-324.
- Desjardins, M. (1995) Biogenesis of phagolysosomes: the "kiss and run" hypothesis. *Trends in cell biology*, **5**, 183-186.
- Dessaux, Y., Petit, A. and Tempé, J. (1992) Opines in *Agrobacterium* biology. In Verma, D.P.S. (ed.) *Molecular signals in plant-microbe communication*. CRC Press, Florida, pp. 109-136.
- Detilleux, P.G., Deyoe, B.L. and Cheville, N.F. (1990) Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. *Infect Immun*, **58**, 2320-2328.
- Eskra, L., Canavessi, A., Carey, M. and Splitter, G. (2001) *Brucella abortus* genes identified following constitutive growth and macrophage infection. *Infect Immun*, **69**, 7736-7742.
- Finan, T.M., Weidner, S., Wong, K., Buhrmester, J., Chain, P., Vorholter, F.J., Hernandez-Lucas, I., Becker, A., Cowie, A., Gouzy, J., Golding, B. and Puhler, A. (2001) The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N<sub>2</sub>-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9889-9894.
- Gage, D.J. and Margolin, W. (2000) Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Curr Opin Microbiol*, **3**, 613-617.
- Galan, J.E. and Collmer, A. (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, **284**, 1322-1328.
- Galbraith, M.P., Feng, S.F., Borneman, J., Triplett, E.W., de Bruijn, F.J. and Rossbach, S. (1998) A functional myo-inositol catabolism pathway is essential for rhizopine utilization by *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology*, **144**, 2915-2924.
- Galibert, F., Finan, T.M., Long, S.R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M.J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R.W., Dreano, S., Federspiel, N.A., Fisher, R.F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M.,

- Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R.W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M.L., Kalman, S., Keating, D.H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M.C., Pohl, T.M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thebault, P., Vandebol, M., Vorholter, F.J., Weidner, S., Wells, D.H., Wong, K., Yeh, K.C. and Batut, J. (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*, **293**, 668-672.
- Gandara, B., Lopez Merino, A., Antonio Rogel, M. and Martinez-Romero, E. (2000) Limited Genetic Diversity of *Brucella* spp. , 235-240.
- Gardener, B.B.M. and de Bruijn, F.J. (1998) Detection and isolation of novel rhizopine-catabolizing bacteria from the environment. *Appl Environ Microbiol*, **64**, 4944-4949.
- Gordon, M.D., Ryder, H.M., Heinrich, K. and Murphy, J.P. (1996) An Experimental Test of the Rhizopine Concept in *Rhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*, 3991-3996.
- Guzmán-Verri, C., Chaves-Olarte, E., von Eichel-Streiber, C., Lopez-Goni, I., Thelestam, M., Arvidson, S., Gorvel, J.-P. and Moreno, E. (2001) GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes. *The journal of biological chemistry*, **276**, 44435-44443.
- Heinrich, K., Ryder, M.H. and Murphy, P.J. (2001) Early production of rhizopine in nodules induced by *Sinorhizobium meliloti* strain L5-30. *Can J Microbiol*, **47**, 165-171.
- Henderson, B., Wilson, M., McNab, R. and Lax, A.J. (1999) *Cellular Microbiology: Bacteria-Host Interactions in Health and Disease*. John Wiley and Sons, Chichester.
- Hentschel, U., Steinert, M. and Hacker, J. (2000) Common molecular mechanisms of symbiosis and pathogenesis. *Trends Microbiol*, **8**, 226-231. \_00001758 \_00001758.
- Inon de Iannino, N., Briones, G., Tolmasky, M. and Ulgade, A.R. (1998) Molecular Cloning and Characterization of *cgs*, the *Brucella abortus* Cyclic  $\beta$  (1-2)Glucan Synthetase Gene: Complementation of *Rhizobium ndvB* and *Agrobacterium tumefaciens chvB* Mutants. *journal of bacteriology*.
- Jepson, A.M. and Clark, M.A. (1998) Studying M cells and their role in infection. *Trends in Microbiology*, **6**, 359-365.
- Jiang, G., Krishnan, H.A., Kim, Y.-W., Wacek, T.J. and Krishnan, B.H. (2001) A Functional myo-Inositol Deshydrogenase Gene Is Required for Efficient Nitrogen Fixation and Competitiveness of *Sinorhizobium fredii* USDA191 To Nodulate Soybean (*Glycine max*(L.)Merr.). *Journal of bacteriology*, 2595-2604.
- Johnston, A.W.B The symbiosis between *Rhizobium* and legumes, 19,393-414.

