

THESIS / THÈSE

LICENCE EN BIOLOGIE

Étude d'un régulateur transcriptionnel de Brucella, VjBR

Schaus, Jean-Michel

Award date:
2001

Awarding institution:
Universite de Namur

[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

Etude d'un régulateur transcriptionnel de *Brucella*, VjBR

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

Jean Michel SCHAUS

Juin 2001

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

FACULTE DES SCIENCES

Secrétariat du Département de Biologie

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

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

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

Etude d'un régulateur transcriptionnel de *Brucella*, VjBR

SCHAUS Jean-Michel

Résumé

Les pathogènes intracellulaires facultatifs, comme *Brucella*, ont développé de nombreux mécanismes pour survivre et se multiplier dans les cellules eucaryotes. Récemment, dans le cadre de l'identification de gènes impliqués dans la répllication de *Brucella* en cellules HeLa, un régulateur transcriptionnel possédant un domaine de liaison aux N-acyl homosérines lactones (AHL), et nommé VjbR (Vacuolar-Jacking *Brucella* Regulator), a été identifié.

Afin d'identifier des gènes dont la transcription serait potentiellement régulée par VjbR, nous avons choisi de tester l'expression d'un opéron (*virB*) et de 2 gènes (*babR* et *fliF*) impliqués soit dans la virulence de *Brucella* soit dans la problématique du quorum sensing lié aux AHL. La stratégie que nous avons choisi d'utiliser est de réaliser des fusions entre les promoteurs putatifs des 3 gènes et le gène rapporteur *gfp* et de les intégrer dans le contexte chromosomique d'une *Brucella* sauvage et d'une *Brucella* délétée pour le gène *vjbR*.

Dans le cadre de ce travail, nous avons construit différentes souches de *Brucella* délétées pour l'ORF *vjbR* (*Brucella* Δ *vjbR*). Nous avons également réalisé les fusions avec *gfp*, ce qui a conduit aux constructions pFT*virB*, pFT*babR* et pFT*fliF*. L'étape suivante a été de les intégrer dans le génome d'une *Brucella* sauvage et d'une *Brucella* Δ *vjbR*. A la fin de ce travail, nous avons obtenu les souches *B. abortus* 544pFT*virB* et *B. abortus* 544 Δ *vjbR* pFT*virB*.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2001

Promoteur: Prof. J.J. Letesson

Avant tout, je tiens à remercier le Professeur Jean-Jacques Letesson de m'avoir permis de réaliser ce mémoire au sein de son laboratoire.

Merci à toi, Rose-May de m'avoir suivi au cours de ces quelques mois. Ton aide fut déterminante dans l'aboutissement de ce projet. Tu m'as aidé à grandir de mes erreurs, et à tenir jusqu'au bout, pour ça et le reste, je te remercie.

Merci à P. Renard, J. Vandenhoute, C. Lambert et P. Denoël pour leur lecture critique de cet ouvrage.

Merci à Zette, Flore, Amé (à l'occasion je t'enverrai un pti mail), Calou, David, Xavier pour vos conseils et votre aide dans les moments critiques. Merci à Valérie (j'espère de tout cœur que tu gagneras ton pari), Anne, Bernard, Monsieur Poos (maintenant je sais faire une centri avec un nombre impair de tubes, et oui, c'est possible !), Steph, Ayman, Garçon, Manu, Chantal, Christian, Val, Jean-Marc, Sandrine, Etienne, Sophie, Vincent, and all the others... Sorry for those I've forgotten.

Tous mes vœux à mon ami Régis (bonne année, bon anniversaire, joyeux Noël, et surtout, bonne M... pour what you know !).

Merci à mes parents de m'avoir soutenu mais aussi de m'avoir supporté dans ces moments tendus, et bien entendu de m'avoir mis au monde...

Alors Mush, bio l'année prochaine...

Bonne m... à Anna (Little Sister), Auré (Bonne Tchuss), Friedel (Oye, Vicking!) et les autres pour vous savez quoi !

Merci à Brucella, (oups j'ai oublié l'italique). Je reprends donc, merci à *Brucella, coli*, et toute la clique ...

Je profite également de ceci pour demander au « fantôme du labo » quel plaisir il a pris à piquer mes boîtes et à arrêter mes gels de migration ...

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION	4
1. Brucella	4
<u>1.1 Historique</u> (Gilbert G L., 1993)	4
<u>1.2 Généralités</u> (Young E. J., 1995 ; Pizarro-Cerdá and E. Moreno, 1999)	4
<u>1.3 Physiopathologie</u> (Enright, 1990 ; Pizarro-Cerdá and E. Moreno, 1999)	5
2. Exploitation de fonctions des cellules eucaryotes par les bactéries pathogènes	6
<u>2.1. L'invasion</u> (Aderem and Underhill, 1999 ; Finlay and Cossart, 1997).	6
<u>2.2. Le parcours classique d'une particule exogène phagocytée</u>	7
2.2.1 Interaction avec les endosomes précoces	8
2.2.2 Interaction avec les endosomes tardifs	8
2.2.4 Interaction avec les lysosomes	8
<u>2.3 La survie intracellulaire des pathogènes intracellulaires facultatifs</u>	9
2.3.1 <i>Mycobacterium</i>	10
2.3.2 <i>Salmonella typhimurium</i>	11
<u>2.4. Infection des cellules par Brucella</u>	12
2.4.1 Invasion :	12
2.4.2 Trafic intracellulaire en cellules non phagocytaires :	12
2.4.3 Trafic intracellulaire en cellules phagocytaires :	14
2.4.4 Mécanismes moléculaires impliqués dans le trafic intracellulaire de <i>Brucella</i>	15
2. 4. 4. 1 BvrR/BvrS	15
2. 4. 4. 2 VirB	16
2. 4. 4. 2 VjbR	18
 II BUT DU MEMOIRE	 20
 III. RESULTATS	 21
1. Préliminaires	21
2. Construction d'une souche de <i>Brucella</i> délétante pour le gène <i>vjbR</i>	22
<u>2.1 Principe</u>	22
<u>2.2 Construction de candidats délétants</u>	22
<u>2.3 Analyse génotypique des candidats délétants</u>	24
3. Analyse de l'expression différentielle de l'opéron <i>virB</i>, du gène <i>fliF</i>, et du gène <i>babR</i> dans une souche de <i>Brucella</i> délétante pour le gène <i>vjbR</i>.	25
<u>3.1 Construction des plasmides pFTvirB, pFTfliF et pFTbabR</u>	25
3.1.1 Amplification par PCR de la région promotrice	25
3.1.1.1 Choix des amorces	25
3.1.1.2 amplification par PCR	26
3.1.2 Clonage des amplicons dans le pSKoriTCATgfp2	26
3.1.2.1 Restriction du vecteur	26
3.1.2.2 Ligation	26
3.1.2.3 Transformation et analyse des clones recombinants	27
3.1.3 Vérification des candidats par séquençage	29

3.1.3.1 pFTvirB	29
3.1.3.1 pFTfliF	29
3.1.3.1 pFTbabR	29
3.2 Intégration du plasmide pFTvirB chez <i>Brucella</i>	30
3.2.1 Analyse géotypique des candidats intégrants pour le pFTvirB	30
3.2.2. Dénombrement des bactéries intracellulaires vivantes	32
IV. DISCUSSION	33
V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	38
VI. MATERIELS ET METHODES	41
1. Souches bactériennes et plasmides	41
<u>1.1 Souches bactériennes</u>	41
1.1.1 <i>E.coli</i> S17 -1 :	41
1.1.2 <i>E.coli</i> DH10B :	41
1.1.3 <i>Brucella</i> sp. :	41
<u>1.2 Plasmides</u>	42
1.2.1 pSKoriTCATgfp2 :	42
1.2.2 pΔvjbr:	43
2. Milieux de culture	43
2.1 milieu Luria Bertani (LB) :	43
2.2 Milieu LB solide :	43
2.3 Milieu 2YT :	44
3. Techniques d'ADN recombinant	44
3.1 Extraction d'ADN plasmidique (par minipréparation)	44
3.2 Restriction de l'ADN :	45
3.3 Extraction au phénol/chloroforme :	46
3.4 Précipitation à l'éthanol :	46
3.5 Electrophorèse en gel d'agarose :	46
3.6 Réaction de ligation :	47
3.7 Transformation bactérienne :	48
3.7.1 Electroporation bactérienne :	48
3.7.2 Transformation chimique	49
3.8 Amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) :	51
4. Conjugaison	52
5. Coloration de Gram	53
6. Extraction d'ADN génomique de <i>Brucella</i>	53
7. Southern blot en radioactivité	55
7.1 Restriction de l'ADN génomique :	55
7.2 Séparation des fragments d'ADN :	55
7.3 Transfert sur membrane :	55
7.4 Préhybridation :	56
7.5 Hybridation :	56
7.6 Révélation	57

8. Infections cellulaires	57
<u>8.1 Préparation des cellules HeLa et macrophages:</u>	57
<u>8.2 Préparation des doses infectantes:</u>	57
<u>8.3 Infections :</u>	58
<u>8.4 Lyse des cellules:</u>	58
VII. BIBLIOGRAPHIE	59
ANNEXE I : LISTE DES ABREVIATIONS	64

I. INTRODUCTION

1. Brucella

1.1 Historique (Gilbert G L., 1993)

En 1860, le premier cas de brucellose humaine, connue sous le nom de fièvre de Malte, fut décrit chez des soldats anglais en fonction sur l'île de Malte. L'agent responsable de cette maladie, isolé par David Bruce en 1887 à partir de la rate d'un patient décédé, reçut le nom de *Micrococcus melitensis*.

En parallèle, aux Etats-Unis, une bactérie responsable d'avortements chez les bovins a été décrite par Bernhard Bang, et nommée *Bacillus abortus*.

En 1918, les deux espèces ont été regroupées sous le nom générique de *Brucella*, en l'honneur de David Bruce.

1.2 Généralités (Young E. J., 1995 ; Pizarro-Cerdá and E. Moreno, 1999)

Brucella est un petit coccobacille de 0,5µm sur 1µm, intracellulaire facultatif à Gram négatif n'ayant ni capsule, ni flagelle, ni endospores. Le genre *Brucella* appartient à la subdivision des α -2 protéobactéries et est composé de 6 espèces, *B.melitensis*, *B.abortus*, *B.suis*, *B.canis*, *B.ovis* et *B.neotomae*.

Chaque espèce montre une spécificité d'hôte particulière. *B.melitensis* infecte préférentiellement les ovins et caprins. Pour *B.abortus* l'hôte préférentiel est le bovin, pour *B.suis*, ce sont les porcs, pour *B.ovis*, les ovins, et pour *B.canis* et *B.neotomae*, respectivement le chien et les rongeurs. Seules *B.melitensis*, *B.suis*, *B.abortus* et occasionnellement *B.canis* infectent l'homme. Chez les animaux, cette zoonose se manifeste par l'avortement chez les femelles gestantes. Chez les animaux non gestants, *Brucella* montre un tropisme particulier pour les organes reproducteurs et les glandes mammaires.

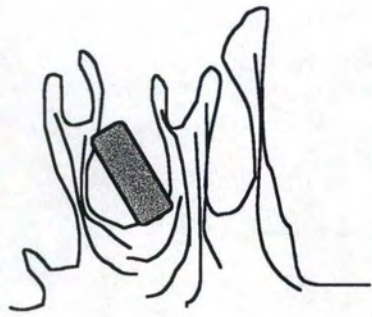
Chez l'homme, les symptômes les plus courants sont, la fièvre, la fatigue, l'anorexie, l'amaigrissement, ainsi que la dépression. Il peut cependant y avoir diverses complications telles que des problèmes ostéoarticulaires, gastro-intestinaux, pulmonaires, hépatobiliaires, génitaux, neurologiques et cardiovasculaires.

1.3 Physiopathologie (Enright, 1990 ; Pizarro-Cerdá and E. Moreno, 1999)

Brucella peut pénétrer dans l'organisme hôte au niveau du revêtement cutaneo-muqueux, au niveau du tractus gastro-intestinal par exemple suite à l'ingestion d'aliments contaminés tels que du lait non pasteurisé, du fromage non fermenté, au niveau des voies respiratoires par le biais des aérosols ou via des lésions,. Elle traverse l'épithélium, induisant dans la sous-muqueuse une réaction inflammatoire, marquée par l'afflux de cellules phagocytaires telles que monocytes et polymorphonucléaires neutrophiles. Dans la sous-muqueuse, le microorganisme est ingéré par ces phagocytes mais résiste à la destruction intracellulaire.

Après avoir échappé à la première ligne de défense, *Brucella* est amenée, par la circulation lymphatique, aux ganglions locaux où elle se retrouve dans des phagocytes professionnels et résiste à leurs mécanismes de destruction. Il n'est pas encore établi si, lors du transport, la bactérie est sous forme libre ou intracellulaire, même s'il semble qu'elle se trouve dans les cellules phagocytaires.

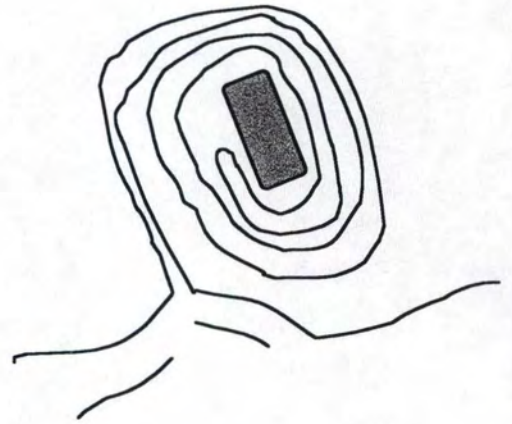
Elle est ensuite disséminée, sous forme intracellulaire, dans l'organisme hôte via la circulation sanguine. Elle atteint alors différents tissus, dont les glandes mammaires, les organes reproducteurs, et les tissus lymphoïdes distants où elle infecte aussi bien les cellules phagocytaires professionnelles que les cellules phagocytaires non professionnelles.



Trigger



Zipper



Coiling

Figure 1 : Les différents types d'invasion des cellules par les pathogènes intracellulaires.

2. Exploitation de fonctions des cellules eucaryotes par les bactéries pathogènes

2.1. L'invasion (Aderem and Underhill, 1999 ; Finlay and Cossart, 1997).

Les bactéries pénètrent dans les cellules de diverses façons selon qu'il s'agit de cellules phagocytaires professionnelles, qui comprennent entre autres les polymorphonucléaires neutrophiles, les monocytes et macrophages, ou de cellules non professionnelles. Dans les phagocytes professionnels, qui internalisent les particules de grandes tailles avec efficacité, il n'est pas nécessaire, même si c'est parfois observé, pour la bactérie d'induire son internalisation. Pour désigner toute internalisation de particules par ce type de cellules, nous parlerons de phagocytose.

Par contre, les phagocytes non professionnels ne sont pas habilités à internaliser des particules de grandes tailles. Dès lors, il est nécessaire que la bactérie induise son internalisation. Pour désigner toute ingestion induite par la particule nous parlerons d'invasion. Néanmoins, les mécanismes de phagocytose et d'invasion impliquent des réarrangements importants du cytosquelette (actine et/ou microtubules) de la cellule phagocytaire (Aderem and Underhill, 1999 ; Finlay and Cossart, 1997).

La phagocytose implique une reconnaissance entre le phagocyte et la bactérie. Cette reconnaissance se fait par le biais d'opsonine. Les opsonines sont des molécules circulantes, telles que les anticorps ou les facteurs du complément, servant d'adaptateurs entre le phagocyte et la bactérie. L'anticorps se lie à son antigène spécifique en surface de la bactérie via sa partie variable (F(ab)2), tandis que sa partie constante (Fc) lie un récepteur (FcRc) en surface du phagocyte. Le facteur du complément C3b se lie à des structures de surface de la bactérie et est reconnu par les récepteurs CR1 en membrane du phagocyte (Gagescu and Gruenberg, 2000). A ce jour deux types de phagocytose de bactéries sont connus. Il s'agit de la phagocytose par fermeture éclair ("zipper phagocytosis") dont les récepteurs principaux ont été cités ci-dessus et de la phagocytose en hélice ("coiling phagocytosis") dont les récepteurs peuvent ou non être opsoniques (Figure 1). Les récepteurs des facteurs du complément promeuvent surtout la phagocytose "zipper", tandis que la "coiling" phagocytose est probablement facilitée par d'autres facteurs spécifiques encore non-identifiés à ce jour (Rittig *et al.*, 1998). Parmi les pathogènes qui pénètrent dans les cellules phagocytaires par "coiling" phagocytose on peut citer *Legionella pneumophila*.

L'invasion des cellules est un mécanisme induit par les bactéries chez les phagocytes professionnels et non-professionnels. Deux types de mécanisme d'invasion sont largement utilisés par les bactéries : le type " zipper ", et le type " trigger ". Le type " zipper " se fait à la manière d'une fermeture éclair, où la bactérie, est progressivement entourée par la membrane plasmique de la cellule comme c'est le cas pour la phagocytose par " zipper " chez les phagocytes professionnels. Ce mécanisme d'invasion implique une reconnaissance entre des molécules présentes en membrane de la cellule, et des molécules situées en surface de la particule. Parmi les types de reconnaissance bactérie-phagocyte les plus courants, se trouvent l'interaction sucre-lectine (mannose, fucose – mannose receptor), la liaison aux intégrines, et la liaison du lipopolysaccharide (LPS) de la bactérie à son récepteur spécifique. Il s'agit d'un mécanisme induit car la bactérie utilise des récepteurs membranaires de la cellule dont la fonction naturelle n'est pas d'internaliser des particules. Ce mécanisme est, entre autres, utilisé par *Listeria monocytogenes* via l'interaction entre une protéine de membrane de *Listeria*, l'Internaline, et la E-cadherin, protéine d'adhésion transmembranaire de la cellule eucaryote impliquée dans les interactions intercellulaires (Gagescu and Gruenberg, 2000; Finlay and Cossart, 1997). (Figure 1). Le type " trigger ", appelé aussi macropinocytose, ne fait pas intervenir de liaison phagocyte-bactérie. Lors de ce mécanisme, la cellule, en réponse à un signal libéré par la bactérie, émet une série de pseudopodes (« ruffles ») qui englobent non seulement la bactérie, mais aussi une partie du fluide extracellulaire (Gagescu and Gruenberg, 2000 ; Finlay and Cossart, 1997). *Salmonella typhimurium* et *Shigella flexneri* utilisent le système de sécrétion de type III pour injecter dans l'hôte des molécules qui recrutent des protéines liant l'actine, comme la paxilline, et la vinculine (Finlay and Cossart, 1997). (Figure 1).

2.2. Le parcours classique d'une particule exogène phagocytée

Avant d'examiner le trafic suivi par les bactéries pathogènes dans les cellules, nous allons d'abord rappeler la voie suivie par les particules exogènes après leur internalisation dans les cellules eucaryotes. De manière générale, elles se retrouvent dans une vacuole et transitent via les endosomes précoces et tardifs pour aboutir aux lysosomes où elles sont détruites (G. Karp, 1998). Ces différents événements ont lieu aussi bien dans les phagocytes professionnels que dans les phagocytes non-professionnels.

2.2.1 Interaction avec les endosomes précoces

L'étape qui suit l'internalisation des bactéries et particules, est leur adressage aux endosomes précoces. Pour ce faire, la vésicule de phagocytose fusionne avec ces endosomes (G.Karp, 1998, p.322).

Les endosomes précoces sont caractérisés par un diamètre de 0,3 à 0,5 μm , la présence des protéines Rab5, EEA1 (Early Endosomal Antigen 1), et du récepteur à la transferrine, ainsi que par un pH légèrement acide (6,0-6,2) du à la présence en membrane de la pompe à protons vacuolaire (V-ATPase) (Gagescu and Gruenberg, 2000). La fusion de la vésicule de phagocytose avec les endosomes est due à la GTPase Rab5 (Aderem and Underhill, 1999).

2.2.2 Interaction avec les endosomes tardifs

Après les endosomes précoces, les particules et bactéries ingérées transitent par les endosomes tardifs (G.Karp, 1998, p.322).

Les endosomes tardifs diffèrent des endosomes précoces par leur pH intravacuolaire, de l'ordre de 5,0, et par leur composition en protéines. Ils sont caractérisés par la présence des GTPases Rab7 et Rab9, et du récepteur au mannose-6-phosphate (Gagescu and Gruenberg, 2000). La fusion avec les endosomes tardifs est catalysée par la GTPase Rab7 (Aderem and Underhill, 1999; Gagescu and Gruenberg, 2000).

2.2.4 Interaction avec les lysosomes

Le compartiment final des particules et bactéries ingérées est le lysosome, qui est responsable de leur dégradation (G.Karp, 1998, p.323).

Les lysosomes sont des structures de taille variable, allant de 25 nm à plus d'1 μm . Ils sont caractérisés par la présence des protéines membranaires LAMP (Lysosome Associated Membrane Protein) et CD63. Leur pH est de l'ordre de 4,6. Leur fonction de dégradation est le fruit d'enzymes lysosomiales dont l'activité est optimale à pH acide. Parmi ces enzymes se trouvent des phosphatases (phosphatase acide, phosphodiesterase), des nucléases (ribonucléase acide, désoxyribonucléase), des protéases (cathepsine, collagénase), des lipases (lipase acide, phospholipase), des saccharidases (sialidase, fucosidase, α -glucosidase, α -mannosidase), ... (G.Karp, 1998, p.314).

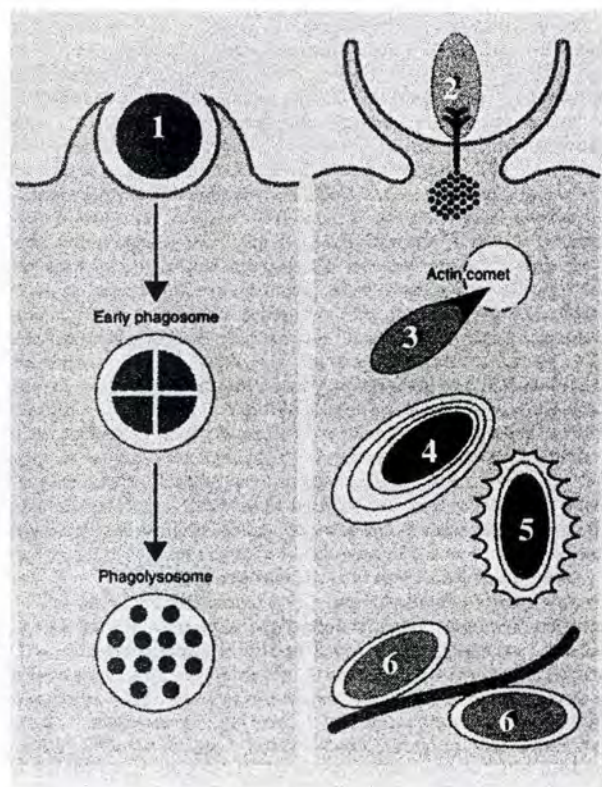


Figure 2 : Contrôle de la phagocytose par les pathogènes intracellulaires facultatifs.

A gauche (1), la voie classique de dégradation des particules exogènes internalisées par les cellules eucaryotes. A droite, différentes stratégies élaborées par les pathogènes.

En (2) Les bactéries inhibent leur internalisation dans les cellules en y injectant des facteurs bactériens (*Yersinia*..). Les 3 types de stratégies utilisées par les bactéries pour s'isoler de la voie classique de dégradation sont illustrés en 3, 4, 5 et 6 En (3), elles lysent la vacuole les contenant afin de se mouvoir dans le cytoplasme (*Shigella*, *Listeria*). En (4), les bactéries sont localisées dans un compartiment multimembranaire (*Brucella*, *Legionella*). En (5 et 6) Arrêt de la maturation du phagosome le long de la voie classique (*Mycobacterium*, *Salmonella*, *Francisella*). (D'après Meresse *et al.*, 1999).

2.3 La survie intracellulaire des pathogènes intracellulaires facultatifs

Si initialement l'internalisation de particules par les cellules eucaryotes est un mécanisme destiné à dégrader la particule ingérée, les bactéries pathogènes intracellulaires en ont tiré profit afin d'infecter ces cellules comme nous l'avons décrit dans le point précédent. Une fois en cellules, elles contrôlent le sort de la vésicule de phagocytose afin de ne pas subir la dégradation dans les lysosomes (Méresse *et al.*, 1999).

Les bactéries ont élaboré trois types de stratégie pour empêcher leur dégradation (Méresse *et al.*, 1999). (Figure 2).

- (1) Certaines bactéries, comme *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, et *Salmonella typhimurium*, suivent la voie endocytique lors des premières étapes de l'infection et bloquent la maturation des vacuoles le long de cette voie. *Mycobacterium*, par exemple, stoppe la voie d'endocytose classique au niveau des endosomes précoces. Ces endosomes précoces ne fusionnent jamais avec les endosomes tardifs, et deviennent la niche de réplication du pathogène.
- (2) D'autres bactéries détruisent la membrane de la vésicule de phagocytose afin de se multiplier dans le cytoplasme de l'hôte. C'est le cas de *Shigella*, *Listeria*, ...
- (3) La troisième stratégie, élaborée par *Legionella*, *Brucella*, ... est de s'isoler rapidement de la voie endocytique tout en restant dans une vacuole. Ces bactéries détournent le phagosome qui les contient de la voie classique pour se répliquer dans une vacuole indépendante de cette voie. *Brucella*, par exemple, transite par les endosomes précoces, ne passe pas par les endosomes tardifs, et se retrouve dans un compartiment de type autophagosomal. Quant à *Legionella*, son phagosome est directement isolé de la voie d'endocytose classique et ne passe même pas par les endosomes précoces (Joshi A. *et al.*, 2001). Cette vacuole s'associe avec des mitochondries et le réticulum endoplasmique.

Les mécanismes développés par les bactéries afin de dévier la voie classique d'internalisation et de dégradation d'une particule exogène sont nombreux (Finlay B. et Cossart., 1997 ; Méresse *et al.*, 1999). Nous citerons comme exemple des mécanismes identifiés chez *Mycobacterium* et d'autres chez *Salmonella* dans le point suivant. Les mécanismes impliqués dans le cas de *Brucella* seront ensuite abordés dans le point 2.4.

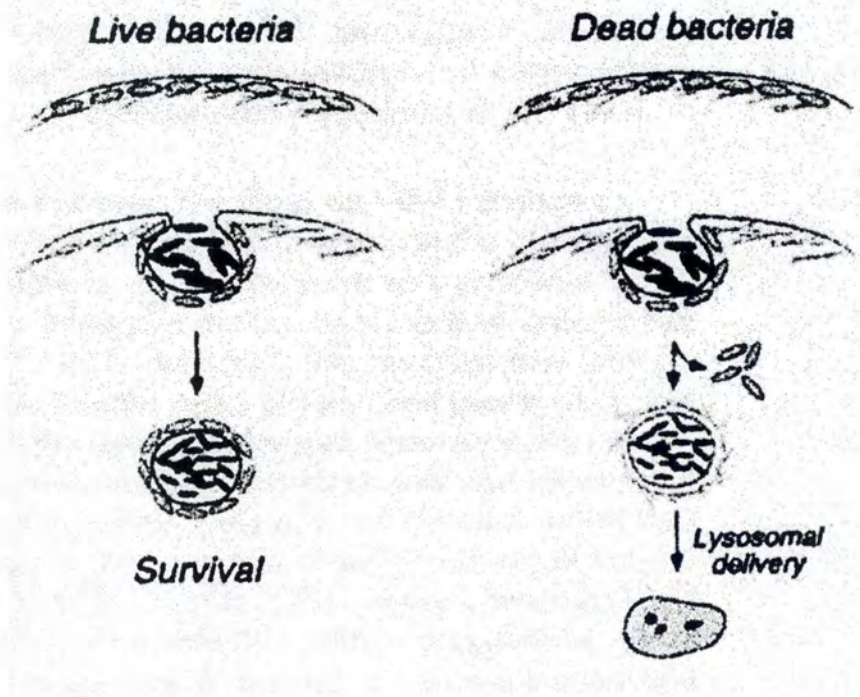


Figure 3 : Rôle de TACO dans la survie intracellulaire de *Mycobacterium*.

L'invasion déclenche le recrutement de la protéine TACO. Cette protéine est retenue sur la membrane phagosomale lorsque la bactérie est vivante, ce qui résulte en sa survie. Lors de l'ingestion d'une bactérie morte, le manteau de protéine se dissocie du phagosome qui est alors adressé aux lysosomes. (D'après Ferrari *et al.*, 1999).

2.3.1 Mycobacterium

Mycobacterium tuberculosis et *M. leprae* sont, respectivement, les agents de la tuberculose et de la lèpre (Cossart, Lecuit, 1999).

Après son internalisation, *Mycobacterium* se retrouve dans des compartiments Rab 5 positifs, il s'agit donc d'endosomes précoces. Elle n'est jamais localisée dans des compartiments Rab7 positifs, caractéristiques des endosomes tardifs (Via *et al.*, 1997). Après 7 jours d'infection, le compartiment contenant *Mycobacterium* est toujours Rab5 positif, ce qui suggère que l'endosome précoce est le compartiment final du pathogène (Via *et al.*, 1997). Cependant, ce compartiment a été modifié par la bactérie car il est LAMP positif et la V-ATPase a été exclue (Via *et al.*, 1997).

L'exclusion de la V-ATPase a pour conséquence d'inhiber l'acidification de la vacuole. Le pH intraphagosomal reste de l'ordre de 6 (6,2 – 6,5) (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994).

Le mécanisme responsable de sa survie intracellulaire implique, entre autres, une protéine de la cellule hôte appelée TACO (Tryptophane Aspartate-containing Coat protein) (Ferrari *et al.*, 1999).

Dans les cellules normales, TACO est associée avec le réseau cortical de microtubules, puisqu'elle co-localise avec les molécules de tubuline, le composant principal des microtubules (Ferrari *et al.*, 1999). Or la tubuline est impliquée dans la fusion phagosome-lysosome (Desjardins *et al.*, 1994).