- Jumas-Bilak, E., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Ramuz, M. and Allardet-Servent, A. (1998) Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the Proteobacteria. *J Bacteriol*, **180**, 2749-2755.
- Kaper J.B., H. (1999) Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements. In Press, A. (ed.) , Washington D.C.
- Khöler. (1999) pBBR1-GFP: A Broad-Host -Range Vector for Prokaryotic Promoter Studies. *Biotechniques*, **26**, 620-622.
- Köhler, S. (1999) pBBR1-GFP: A Broad-Host-Range Vector for Prokaryotic Promoter Studies. *Biotechniques*, **26**, 620-622.
- LeVier, K., Phillips, R.W., Grippe, V.K., Roop, R.M., 2nd and Walker, G.C. (2000) Similar requirements of a plant symbiont and a mammalian pathogen for prolonged intracellular survival. *Science*, **287**, 2492-2493.
- LeVier, K. and Walker, C.G. (2001) Genetic Analysis of the *Sinorhizobium meliloti* BacA Protein: differential Effects of Mutations on Phenotypes. *Journal of Bacteriology*, **183**, 6444-6453.
- Lewin, B. (1994) *Genes V*.
- Liautard, J.-P., gross, A., Dornand, J. and Kölher, S. (1996) Interactions between professional phagocytes and *Brucella* spp. *Microbiology*, **12**, 197-206.
- Lin, J., Adams, L.G. and Ficht, T.A. (1992) Characterization of the heat shock response in *Brucella abortus* and isolation of the genes encoding the GroE heat shock proteins. *Infect Immun*, **60**, 2425-2431.
- Lin, J. and Ficht, T.A. (1995) Protein synthesis in *Brucella abortus* induced during macrophage infection. *Infect Immun*, **63**, 1409-1414.
- Marie, C., Broughton, W.J. and Deakin, W.J. (2001) Rhizobium type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Curr Opin Plant Biol*, **4**, 336-342.
- Meresse, S., Steele-Mortimer, O., Moreno, E., Desjardins, M., Finlay, B. and Gorvel, J.P. (1999) Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death. *Nat Cell Biol*, **1**, E183-188. [java/Propub/cellbio/ncb1199\\_E1183.fulltext](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11199000)  
[java/Propub/cellbio/ncb1199\\_E1183.abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11199000).
- Moran, A.N. and Wernegreen, J.J. (2000) Lifestyle evolution in symbiotic bacteria: insights from genomics. *Reviews*.
- Moreno, E. (1998) Genome evolution within the alpha Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? *FEMS Microbiol Rev*, **22**, 255-275.

- Moreno, E. and Moriyon, I. (2002) *Brucella melitensis*: A nasty bug with hidden credentials for virulence. *PNAS*, **99**, 1-3.
- Murphy, P.J., Heyke, N., Banfali, Z., Tate, M.E., DeBruijn, F., Kondorosi, A., Tempé, J., Scell, J. (1986) Genes for the catabolism and synthesis of an opine-like compound in *Rhizobium meliloti* are closely linked and on the Sym plasmid, *Proc.Natl.Acad.Sci*, **84**,
- Murphy, P.J., Heycke, N., Trenz, S.P., Ratet, P., de Bruijn, F.J. and Schell, J. (1988) Synthesis of an opine-like compound, a rhizopine, in alfalfa nodules is symbiotically regulated. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 9133-9137.
- Murphy, P.J. and Saint, C.P. (1992) Rhizopines in the legume-Rhizobium symbiosis. In Verma, D.P.S. (ed.) *Molecular signals in plant-microbe communication*. CRC Press, Florida, pp. 377-390.
- Murphy, P.J., Trenz, S.P., Grzemeski, W., De Bruijn, F.J. and Schell, J. (1993) The *Rhizobium meliloti* rhizopine *mos* locus is a mosaic structure facilitating its symbiotic regulation. *J Bacteriol*, **175**, 5193-5204.
- O'Callaghan, D., Cazevieille, C., Allardet-Servent, A., Boschiroli, M.L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y. and Ramuz, M. (1999) A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol Microbiol*, **33**, 1210-1220.
- O'Callaghan, D. and MacMillan, A. (2001) *Brucella*. .
- Ochman, H. and Moran, N.A. (2001) Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science*, **292**, 1096-1099.
- Oger, P. and Farrand, S.K. (2002) Two opines control conjugal transfer of an *Agrobacterium* plasmid by regulating expression of separate copies of the quorum-sensing activator gene *traR*. *Journal of bacteriology*, 1121-1131.
- Oke, V. and Long, S.R. (1999) Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Curr Opin Microbiol*, **2**, 641-646.
- Patriarca, E.J., Tatè, R. and Iaccarino, M. (2002) Key role of bacterial NH<sub>4</sub><sup>+</sup> metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiology and molecular biology reviews*, 203-222.
- Perret, X., Staehelin, C. and Broughton, W.J. (2000a) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 180-201.
- Perret, X., Staehelin, C. and Broughton, J.W. (2000b) Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 180-201.
- Phillips, D. and Kalpulnik, Y. (1995) Plants isoflavonoïds, pathogens and symbionts. *Trends in microbiology*, **3**, 58-64.