Lorsque la cellule phagocyte *Mycobacterium*, TACO est recrutée au site d'internalisation, et s'associe avec la vésicule contenant la bactérie. Lorsqu'il s'agit d'une bactérie morte, la protéine TACO est rapidement relâchée et la vésicule suit la voie endocytique normale menant aux lysosomes. Par contre lorsqu'il s'agit d'une bactérie vivante, TACO est maintenue en surface, et la vésicule n'est pas délivrée aux endosomes tardifs ni aux lysosomes. (Figure 3). Si la cellule est mutée dans le gène codant pour TACO, les bactéries vivantes co-localisent rapidement avec les marqueurs des lysosomes. Ces résultats suggèrent que le fait de retenir TACO permet aux bactéries de fuir la voie endocytique normale (Ferrari *et al.*, 1999)

2.3.2 *Salmonella typhimurium*

Salmonella typhimurium est une bactérie entéroinvasive qui cause des septicémies après dissémination vers le foie et la rate. Elle est entre autres responsable de fièvres appelées fièvres typhoïdes (Cossart, Lecuit, 1999).

Après son internalisation, le phagosome contenant *Salmonella*, est caractérisé par la présence des marqueurs des endosomes précoces tels que EEA1, et le récepteur à la transferrine ce qui suggère que la bactérie passe par les endosomes précoces. Les marqueurs des endosomes tardifs et des lysosomes, par contre, ne caractérisent pas leur vacuole à l'exception de LAMP1. En effet, LAMP1 s'accumule au niveau de la vacuole de réplication de *Salmonella typhimurium*. Contrairement à *Mycobacterium*, la vacuole de *Salmonella typhimurium* est enrichie en V-ATPase et l'acidification semble être nécessaire à la réplication du pathogène (Méresse *et al.*, 1999).

Salmonella possède 2 systèmes de sécrétion de type III.

Le premier, *Inv/Spa*, situé au niveau de l'îlot de pathogénicité SPI 1, est exprimé extracellulairement et médie l'invasion des cellules phagocytaires non professionnelles (Finlay et Cossart, 1997). Le second, *Spi/Ssa*, situé dans l'îlot de pathogénicité SPI 2, est exprimé intracellulairement et s'avère donc essentiel pour la survie dans les macrophages (Uchiya *et al.*, 1999). Ce système est en effet responsable de l'exportation, hors de la vacuole, de la protéine SpiC. Une fois sécrétée par *Salmonella typhimurium*, SpiC se localise en membrane du phagosome et semble inhiber la fusion phagosome-lysosome (Uchiya *et al.*, 1999).

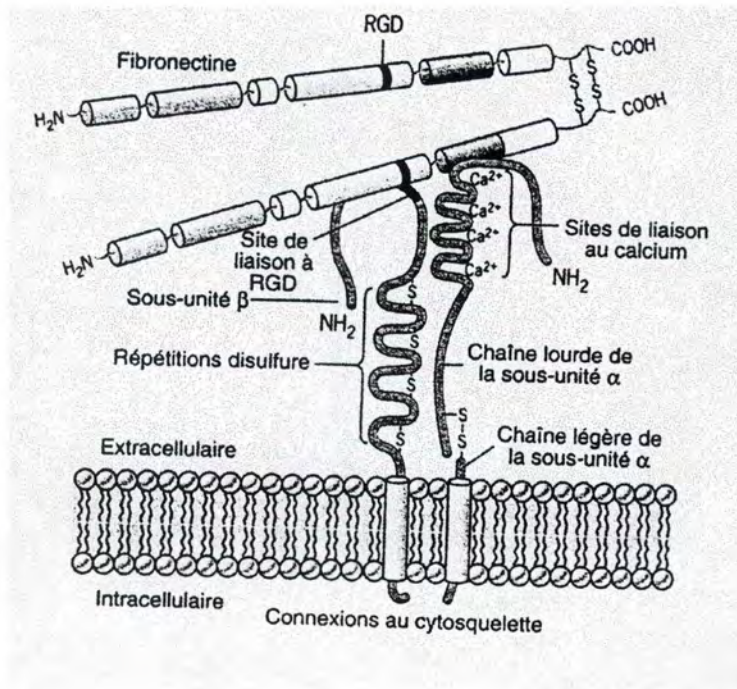


Figure 4 : Structure des intégrines. Schéma d'un hétérodimère d'intégrine, lié à une molécule de fibronectine. La sous-unité β possède le site de liaison RGD (arginine-glycine-aspartate) qui reconnaît le ligand. La sous-unité α possède quatre motifs de liaison aux cations (Ca^{2+}). (D'après G. Karp, p.257).

2.4. Infection des cellules par *Brucella*

Brucella infecte aussi bien les cellules phagocytaires professionnelles (macrophages, polymorphonucléaires neutrophiles, ...) que les cellules phagocytaires non professionnelles (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules épithéliales, ...) (Pizarro-cerdá, E. Moreno, 1999). Elle pénètre dans la cellule hôte par phagocytose. Intracellulairement, *Brucella* suit un trajet bien spécifique, et différent selon que la cellule infectée est une cellule phagocytaire professionnelle ou non.

2.4.1 Invasion :

Les mécanismes mis en œuvre pour envahir la cellule hôte sont encore méconnus (Pizarro-cerdá, E. Moreno, 1999). Quoi qu'il en soit, l'activité métabolique de la bactérie n'est pas requise pour son entrée en cellule (Detilleux *et al.*, 1991). Cette entrée implique probablement, une reconnaissance entre une molécule de la bactérie et son récepteur spécifique sur la cellule hôte, éventuellement via les intégrines (Pizarro-cerdá, E. Moreno, 1999 ; Gross *et al.*, 1998). Des travaux récents ont en effet montré que l'invasion peut être inhibée compétitivement par ajout de fibronectine que l'on sait lier les intégrines (Campbell *et al.*, 1994). De plus, en l'absence de Ca^{2+} ou de Mg^{2+} , l'internalisation est moins efficace (Rittig *et al.*, 2001). Or le Ca^{2+} et le Mg^{2+} interviennent dans la stabilisation des sous-unités α et β des intégrines ((G. Karp, 1998), p.259). (Figure 4). Ce qui suggère un rôle des intégrines dans l'internalisation de *Brucella*.

2.4.2 Trafic intracellulaire en cellules non phagocytaires :

Dans les premières minutes de l'infection, *Brucella* se trouve dans un phagosome caractérisé par la présence de marqueurs des endosomes précoces tels que la GTP binding protein Rab5, EEA1 (Early Endosomal Antigen 1), ou encore les récepteurs à la transferrine (Pizarro-cerdá *et al.*, 1998a).

Après 30 minutes, il n'y a plus aucune bactérie dans les endosomes précoces. Cependant, *Brucella* ne se trouve pas dans les endosomes tardifs, elle ne suit donc pas la voie endocytaire classique. En effet, *Brucella* ne se trouve jamais dans un compartiment caractérisé par les



Figure 5 : Micrographie électronique représentant *Brucella* dans son compartiment multimembranaire de type autophagosome (1). Le 2 indique un phagosome contenant une bactérie. (D'après Pizarro-cerda, 1998a).

b = *Brucella*

protéines membranaires des endosomes tardifs telles que la GTPase Rab7, ou le récepteur à mannose-6-phosphate (Pizarro-cerdá *et al.*, 1998a). Elle empêche également la fusion du phagosome avec les lysosomes (Pizarro-cerdá *et al.*, 1998b). Cependant, cette perturbation ne concerne que la vacuole contenant *Brucella*, et pas le reste du trafic (Nareoni *et al.*, 2001).

Une heure après l'infection, le compartiment intracellulaire de *Brucella* est positif pour LAMP, un marqueur lysosomal, mais négatif pour la cathepsine D qui est une enzyme vacuolaire du lysosome. Cette vacuole est aussi multimembranaire, et positive pour le marqueur du réticulum endoplasmique (RE), sec61 β , ce qui suggère qu'il s'agit d'un autophagosome issu du RE. (Figure 5). Cette hypothèse a été confirmée par l'utilisation de monodansylcadaverine, qui s'accumule préférentiellement au niveau des autophagosomes (d'où son utilisation en tant que sonde afin de détecter les vacuoles autophagiques) (Pizarro-cerdá *et al.*, 1998a), et un inhibiteur de l'autophagie comme le 3-MA (3-méthylkadenine) diminue l'habilité de la bactérie à se multiplier (Pizarro-cerdá, E. Moreno, 1999).

Différentes hypothèses ont été avancées (Pizarro-cerdá *et al.*, 2000) :

- Soit le phagosome fusionne avec une vacuole autophagique
- Soit le réticulum endoplasmique s'invagine autour du compartiment

Une troisième alternative a été proposée. *Brucella* s'échapperait dans le cytoplasme où elle est capturée par un autophagosome. Cette hypothèse est toutefois improbable car toutes les observations en microscopie électronique permettent l'observation de *Brucella* dans une vacuole et non à l'extérieur d'une vacuole (Pizarro-cerdá *et al.*, 2000). De plus, Köhler *et al.*, 2001, ont créé un mutant de *Brucella suis* capable de sécréter la listériolysine. Cette enzyme est responsable de la lyse de la vacuole de phagocytose de *Listeria* lors de l'infection des cellules. En étant capable de produire et de sécréter la listériolysine, *B. suis* se retrouve, lors de l'infection de cellules, dans une vacuole partiellement disruptée et non dans le cytoplasme de la cellule. Cette localisation cellulaire ne permet pas à *Brucella* de se multiplier. Ces observations démontrent que pour se répliquer, *Brucella* doit être dans une parfaite vacuole. De plus elles nous suggèrent que *Brucella* ne transite pas par le cytoplasme avant de retourner dans une vacuole pour se répliquer car dans ce cas, après la lyse partielle de sa vacuole par la listériolysine, elle aurait du être capable de réintégrer une nouvelle vacuole via l'autophagie et donc poursuivre son chemin vers sa vacuole de réplication.

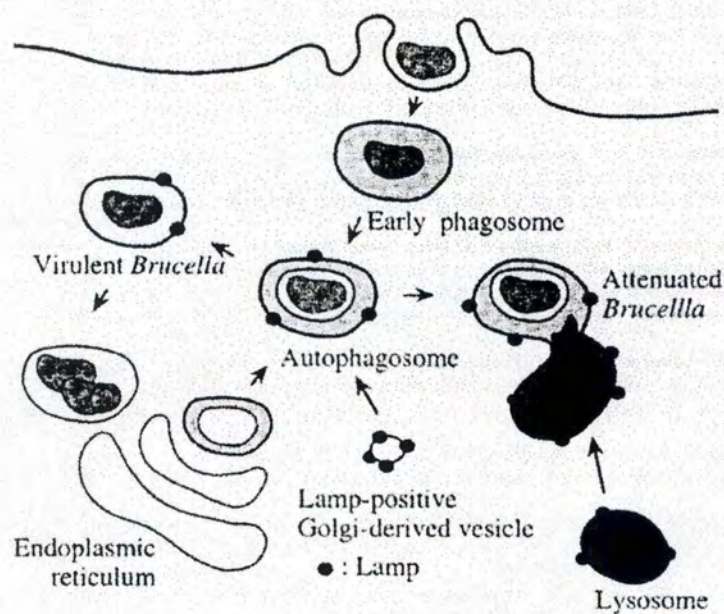


Figure 6 : Trafic intracellulaire de *Brucella* en cellules non phagocytaires. Une souche virulente et atténuée de *Brucella* sont localisées dans une vacuole qui fusionne successivement avec les endosomes précoces et un compartiment de type autophagosomal. Après leur passage par les autophagosomes, alors que la souche atténuée ne peut empêcher la fusion avec les lysosomes où elle est dégradée, la souche virulente accède au RE où elle se réplique. (D'après Pizarro-cerda, 1998b).

24 heures post-infection, la bactérie virulente se trouve dans un compartiment LAMP négatif, sec61 β positif, PDI (Protein Disulfide Isomerase) positif, et ribophorine positif qui sont tous des marqueurs du RE. *Brucella* semble donc se multiplier dans une vacuole caractéristique du RE (Pizarro-cerdá *et al.*, 1998a). (Figure 6). Cette association avec le RE permettrait à la bactérie de bénéficier de la machinerie biosynthétique de la cellule hôte.

2.4.3 Trafic intracellulaire en cellules phagocytaires :

Contrairement à ce qui était envisagé jusqu'à peu, le trafic de *Brucella* en cellules phagocytaires n'est pas le même qu'en cellules non phagocytaires. En effet, le compartiment de multiplication de la bactérie n'est pas une structure homologue au réticulum endoplasmique (Arenas *et al.*, 2000).

Brucella altère l'adressage du phagosome vers les compartiments hydrolytiques et empêche la fusion avec les endosomes nouvellement formés. Cependant, Arenas *et al.*, 2000, ont montré qu'environ 60% des bactéries sont localisées dans une vacuole semblable à un phagolysosome après 24 heures. En effet, ils ont observé une co-localisation entre *B.abortus* et le lysoSensor, une molécule qui s'accumule au niveau des compartiments acides. Des données de microscopie électronique ont également révélé que les bactéries se trouvent dans un compartiment contenant des billes d'or colloïdal, billes préalablement chargées dans des lysosomes préformés. Cependant, les bactéries ne sont pas dégradées, mais apparaissent être résistantes aux activités anti-bactériennes telles que l'explosion respiratoire et la production de dérivés réactionnels de l'O₂ (ROI). Outre la superoxyde dismutase et la catalase, la résistance aux espèces réactives de l'oxygène telles que l'H₂O₂ ou l'anion superoxyde O₂^{•-} semble faire intervenir le gène *cydB* qui intervient dans la chaîne de transport d'électrons de *Brucella* (Endley *et al.*, 2001).

Il a été montré que *Brucella* n'évite pas l'acidification du phagosome d'un pH de 6,5 à un pH de 4 (Porte *et al.*, 1999 ; Arenas *et al.*, 2000). Cette acidification implique la V-ATPase et est essentielle pour la répllication en macrophages (Porte *et al.*, 1999). En effet si le pH acide est neutralisé par ajout de chlorure d'ammonium (NH₄Cl), la bactérie ne se réplique plus. Il semble que l'acidité du phagosome soit, comme c'est le cas pour *Salmonella typhimurium*,

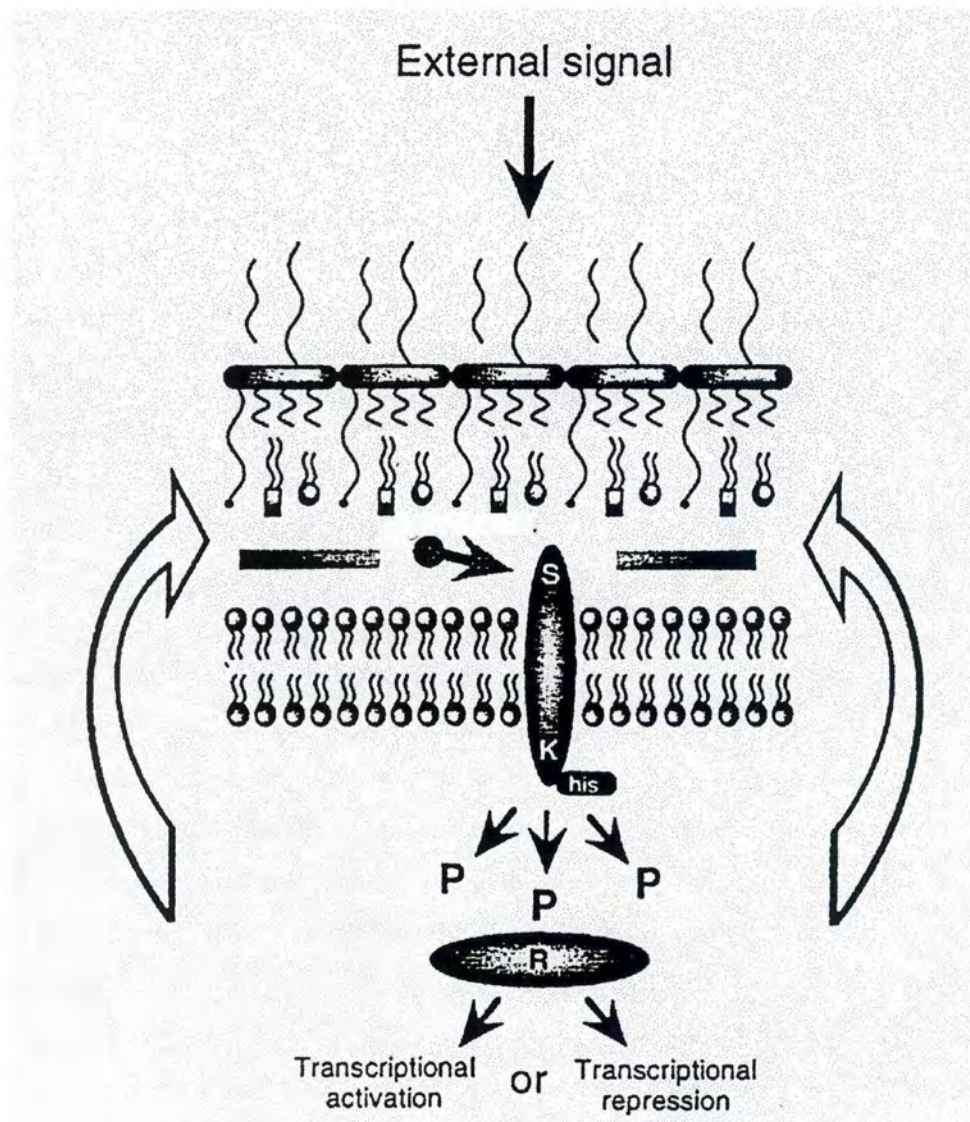


Figure 7 : Représentation schématique du système BvrR/BvrS. (D'après Pizarro-cerdá, 1999).

requis pour réguler différents gènes impliqués dans la survie et la multiplication du pathogène (Porte *et al.*, 1999).

2.4.4 Mécanismes moléculaires impliqués dans le trafic intracellulaire de *Brucella*

Parmi les mécanismes impliqués dans le trafic intracellulaire de *Brucella* en cellules HeLa, on trouve le système à deux composantes BvrR/BvrS, le système de sécrétion de type IV encodé par l'opéron *virB*, et la protéine VjbR. Ces 2 derniers mécanismes font l'objet de nos recherches, ils seront détaillés dans les points suivants.

2.4.4.1 BvrR/BvrS

Le système BvrR/BvrS (*Brucella* virulence related regulatory protein/ *Brucella* virulence related sensor) est impliqué dans la pénétration et la survie de *Brucella* en cellules HeLa et en macrophages. Un mutant *bvrR* après avoir été internalisé par les cellules HeLa est caractérisé par une vacuole positive pour EEA1 ce qui suggère qu'il passe par les endosomes précoces. La vacuole acquiert ensuite les marqueurs caractéristiques des endosomes tardifs et des lysosomes (LAMP, Cathepsine D) (Sola-Landa *et al.*, 1998 ; Pizzaro-Cerda *et al.*, 1998). La vacuole n'acquiert jamais le marqueur sec61 β . Ces résultats suggèrent que le mutant *bvrR* n'est pas capable de passer par les autophagosomes et se dirige directement vers les lysosomes après son passage par les endosomes précoces (Sola-Landa *et al.*, 1998 ; Pizzaro-Cerda *et al.*, 1998).

Le système BvrR/BvrS est un système de régulation à 2 composantes. (Figure 7). *bvrR* encode un régulateur transcriptionnel, tandis que *bvrS* encode l'histidine kinase senseur (Sola-Landa *et al.*, 1998a). De manière générale, le senseur permet aux bactéries de détecter la présence de stimuli dans son environnement ce qui conduit à son activation. Une fois activé le senseur va à son tour activer le régulateur par un jeu de phosphorylation. Chez *Agrobacterium* et *Rhizobium* qui sont proches de *Brucella* sur la chaîne évolutive, on trouve respectivement les systèmes ChvG/ChvI et ExoS/ChvI. Chez *Agrobacterium* le système est impliqué dans la synthèse et/ou l'assemblage de composants de la membrane externe qui interviennent dans l'interaction avec la cellule eucaryote (Charles et Nester, 1993). Chez *Rhizobium*, il joue un rôle crucial dans l'établissement de la symbiose avec la plante (Cheng et Walker, 1998).

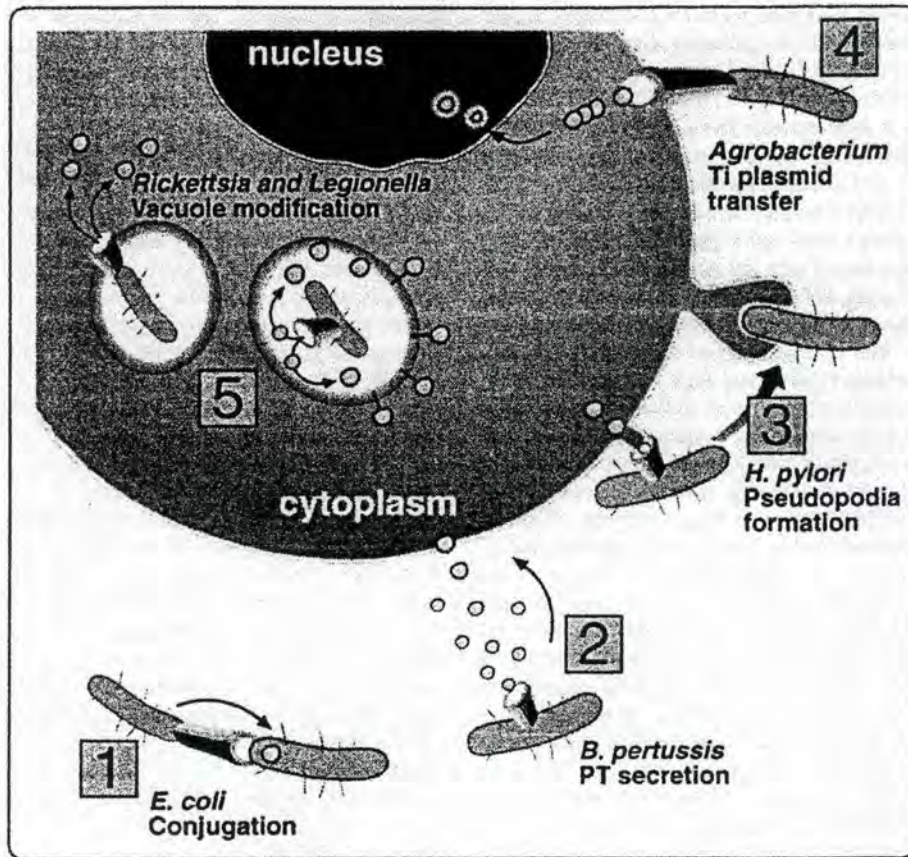


Figure 8 : Schéma des différentes fonctions du système de sécrétion de type IV.

(1) *E.coli* utilise le système de sécrétion de type IV pour transférer de l'ADN par conjugaison, (2) *B.pertussis* pour sécréter la toxine pertussis (PT) dans le milieu extérieur. (3) Chez *Helicobacter pylori*, le type IV permet d'induire la formation d'un pseudopode qui lui permet d'être en contact avec la cellule. *A.tumefaciens* s'en sert pour transférer son ADN oncogénique, plasmide Ti, dans le noyau de la cellule végétale (4), tandis que *Legionella*, *Rickettsia* et *Brucella* l'utiliseraient pour délivrer des macromolécules vers les vacuoles ou le cytoplasme de la cellule hôte afin de permettre à la bactérie de maturer sa vacuole en vacuole de répliation (5). (D'après Covacci *et al.*, 1999)

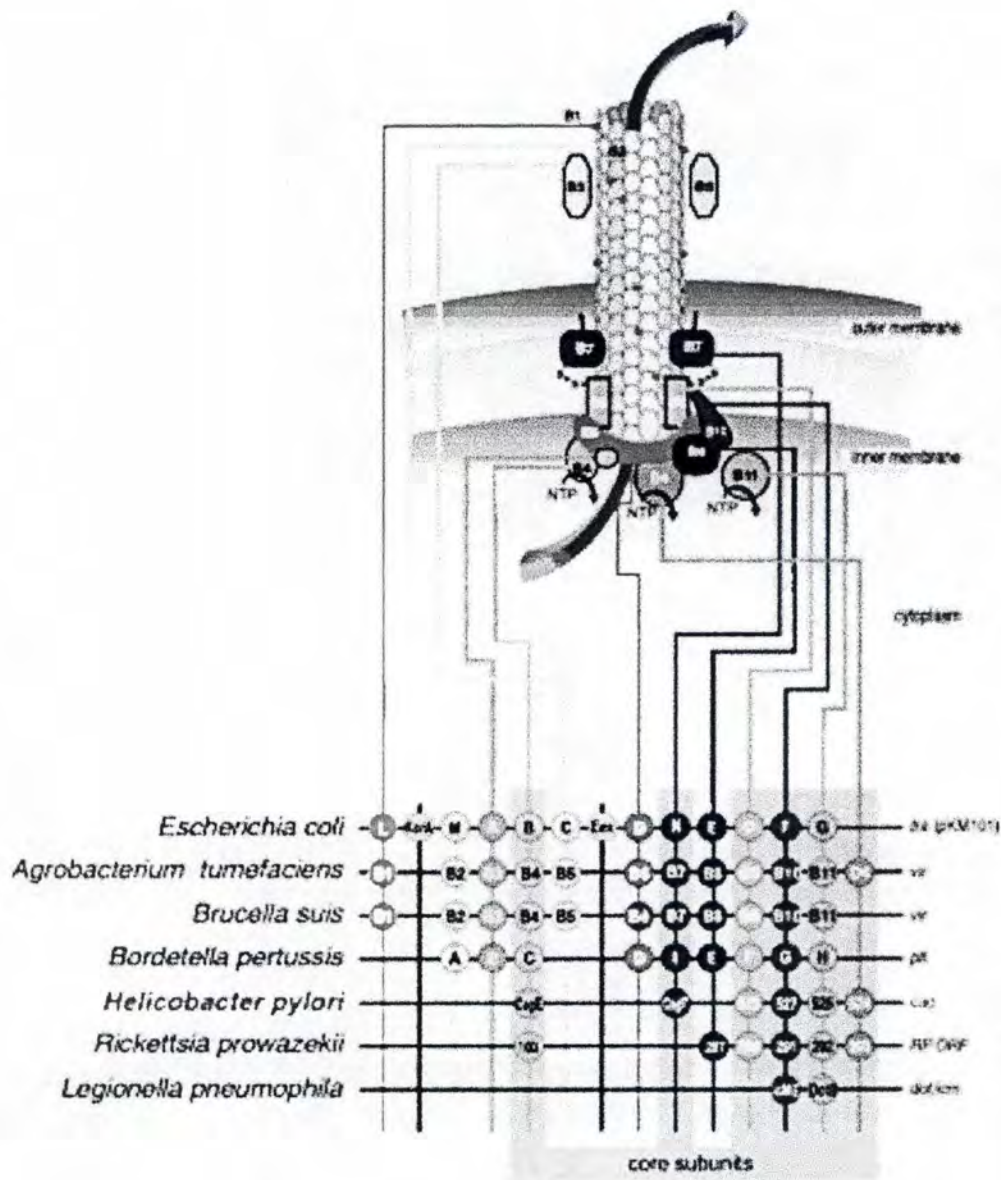


Figure 9: Représentation schématique de la structure putative de l'appareil de sécrétion de type IV d'*Agrobacterium tumefaciens*. (au dessus) et des opérons l'encodant dans différentes bactéries (en dessous). Le schéma a été réalisé avec les données expérimentales accumulées chez *E. coli* et *Agrobacterium*. Chaque gène est relié à la protéine qu'il encode dans la structure putative. Les protéines sont nommées sur base du système VirB d'*Agrobacterium* (B signifie VirB). NTP signifie activité ATPase. La large flèche au sommet de la structure putative indique le transfert de macromolécules sécrétées à travers la membrane des bactéries à Gram négatif. Dans les opérons, seuls les gènes qui sont homologues sont représentés. Le "core subunits" correspond aux protéines nécessaires à l'assemblage minimale d'une structure de type IV. ORF, Open Reading Frame. (D'après A. Covacci, 1999).

2. 4. 4. 2 VirB

L'opéron *virB* code pour un système de sécrétion bactérien appelé système de sécrétion de type IV. Ce système intervient chez de nombreuses bactéries pathogènes à Gram négatif et symbiontes de plantes afin d'exporter des molécules effectrices durant l'infection.

Pour faciliter la compréhension, nous allons d'abord expliquer ce qu'est le système de sécrétion de type IV avant d'aborder son implication dans le trafic intracellulaire de *Brucella*.

Le système de sécrétion de type IV permet l'exportation de composants macromoléculaires à travers la membrane bactérienne jusqu'à l'espace extracellulaire ou encore à l'intérieur d'autres cellules (Winans *et al.*, 1996). Chez *E.coli*, le système Tra forme un pilus conjugatif qui permet le transfert d'ADN d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse. Le système Ptl chez *Bordetella pertussis* est responsable de la sécrétion de la toxine pertussique dans le milieu extérieur. Tandis que les systèmes de sécrétion de type IV des pathogènes intracellulaires *Legionella* et *Rickettsia*, déchargent, dans le cytoplasme de la cellule hôte, des effecteurs moléculaires qui modifient le trafic vacuolaire afin entre autre d'éviter la fusion avec les phagolysosomes, et de favoriser la multiplication. *Helicobacter pylori* induit, via la sécrétion de facteurs dans le cytosol de la cellule hôte, l'émission d'un pseudopode lui permettant de s'attacher en membrane de la cellule (Covacci *et al.*, 1999 ; Christie and Covacci, 2000). (Figure 8).