- Pizarro-Cerdà, J., Meresse, S., Parton, R.G., van der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goni, I., Moreno, E. and Gorvel, J.P. (1998) *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun*, **66**, 5711-5724.
- Pizarro-Cerdà, J., Moreno, E. and Gorvel, J.-P. (1999) *Brucella abortus* invasion and survival within professional and nonprofessional phagocytes. *Advances in Cell and Molecular Biology of Membranes and Organelles*, **6**, 201-232.
- Pizarro-Cerdà, J., Moreno, E., Sanguedolce, V., Mege, J.-L. and Gorvel, J.-P. (1997) Virulent *Brucella abortus* Prevents Lysosome Fusion and Is Distributed within Autophagosome-Like Compartements. , 2387-2392.
- Prescott. (1995) *Microbiologie*, Bruxelles.
- Rafie-Kolpin, M., Essenberg, R.C. and Wyckoff, J.H., 3rd. (1996) Identification and comparison of macrophage-induced proteins and proteins induced under various stress conditions in *Brucella abortus*. *Infect Immun*, **64**, 5274-5283.
- Saint, C.P., Wexler, M., Murphy, P.J., Tempe, J. and Tate, M.E. (1993) Characterization of genes for synthesis and catabolism of a new rhizopine induced in nodules by *Rhizobium meliloti* Rm220-3: extension of the rhizopine concept. *J Bacteriol*, **175**, 5205-5215.
- Sieira, R., Comerci, D.J., Sanchez, D.O. and Ugalde, R.A. (2000) A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *J Bacteriol*, **182**, 4849-4855.
- Sola-Landa, A., Pizarro-Cerda, J., Grillo, M.J., Moreno, E., Moriyon, I., Blasco, J.M., Gorvel, J.P. and Lopez-Goni, I. (1998) A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol*, **29**, 125-138.
- Spaink, H.P. (2000) Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu Rev Microbiol*, **54**, 257-288.
- Tamas, I., Klasson, L.M., Sandstrom, J.P. and Andersson, S.G. (2001) Mutualists and parasites: how to paint yourself into a (metabolic) corner. *FEBS Lett*, **498**, 135-139.
- Ugalde, R.A. (1999) Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. *Microbes Infect*, **1**, 1211-1219.
- Valdivia, R.H. and Falkow, S. (1997) Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science*, **277**, 2007-2011.
- Van Rhijn, P. and Vanderleyden, J. (1995) The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol Rev*, **59**, 124-142.

- Verger, J.M. (1993) Le point Veterinaire. *Editorial*, **25**, 1(93)-93(95).
- Verger, J.M., Grimont, F., Grimont, P.A. and Grayon, M. (1987) Taxonomy of the genus *Brucella*. *Ann Inst Pasteur Microbiol*, **138**, 235-238.
- Verma, D.P. and Hong, Z. (1996) Biogenesis of the peribacteroid membrane in root nodules. *Trends Microbiol*, **4**, 364-368.
- Wallach, J.C., Samartino, L.E., Efron, A. and Baldi, P.C. (1997) Human infection by *Brucella melitensis*: an outbreak attributed to contact with infected goats. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **19**, 315-321.
- Wang, M., Qureshi, N., Soeurt, N. and Splitter, G. (2001) High levels of nitric oxide production decrease early but increase late survival of *Brucella abortus* in macrophages. *Microbial pathogenesis*, **31**, 221-230.
- Wexler, M., Gordon, D. and Murphy, P.J. (1995) The distribution of inositol rhizopine genes in *Rhizobium* populations. *Soil Biol.Biochem.*, **27**, 531-537.
- Yoshida, K.I., Aoyama, D., Ishio, I., Shibayama, T. and Fujita, Y. (1997) Organization and transcription of the myo-inositol operon, *iol*, of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **179**, 4591-4598.
- Young, E.J. (1995) An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis*, **21**, 283-289; quiz 290.
- Zomodipour, A. and Andersson, S.G.E. (1999) Obligate intracellular parasites: *Rickettsia prowazekii* and *Chlamydia trachomatis*. *FEBS Letters*, 11-15.