Le système de sécrétion de type IV de référence est celui d'*Agrobacterium*. Il est responsable du transfert d'ADN oncogénique au noyau des cellules de la plante qu'il infecte. Ce phénomène résulte en la croissance incontrôlée de ces cellules, menant à la formation d'un tissu tumoral. L'exportation de l'ADN oncogénique est due à des protéines de virulence nommées Vir. L'appareil de sécrétion est formé de 11 protéines VirB, et d'une protéine VirD4. Elles se répartissent en trois groupes fonctionnels, les protéines de canal, les ATPases cytoplasmiques, et les protéines formant le pilus (Christie and Covacci, 2000). VirB4, VirB11, et VirD4 sont 3 ATPases qui fournissent l'énergie nécessaire au fonctionnement du mécanisme. La sous unité majeure du pilus est VirB2. Il est également constitué de VirB3, VirB5, et d'un sous-produit de VirB1, VirB1*, qui permet le contact entre le donneur et le récepteur. Le canal périplasmique est formé des protéines VirB6, 7, 8, 9, et 10 (Christie and Covacci, 2000 ; Christie, 2001). (Figures 9)

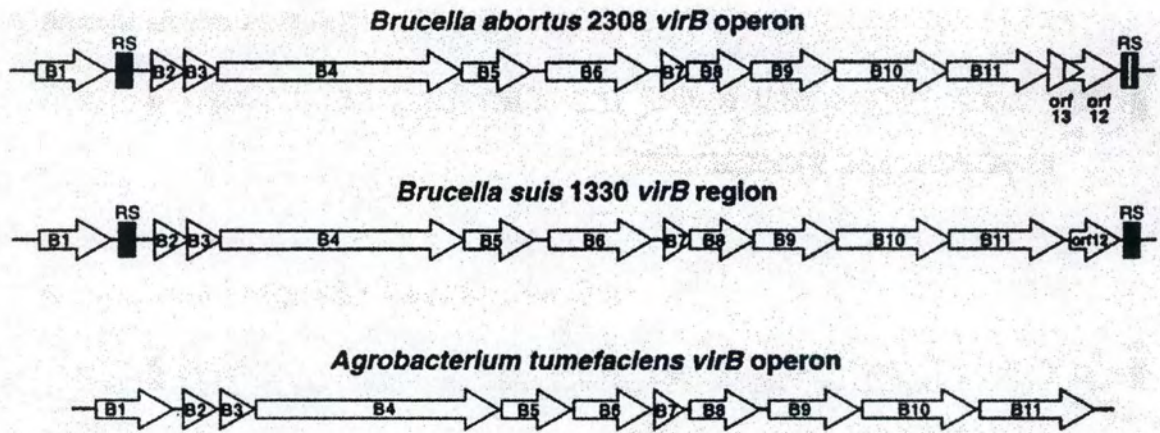


Figure 10 : Représentation schématique de l'opéron *virB* de *B.abortus*, *B.suis*, et *Agrobacterium tumefaciens*.

RS = repeat sequences, B signifie *virB*

Implication de VirB chez *Brucella*

Le locus *virB* de *Brucella* a la même organisation génomique que chez *Agrobacterium*, si ce n'est qu'il est composé de douze ORF (11 *virB* et l'ORF12) chez *B.suis*, et de treize ORF (11 *virB*, et les ORF 12 et 13) chez *B.abortus* (O'Callaghan *et al* , 1999 ; Sieira *et al.*, 2000). L'ORF 12 ne semble pas être nécessaire à la multiplication de *Brucella* en macrophages (O'Callaghan *et al* , 1999). L'ORF 13 n'a pas encore été caractérisée. (Sieira *et al.*, 2000). Les onze protéines VirB sont essentielles pour la survie et la multiplication intracellulaire en macrophages et en cellules HeLa (O'Callaghan *et al* , 1999 ; Sieira *et al.*, 2000). (Figure 10).

Dans les 10 minutes après l'infection de cellules HeLa, les mutants de *B. melitensis* 16M pour *virB2*, *virB4*, et *virB9* interagissent avec les endosomes précoces tout comme la souche sauvage. Quatre heures après l'infection les mutants et la souche sauvage se trouvent dans une vacuole caractérisée par la présence de LAMP et de sec61 β ce qui suggère que cette vacuole soit un autophagosome. Cependant, après 12 à 24 heures d'infection le compartiment contenant les mutants reste LAMP positif au contraire de celui contenant la souche sauvage. L'absence de Cathepsine D dans les vacuoles contenant les mutants suggère que ces vacuoles n'ont pas fusionné avec les lysosomes. Les mutants *virB* sont donc toujours capables d'inhiber la fusion phagolysosomale (Comerci *et al.*, 2001 ; Delrue *et al.*, 2001). Toutefois, ils ne semblent pas capables d'atteindre leur compartiment de réplication car après 24 ou 48 heures d'infection aucun mutant *virB* ne s'est multiplié dans les cellules (Comerci *et al.*, 2001 ; Delrue *et al.*, 2001). Un mutant *virB 2* qui infecte des cellules HeLa en présence de la souche sauvage est capable de se répliquer (Leonard Sandrine, 2000). Ce résultat indique que le mutant *virB* est capable de se répliquer mais uniquement lorsque la souche sauvage lui permet d'atteindre sa niche de réplication, ceci grâce à son système de sécrétion intact. Les gènes *virB* ne sont donc pas impliqués dans la réplication, mais bien dans l'adressage de la bactérie à sa vacuole de réplication.

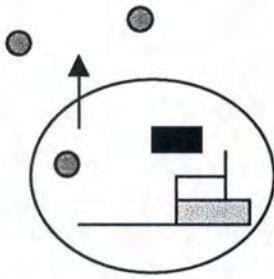
Implication du quorum sensing sur l'opéron *virB* chez *Brucella*

Les bactéries ont longtemps été perçues comme des entités individuelles. Cependant, l'existence de signaux qui leur permettent de communiquer entre elles montre qu'elles sont capables de vivre en tant que groupe. Le langage des bactéries est le fruit de petites molécules

Organism	Major signal molecule	Phenotype
<i>Vibrio fischeri</i>	3-Oxo-C6-HSL	Bioluminescence
<i>Vibrio harveyi</i>	3-Hydroxy-C4-HSL	Bioluminescence
	?	
<i>Vibrio anguillarum</i>	?	3-Oxo-C10-HSL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3-Oxo-C12-HSL	Multiple extracellular enzymes, RhlR, Xcp, biofilm formation
	C4-HSL	Multiple extracellular enzymes, rhamnolipid, RpoS, secondary metabolites
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	C6-HSL	Phenazine antibiotics
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3-Oxo-C8-HSL	Ti plasmid conjugation
<i>Erwinia carotovora subsp. carotovora</i>	3-Oxo-C6-HSL	Exoenzymes
		Carbapenem antibiotics
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	3-Oxo-C6-HSL	Pectate lyases
	C6-HSL	
<i>Erwinia stewartii</i>	3-Oxo-C6-HSL	Exopolysaccharide, virulence factors
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	C6-HSL	RhiABC rhizosphere-expressed genes, nodulation
	C8-HSL	
	3-Hydroxy-7-cis-C14-HSL	
<i>Rhizobium etli</i>	?	Restriction of number of nitrogen-fixing nodules
<i>Chromobacterium violaceum</i>	C6-HSL	Exoenzymes, antibiotics, cyanide, violacein
<i>Burkholderia cepacia</i>	C8-HSL	Protease, siderophores
<i>Aeromonas hydrophila</i>	C4-HSL	Exoprotease production
<i>Aeromonas salmonicida</i>	C4-HSL	Extracellular protease
<i>Ralstonia solanacearum</i>	C8-HSL	?
<i>Serratia liquifaciens</i>	C4-HSL	Extracellular protease, swarming
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	7-cis-C14-HSL	Dispersal from bacterial aggregates
<i>Enterobacter agglomerans</i>	3-Oxo-C6-HSL	?
<i>Escherichia coli</i>	?	Cell division, attachment and effacing lesion formation
<i>Yersinia enterocolitica</i>	C6-HSL	?
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	C8-HSL	?

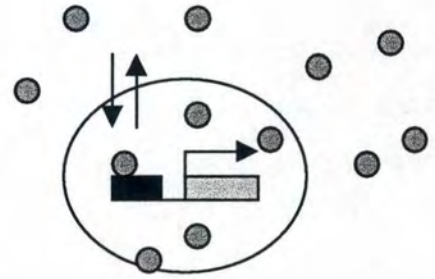
Figure 11 : Tableau reprenant quelques systèmes de Quorum Sensing utilisés par des bactéries Gram négatif (D'après De Kievit, Iglewski, 2000).

Low cell density
Low [AHL]



No transcription of target genes

High cell density
High [AHL]



Transcription of target genes

Signal (AHL) = ●
Transcriptional activator = ■

Figure 12°: Le quorum sensing chez les bactéries gram négatif implique deux partenaires, le signal et le régulateur transcriptionnel. L'accumulation du signal se fait de manière densité de population pendant jusqu'à un niveau où il lie le régulateur qui induit l'expression de gènes cibles.

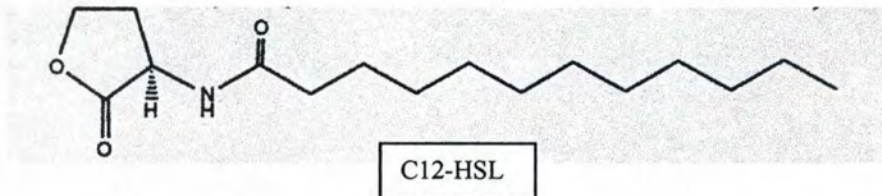


Figure 13: Structure chimique de la C12-HSL de *Brucella melitensis*.

signal auto-inductrices diffusibles. Chez la plupart des bactéries à Gram négatif, il s'agit de N-acyl homosérines lactones (AHL). (Figure 11). Les bactéries produisent ces signaux même à faible densité de population. Mais, ce n'est que lorsque la densité de population atteint un niveau seuil, que leur concentration devient suffisante pour déclencher une réponse chez ces bactéries. (Figure 12). Les bactéries réagissent alors de manière coordonnée via la liaison des AHL à des régulateurs transcriptionnels qui activent ou répriment des gènes cibles. Ce phénomène est appelé : " le quorum sensing " (De Kievit, Iglewski, 2000 ; Fuqua, Winans and Greenberg, 1996).

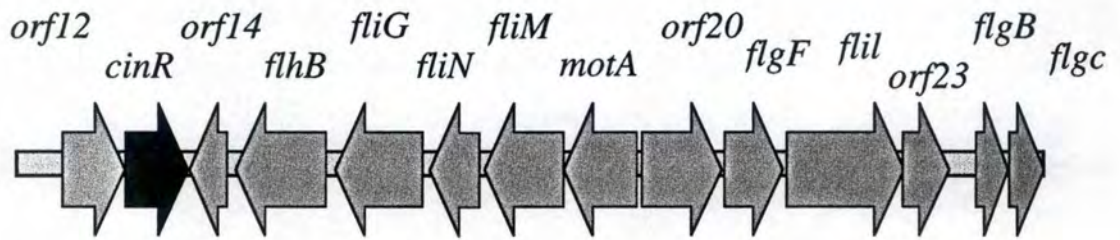
Des travaux réalisés au laboratoire ont permis de découvrir, chez *Brucella*, la présence d'une AHL, une N-dodecanoyl-homoserine lactone (C₁₂-HSL) (Taminiau *et al.*, 2001). (Figure 13).

L'opéron *virB* de *B.melitensis* semble être une des cibles de régulation par la C₁₂-HSL. Il apparaît en effet réprimé de façon densité-dépendante en fin de phase exponentielle, ou lors de l'ajout de C₁₂-HSL à des cellules en milieu de phase exponentielle (Taminiau *et al.*, 2001). Ces résultats contredisent les travaux de Sieira *et al.*, 2000, qui montrent une activation de *virB* en phase stationnaire.

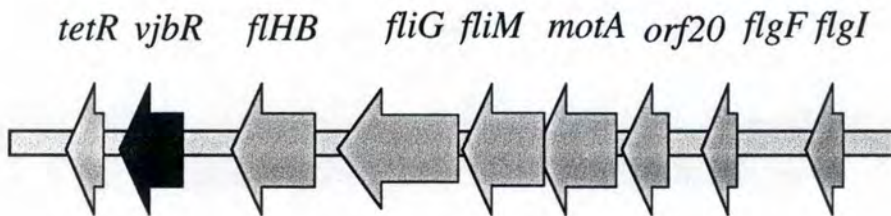
2. 4. 4. 2 VjbR

Un mutant dans l'ORF *vjbR* (mutant 32D3) a été isolé au laboratoire suite à un criblage d'une banque de mutants transpositionnels mini-Tn5K*mcat* de *Brucella melitensis* 16M en cellules HeLa (Delrue *et al.*, 2001). Ce criblage avait pour but d'identifier des mutants affectés dans leur capacité à rejoindre leur vacuole de réplication en cellules HeLa. Le mutant 32D3 atteint dans sa survie intracellulaire après 48 heures d'infection est aussi incapable de se multiplier dans les cellules HeLa. Ce phénotype est identique à celui observé pour les mutants *virB* après 48 heures d'infection (Delrue R.-M., communication personnelle).

Une étude du trafic intracellulaire du mutant transpositionnel *vjbR* a été réalisée au laboratoire par immunofluorescence. Elle démontre que le mutant *vjbR* passe par les endosomes précoces tout comme les mutants *virB* et la souche sauvage après 10 minutes d'infection des cellules HeLa. Après 4 heures d'infection, le mutant est localisé dans une vacuole LAMP et sec 61β positifs comme les mutants *virB* et apparaît rester dans cette vacuole après 24 heures



Rhizobium



Brucella

Figure 14 : Comparaison schématique de l'organisation génomique des gènes flagellaires chez *Rhizobium* et chez *Brucella* et localisation de *vjbR* et de *cinR*.

d'infection. Comme les mutants *virB*, le mutant *vjbR* n'est pas capable de se multiplier dans cette vacuole (Delrue R.-M., communication personnelle).

L'analyse génomique de l'ORF *vjbR* révèle qu'elle est localisée au sein de gènes flagellaires (Figure 14). La protéine encodée par l'ORF *vjbR* est un régulateur transcriptionnel de la famille LuxR, qui comprend de nombreux régulateurs impliqués dans le quorum sensing. Le plus proche homologue de VjbR est CinR (*Rhizobium meliloti*).

Tout comme l'ORF *vjbR*, l'ORF *cinR* est localisée dans un cluster de gènes flagellaires (Figure 14). En nous intéressant au régulateur, nous nous sommes rendus compte que les données de la littérature font de CinR la pièce maîtresse d'un réseau d'interactions entre les différents systèmes du quorum sensing chez *Rhizobium* (Lithgow *et al.*, 2000). *Rhizobium* possède plusieurs régulateurs du quorum sensing dont CinR, RhiR, ou encore RaiR (Rodelas *et al.*, 1999 ; Lithgow *et al.*, 2000). Des travaux récents ont démontré que l'expression des régulateurs RhiR et RaiR est régulée par CinR. De plus, CinR et donc le quorum sensing régulent l'expression du système de conjugaison Tra de *Rhizobium* qui est, pour rappel, un système de sécrétion de type IV (Lithgow *et al.*, 2000). L'homologie entre VjbR et CinR, leur localisation chromosomique nous permettent d'émettre des hypothèses quant à la fonction de VjbR. Ces hypothèses seront présentées dans le but du travail.

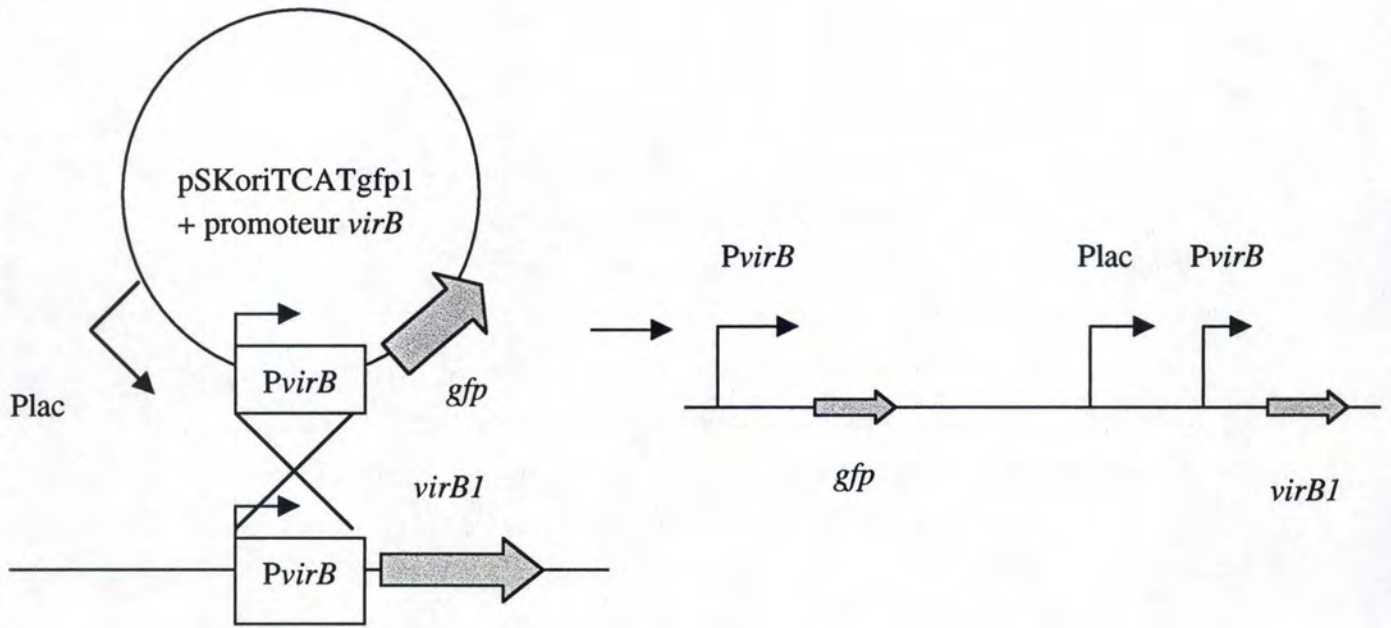
II BUT DU MEMOIRE

L'objectif de ce mémoire est d'analyser l'implication éventuelle du régulateur transcriptionnel VjBR dans la régulation de l'expression de l'opéron *virB*, du gène *fliF* et du gène *babR*. Le choix de ces trois gènes comme cibles potentiellement régulées par VjBR repose sur les données expérimentales suivantes :

- Des mutants dans l'opéron *virB* et le mutant *vjbR* (32D3) sont tous deux incapables d'atteindre la vacuole de réplication dans les cellules HeLa. Après 48 heures d'infection, ils restent localisés dans un compartiment qui pourrait être un autophagosome. De plus, il a été montré, par des travaux réalisés au laboratoire, que les homosérines lactones réprime la transcription de *virB*.
- L'analyse génomique de l'ORF *vjbR* révèle que *vjbR* se trouve dans un cluster de gènes flagellaires avec la même organisation génomique que chez *Rhizobium* qui est décrit comme une bactérie à Gram-négatif flagellée. Le mutant 32D3 est complété par l'apport de la copie sauvage de *vjbR*, ce qui met hors de cause une mutation dans les gènes flagellaires. Bien que *Brucella* soit décrite comme non-flagellée, il a été récemment démontré que *fliF*, qui code pour la protéine flagellaire FliF du MS-ring, est impliquée dans la virulence de *Brucella* (A. Dricot 2001). De plus, le gène *fliF* s'exprime dans les macrophages après plus de 24 heures d'infection (Khöler, communication personnelle).
- VjBR est un régulateur du quorum sensing chez *Brucella*. Récemment au laboratoire un second régulateur lié au quorum-sensing a été identifié et nommé BabR. Il est possible que, comme le fait CinR, le plus proche homologue de VjBR, chez *Rhizobium*, VjBR régule l'expression de BabR. Pour ces trois gènes, nous comptons analyser les différences d'expression qui existent entre une souche sauvage et une souche où le régulateur VjBR est non fonctionnel.

À cette fin, nous avons choisi d'utiliser le gène rapporteur *gfp* (Green Fluorescent Protein).

A



B

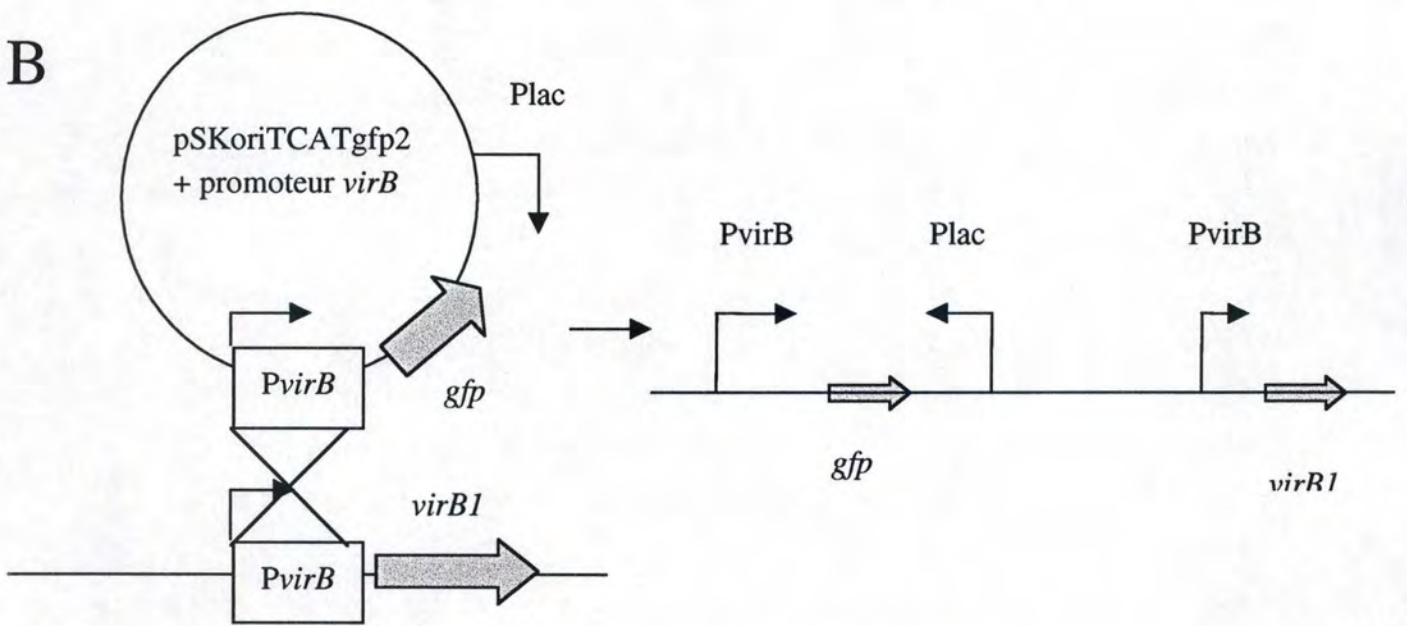


Figure 1 : Schéma de l'intégration des fusions traductionnelles dans le génome de *Brucella*.

En (A), cas où le plasmide de départ est le *pSKoriTCATgfp1*. En (B) cas où le plasmide de départ est le *pSKoriTCATgfp2*. En (A), l'expression de l'opéron *virB* risque d'être sous la dépendance du *Plac*, modifiant la physiologie de la cellule. En (B) le *Plac* n'a plus d'effet sur l'opéron.

III. RESULTATS

1. Préliminaires

Afin d'étudier l'effet de l'absence de la protéine VjbR sur l'expression de l'opéron *virB*, et des gènes *fliF*, et *babR*, nous avons choisi d'intégrer dans le génome d'un mutant *vjbR*, le gène rapporteur *gfp* placé sous le contrôle des promoteurs putatifs des gènes candidats.

Cette intégration est basée sur l'utilisation d'un plasmide contenant le gène rapporteur *gfp* en amont duquel seront clonés les promoteurs putatifs des gènes d'intérêt en fusion traductionnelle. De tels plasmides, nommés pSKoriTCATgfp1 et pSKoriTCATgfp2, sont disponibles au laboratoire.

Ces plasmides ne sont pas répliatifs chez *Brucella*, dès lors, pour se maintenir, ils doivent s'intégrer dans le génome de la bactérie. Cette intégration se fera par recombinaison entre les promoteurs putatifs des gènes candidats des constructions et leur homologue dans le génome.

Les promoteurs de l'opéron *virB*, et des gènes *fliF* et *babR* n'étant pas, à ce jour, définis, nous avons considéré, comme promotrice, la région intergénique en amont de ces gènes. Cette séquence est supposée contenir le promoteur putatif de ces gènes, comprenant les boîtes -10 et -35, ainsi que les sites putatifs de liaison aux régulateurs. Dans les génomes bactériens, le promoteur et les sites de liaison aux régulateurs, se trouvent généralement dans les 200 à 300 bp en amont de l'ATG. Nous avons considéré que les promoteurs putatifs étaient contenus dans les régions intergéniques, située 503 bp en amont de l'ATG de *virB*, 267 bp en amont de l'ATG de *fliF*, et 359 bp en amont de celui de *babR*.

Si une fusion traductionnelle est réalisée à partir du plasmide pSKoriTCATgfp1, le promoteur Plac et le promoteur d'intérêt ont la même orientation (Figure 1a). Sachant que le promoteur Plac est un promoteur fort et constitutif chez *Brucella*, nous pourrions suspecter un effet positif de ce promoteur sur la transcription du gène d'intérêt. Cette modification de la régulation d'un gène pourrait modifier l'état physiologique de la bactérie.

Afin d'éviter cet éventuel problème, nous avons décidé d'utiliser le plasmide pSKoriTCATgfp2 dans lequel le sens du promoteur Plac est inverse par rapport à celui du promoteur d'intérêt. (Figure 1b).

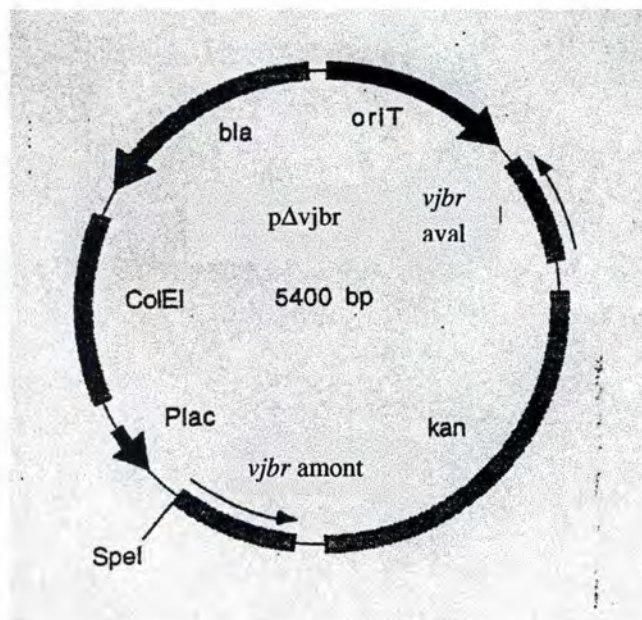


Figure 2 : Schéma du plasmide $p\Delta vjbr$.

Le gène *bla* codant pour une protéine conférant la résistance à l'ampicilline.

L'*oriT* est l'origine de transfert.

ColE1 = origine de réplication chez *E. coli*.

La cassette *kan* code pour une protéine conférant la résistance à la kanamycine.

vjbr amont correspond à la région en amont de l'ORF *vjbr* dans le génome.

vjbr aval correspond à la région en aval de l'ORF *vjbr* dans le génome.

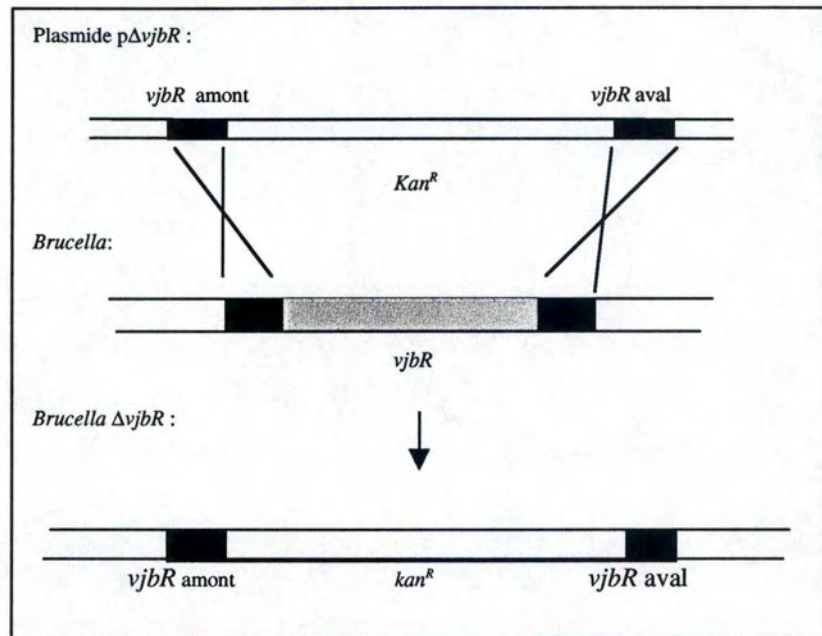


Figure 3: Schéma de la double recombinaison menant à la délétion de l'ORF *vjbR*. La cassette kan plus les deux régions de recombinaison ont une taille approximative de 2.2 kb, tandis que le gène *vjbR* a une taille de ~1.7 kb.

2. Construction d'une souche de *Brucella* délétante pour le gène *vjbR*

Le plasmide pSKoriTCATgfp2 possède le gène *cat* codant pour une protéine conférant aux bactéries la résistance au chloramphénicol (Cm). Le transposon miniTn5-*Kmcat* contenu dans le génome du mutant *vjbR* (32D3) possède également le gène *cat*. Dès lors, il n'y a pas de pression de sélection permettant de sélectionner les *Brucella* transformées.

De plus, il est possible qu'une recombinaison homologe pour l'intégration du plasmide dans le génome du mutant 32D3 ait lieu au niveau du gène *cat*.

Pour palier ce problème, nous avons décidé de déléter l'ORF *vjbR* en la remplaçant par une cassette différente du gène *cat*. Les souches de *Brucella* choisies pour être mutées sont *B.melitensis* 16M (Nal^R, résistantes à l'acide nalidixique), et *B.abortus* 544 (Nal^R).

Ces deux souches de référence ont été utilisées en parallèle étant donné qu'elles pourraient présenter des mécanismes de virulence différents comme suggéré pour le quorum sensing (Sieira *et al.*, 2000 ; Taminiau B., communication personnelle).

2.1 Principe

La délétion du gène *vjbR* a été réalisée par remplacement du gène chromosomique par une cassette encodant une protéine conférant la résistance à la kanamycine. Un plasmide qui contient la cassette *kan* bordée des régions génomiques situées en amont et en aval de l'ORF *vjbR* a été construit et a été appelé p Δ *vjbR* (figure 2). La cassette remplacera l'ORF *vjbR* dans le génome suite à une double recombinaison entre les régions bordant la cassette *kan* et leurs homologues dans le génome bactérien. (figure 3). Ce plasmide a été mis à notre disposition au début de ce travail.

2.2 Construction de candidats délétants

Une souche donneuse d'*E.coli* S17 a été transformée par le plasmide p Δ *vjbR*. Le p Δ *vjbR* est porteur des gènes encodant les protéines de résistance à l'ampicilline (Amp) et à la kanamycine (Kan). Le produit de la transformation a donc été étalé sur milieu sélectif contenant de l'Amp et de la Kan.

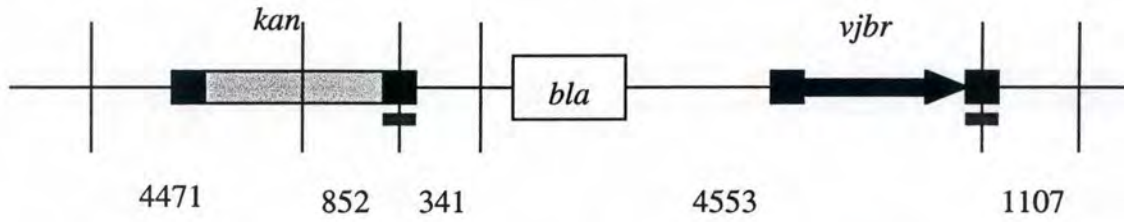
Les plasmides ont ensuite été transférés chez *B. melitensis* 16M (Nal^R) et *B. abortus* 544 (Nal^R) par conjugaison avec les *E.coli* S17 transformées. Ce mélange de conjugaison a été étalé sur milieu Nal Kan de manière à sélectionner les souches de *Brucella* ayant reçu le plasmide.

Pour se maintenir, le plasmide p Δ vjbR, suicide chez *Brucella*, doit s'intégrer dans le génome bactérien. L'intégration peut se dérouler de trois façons différentes :

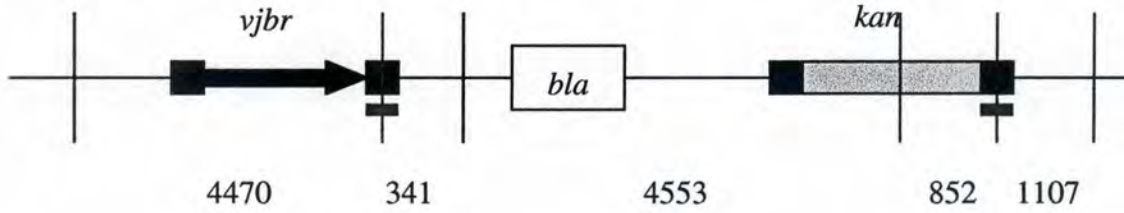
- Le plasmide s'intègre par simple recombinaison entre la région amont et son homologue dans le génome. Cet événement conduit à la création d'une souche de *Brucella* transformée par le p Δ vjbR, intégré dans son génome sans avoir délété l'ORF vjbR. Dans ce cas, nous désignerons ce clone comme intégrant. Cette souche sera Nal^R, Kan^R, Amp^R.
- Selon le même principe, une simple recombinaison peut s'effectuer entre la région aval dans le plasmide et la région génomique homologue. Cet événement conduit à la création d'une souche de *Brucella* transformées par le p Δ vjbR, intégré dans son génome sans avoir délété l'ORF vjbR. Dans ce cas, nous désignerons également ce clone comme intégrant. Cette souche sera Nal^R, Kan^R, Amp^R.
- La troisième situation que nous pouvons rencontrer est une double recombinaison homologue entre les régions amont et aval plasmidiques et les régions chromosomiques homologues (figure 3). Cet événement conduit à la création d'une souche de *Brucella* délétante pour l'ORF vjbR. Cette souche sera Nal^RKan^RAmp^S (sensible).

Environ 50 clones Nal^R, Kan^R pour chaque souche de *Brucella* ont été repiqués sur un milieu (Nal Kan) avec ou sans Amp, afin de distinguer les candidats intégrants (Amp^R) des candidats délétants (Amp^S). Cette sélection a permis d'isoler 5 candidats délétants chez *B. abortus* 544 (clones n° 4, 10, 35, 49, et 53), et 1 candidat délétant chez *B. melitensis* 16M (clone n°3).

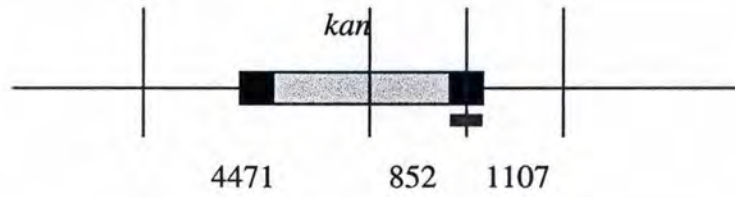
A Insertion du plasmide p Δ VjBR dans le g \acute{e} nome de *Brucella* par simple recombinaison entre les r \acute{e} gions amont de *vjbr*.



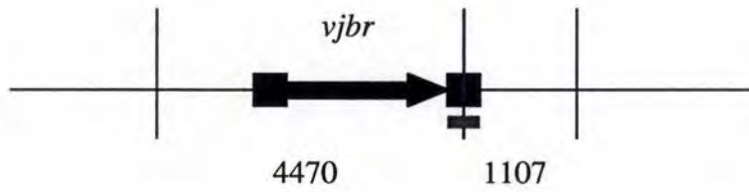
Insertion du plasmide p Δ VjBR dans le g \acute{e} nome de *Brucella* par simple recombinaison entre les r \acute{e} gions aval de *vjbr*.



D \acute{e} l \acute{e} tant



Sauvage



Site *Hind*III

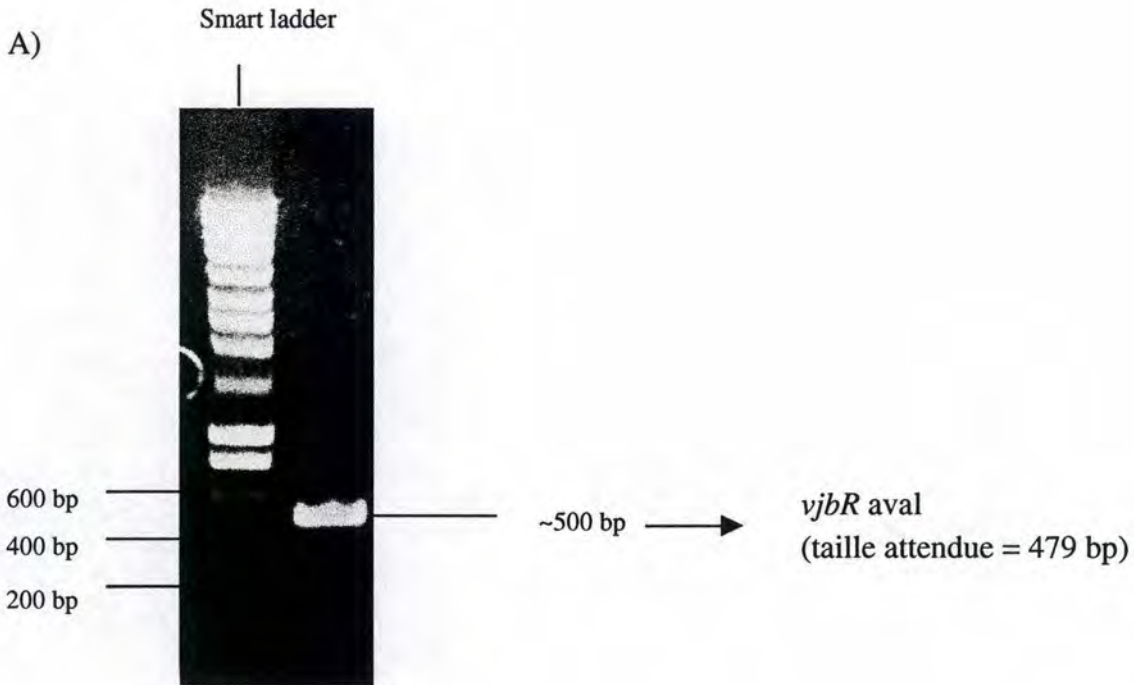
■ Sonde

B

	Sauvage	Int \acute{e} grant via amont	Int \acute{e} grant via aval	D \acute{e} l \acute{e} tant	p Δ VjBR
Sonde VjBR	4770 bp	4553 bp	4553 bp	1107 bp	4254 bp
aval	1107 bp	1107 bp	1107 bp	852 bp	852 bp
		852 bp	852 bp		341 bp

Figure 4 : A) Localisation des sites de restriction *Hind*III dans le g \acute{e} nome des int \acute{e} grants, du d \acute{e} l \acute{e} tant et de la souche sauvage.

B) Taille th \acute{e} orique des fragments d'ADNg de *Brucella* r \acute{e} v \acute{e} l \acute{e} s par la sonde *vjbr* aval, selon qu'il s'agit d'une souche sauvage, d'un int \acute{e} grant, d'un d \acute{e} l \acute{e} tant, ou du plasmide suicide.



B)

5' - **cccgagggtacagcatctc** **CD*vjbR*aval**

cccgagggtacagcatctcgtctgatcaacatggtcgcgcggaaccttccgcgc
gacgccgtagcagggcgaaaagaaaagctcagacgcgtttcaggcgcgtttgccg
aggggcgcaaccgggcatcctcaaaagctttcgccagccgcactgtgttgccg
aaggatcgccatccgcacatcctcgaagggcagatagggttcaattccacgcctgccg
tctgtccgctcagggtaatgcgaaaataggcatagacgccctgatggcgaaatt
ccatgtcgaggggtgatggaagggcgggtgactgccagtcgcaatgaaattcaccgc
cgtgaccgaggccagtggtgcccggatagaaatagagctcggcagcagagctta
caagatcggcaatattggcaaagagctcacagcgtatgaaggcaatataatctg
cgggatcaaccagccggagatcagaaacgacatcccggata

gtctttgctgtagggcctattctcgaa - 5'

CD*vjbR*avalex

Figure 5 : A) Amplification PCR sur la région génomique en aval du gène *vjbR*.

B) Positionnement des amorces *CDvjbR* aval et *CDvjbR* avalex ayant servi à amplifier *vjbR* aval. Un site *Hind*III est ajouté par *CDvjbR* aval, il est encadré sur la figure.

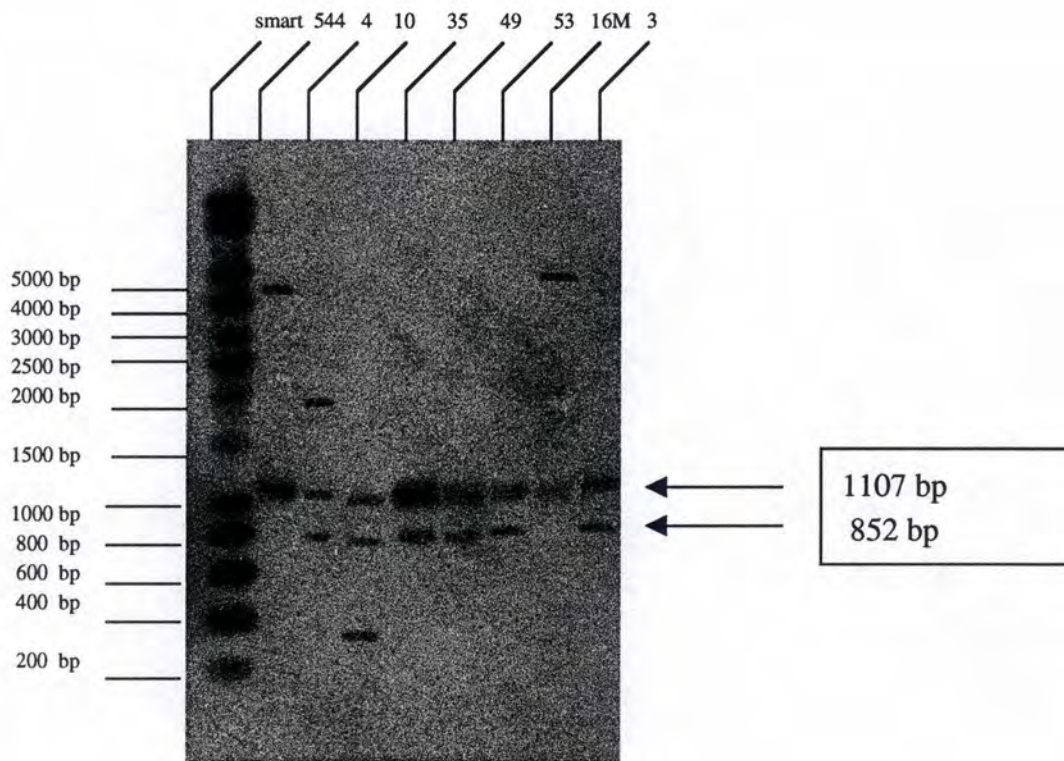


Figure 6 : Southern Blot réalisé sur l'ADNg des 6 candidats délétants restreints au moyen de l'enzyme *HindIII*.

La première piste correspond au marqueur de taille Smart ladder. Il permet d'estimer la taille des fragments d'ADNg des 6 candidats (4, 10, 35, 49, 53 et 3) et des 2 souches sauvages (544, 16M).

2.3 Analyse géotypique des candidats délétants

Un Southern blot va nous permettre de vérifier que les 6 candidats isolés sont en effet des délétants et non des intégrants et que les recombinaisons sont homologues et non ectopiques.

Nous avons choisi de restreindre l'ADN génomique des candidats et des souches sauvages par l'enzyme de restriction *HindIII* et d'utiliser une sonde correspondant à la région génomique en aval de l'ORF *vjbR*. (Figure4).

L'ADN génomique des 6 candidats délétants et des souches sauvages a été isolé et la restriction a été vérifiée sur gel. La sonde a été obtenue suite à une amplification PCR avec les amorces *CDvjbRaval* et *CDvjbRavalex* (Figure 5). L'amplification PCR vérifiée sur gel et purifiée, a ensuite été marquée au dCTP³².

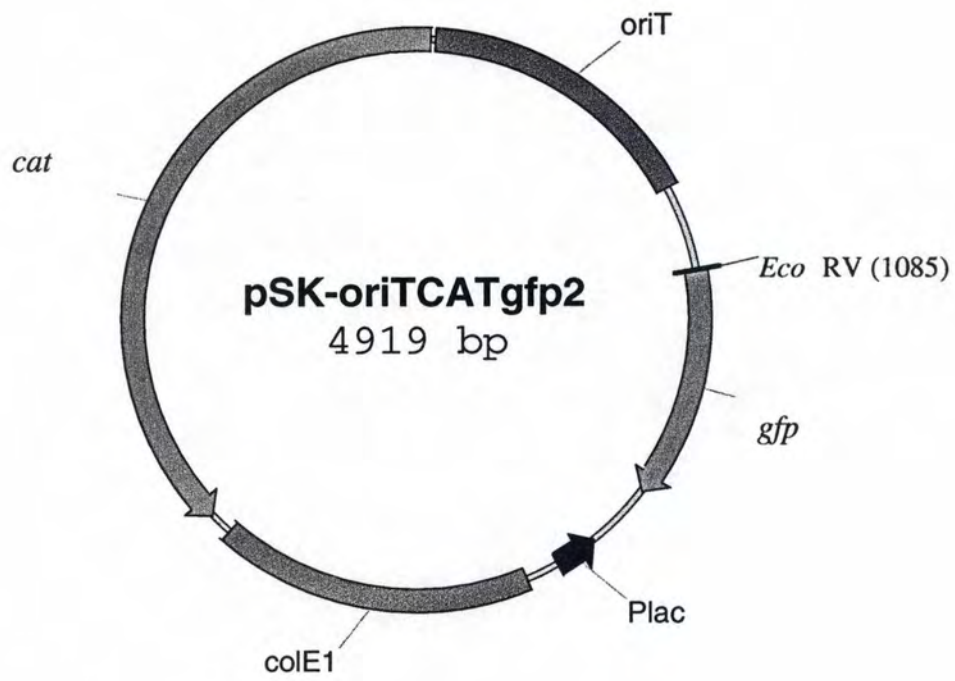
Le résultat du southern blot est présenté à la figure 6.

Parmi les 6 candidats délétants, les clones 35, 49, 53, et 3, montrent le profil d'une souche délétante pour l'ORF *vjbR*. (Figure 6).

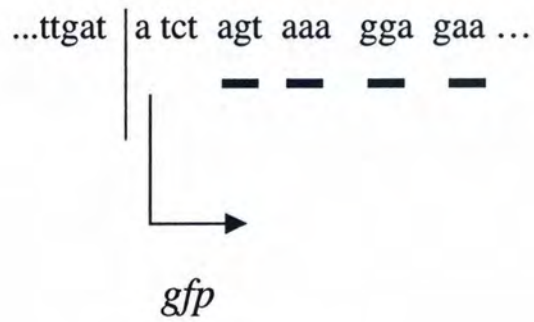
Avant d'utiliser les souches de *Brucella* délétantes pour l'ORF *vjbR*, la virulence de ces souches a été évaluée en cellules HeLa après 48 heures d'infection par R.-M. Delrue. L'atténuation de survie intracellulaires des souches délétantes de *B. melitensis* 16M et *B. abortus* 544 par rapport à leur souche parentale est comparable à celle du mutant transpositionnel 32D3 de la souche *B. melitensis* 16M.

De cette expérience, nous pouvons conclure que

1. l'atténuation de croissance intracellulaire du mutant 32D3 est bien le résultat de la mutation de l'ORF *vjbR*.
2. la perte du régulateur transcriptionnel VjBR affecte de manière identique la croissance intracellulaire des souches *B. melitensis* 16M et *B. abortus* 544.



EcoRV



— = phase de lecture de la *gfp*

Figure 7 : pSKoriTCATgfp2 restreint par l'enzyme de restriction *EcoRV*

3. Analyse de l'expression différentielle de l'opéron *virB*, du gène *fliF*, et du gène *babR* dans une souche de *Brucella* délétante pour le gène *vjbR*.

Pour rappel, nous supposons que les gènes *virB*, *fliF*, et *babR*, de *Brucella* pourraient être affectés par la protéine VjbR.

Afin d'étudier l'expression de *virB*, de *fliF*, et de *babR*, dans une souche de *Brucella* délétante pour *vjbR*, des fusions traductionnelles ont été réalisées entre les régions d'ADNg contenant le promoteur putatif de ces gènes, et le gène rapporteur *gfp*. Les constructions plasmidiques obtenues après le clonage des différents promoteurs, décrites ci-dessous, ont été appelées respectivement pFT*virB*, pFT*fliF* et pFT*babR* (FT pour Fusion traductionnelle).

3.1 Construction des plasmides pFT*virB*, pFT*fliF* et pFT*babR*

Ces constructions ont été réalisées en deux étapes :

- 1) Amplification de la région intergénique en amont du gène d'intérêt par PCR
- 2) Clonage de cette région dans le pSKoriTCATgfp2 en fusion traductionnelle avec la *gfp*.

3.1.1 Amplification par PCR de la région promotrice

3.1.1.1 Choix des amorces

Les amorces utilisées pour amplifier la région intergénique en amont de *virB*, de *fliF*, et de *babR*, par PCR ont été déterminées sur base de la séquence du génome de *B.melitensis* sur le site WIT PRO de l'université de Scranton (USA, PA).

Nous avons déterminé deux amorces spécifiques. La première a été déterminée sur l'extrémité 5' des régions intergéniques en amont des gènes candidats (*virB*, *fliF* et *babR*). La seconde contient la séquence de Shine-Dalgarno et l'ATG de la séquence codante de ces ORF, de façon à réaliser la fusion traductionnelle avec la *gfp*. Après l'ATG, deux bases ont été ajoutées pour qu'il soit en phase avec la séquence de la *gfp*. En effet, le site de clonage du promoteur, *EcoRV*, se trouve quatre bases en amont du premier codon de la *gfp* du pSKoriTCATgfp2, ce qui crée un décalage de phase résultant en une GFP non fonctionnelle.

A) Promoteur *virB*

5'-**agtacttcaccggctagctgaaatc-3'** **PvirBm**

ttcaccggctagctgaaatccaggcgttgagatcgccatgacaggcatat
 caacgcgacatattcatttctaccgcatttcgacccttcgcgccaacacc
 acttttctctgatgccgctaataaggagcaagttcggtaaaaatttagccagct
 tggatgtctgccaattatgtagagcgattcttggcgggttacaacatggc
 aaagggcctctgtctcatgcaaggcgcgcccggcaccgcaaaaatgaaa
 atcaccgcataccacttgtatataagattttgttaaaaaagaattttcta
 agaaccaatacaagtgcaccaaaaattctgactgggctcattcacacaat
 atagccccctcacaagcatatttgtccatataatcggttaaacacactacc
 caataatgaccgatatcgctgatctataattaaggctatcataataatcgct
 cattctctgagaaggagacgatcct[atg]

3'-**tcttcctctgctaggataccg-5'** **VFTvirB**

Promoteur *fliF*

5'-**ctctgtcgcgatcgccaact-3'** **MFTfliF**

ctctgtcgcgatcgccaactcgtcgaaccagtcgatcctgtcgcgtgtccgcg
 ctaataaacccggaccggtttcaggcaaacaggggggggagtatccagccgg
 ccagatcgggtttggatacttcaggcggggaggacgggcgccaatgaattcc
 gcgcccgttcttctttttgcccacatcctgtctggcaagccgcaccgcac
 ctcatcgcaccctttcgcgcaagcttcgcgcattagcttgcgttcaacagg[atg]

3'-**gaacgcaagttgtcctaccg-5'** **VFTfliF**

Promoteur *babR*

5'-**ggctctagaatgtccctggggcatcgaa-3'** **PbabRm**

atgtccctggggcatcgaaagacgaagcggcctgacagccgatcgttcgaga
 ggaaacggcaaaaacagccctcatggagcaaacctccacgagggctgtttgct
 tcaagctttgcggtggagtcttcgggtttatttttctgccaataaatatt
 cgattttcattatctaatttagaatgaagttatattcaatataaaagtagaa
 ttttgaanaatcgctaattatgatgaaagtaattcttcgtagaagaaatgaa
 agatatgctaggaatgtttagcgatacattttaccaaaaatcgctgcgattc
 caagaattcatatttttttgaacgctactggg[atg]

3'-

aactttgcatgaccctaccg-5' **VFTbabR**

B)

	nom	Taille (nucléotides)	Tm	Modifications éventuelles	Tailles attendues
<i>PvirB</i>	PvirBm	20+5	58°C	Site de restriction <i>Scal</i> en 5'	503 bp
	VFTvirB	19+2	56°C	Bases CG en 5' pour être en phase avec la gfp	
<i>PfliF</i>	MFTfliF	18	56°C	Aucun site de restriction	267 bp
	VFTfliF	18+2	54°C	Bases CG en 5' pour être en phase avec la gfp	
<i>PbabR</i>	PbabRm	19+8	60°C	Site de restriction <i>XbaI</i> en 5'	359 bp
	VFTbabR	19+2	56°C	Bases CG en 5' pour être en phase avec la gfp	

Figure 8 : En A) positionnement des amorces utilisées lors de l'amplification des promoteurs de *virB*, *fliF* et *babR* et en B) caractéristiques des amorces

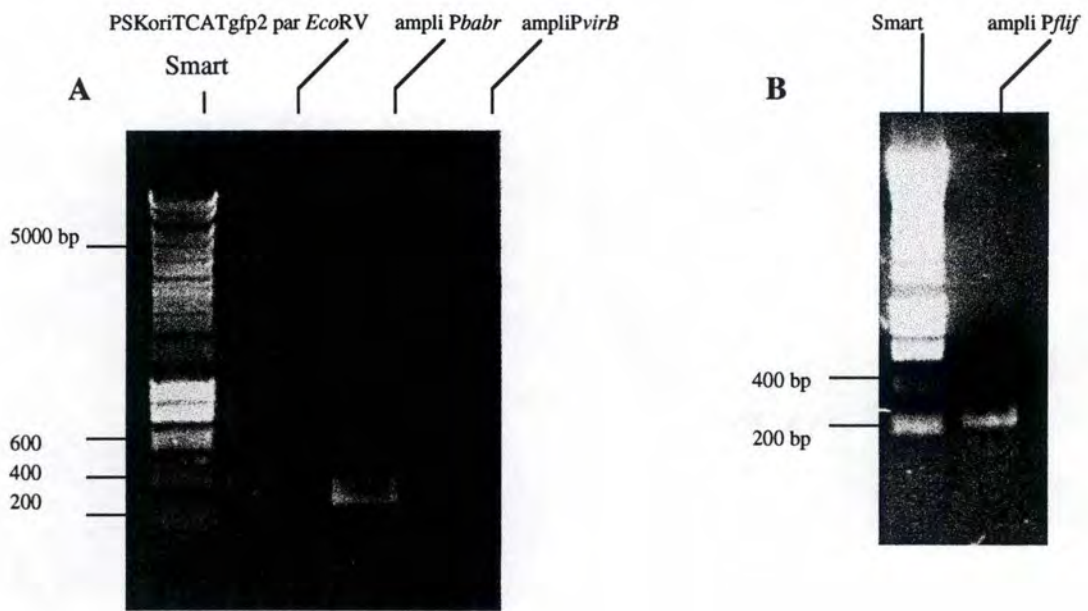


Figure 9 : A) Amplification PCR des promoteurs putatifs de *babR* (359 bp), *virB* (503 bp), et vérification de la restriction du pSKoriTCATgfp2 par *EcoRV*, taille attendue, 4919 bp.
 B) Amplification PCR du promoteur putatif de *fliF* (267 bp).

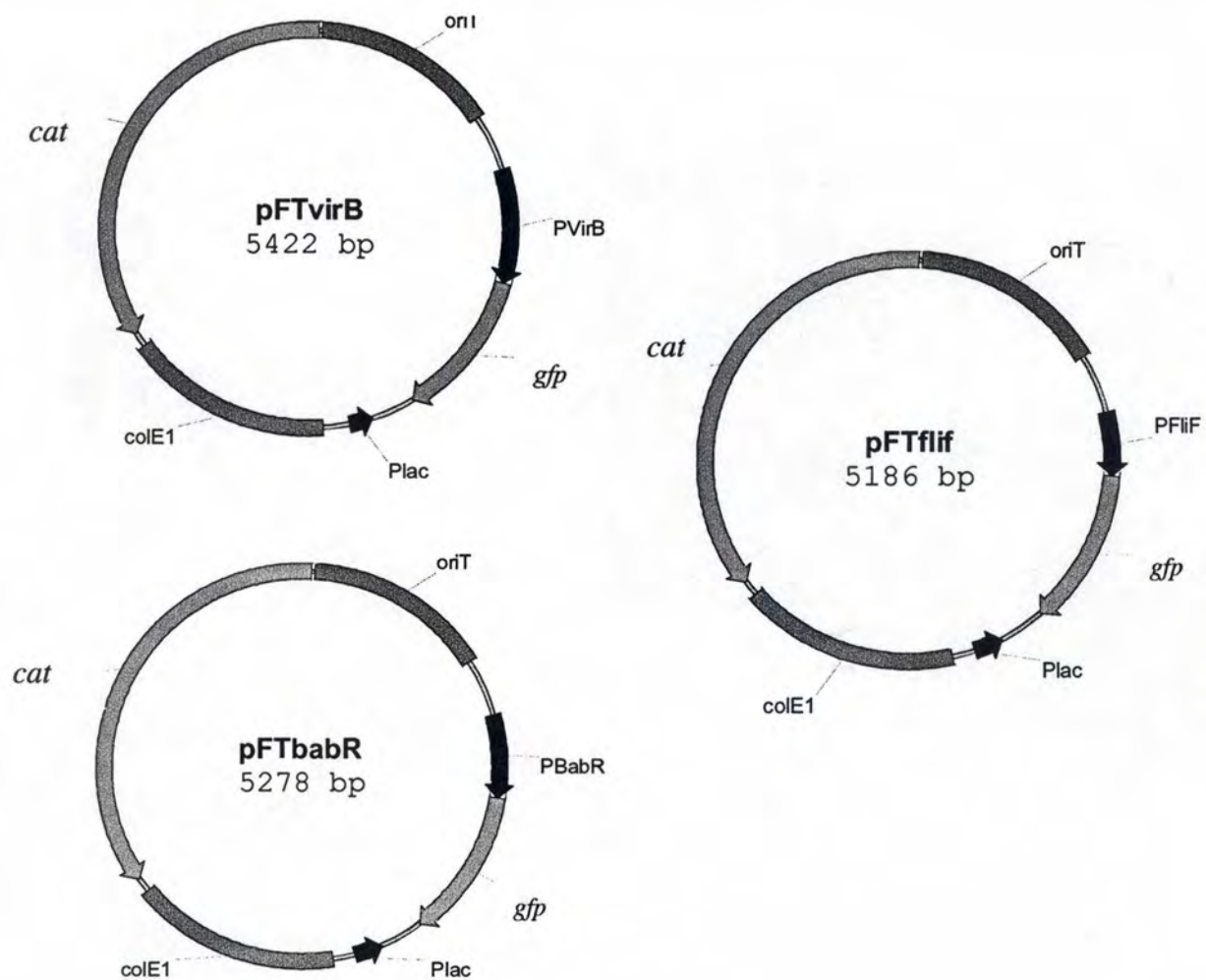


Figure 10 : Carte plasmidique des pFTvirB, pFTfliF, et pFTbabR.

Ces plasmides ont été construits de façon à ce que la *gfp* soit sous la dépendance des promoteurs putatifs des ORF *virB*, *fliF*, et *babR*.

(Figure 7). Dès lors afin de respecter cette phase, il faut régénérer un multiple de trois. En ajoutant deux bases après l'ATG, on se trouve six bases en amont de la phase de la *gfp*, elle est donc rétablie. Ces deux bases doivent être choisies adéquatement de manière à ne pas introduire dans la GFP, un acide aminé potentiellement perturbateur, comme un acide aminé chargé ou encombrant. Les deux bases ajoutées aux amorces (figure 8b), créent un codon codant pour une glycine, un acide aminé non chargé qui n'entraîne pas d'encombrement stérique.

La figure 8a représente la position des amorces sur la matrice de départ (ADNg 16M).

3.1.1.2 amplification par PCR

Les régions intergéniques comprenant les promoteurs putatifs des gènes d'intérêt ont été amplifiés à l'aide de la Pfu (Stratagene) sur l'ADN génomique de *B.melitensis* 16M (Nal^R).

La taille des amplicons a été vérifiée sur gel d'agarose (figure 9). Les tailles attendues sont 503 bp pour la région intergénique en amont de *virB*, 267 bp pour celle de *fliF*, et 359 bp pour celle de *babR*. Les amplicons ont ensuite été purifiés.

3.1.2 Clonage des amplicons dans le pSKoriTCATgfp2

3.1.2.1 Restriction du vecteur

La restriction *EcoRV* du pSKoriTCATgfp2 a été vérifiée sur gel d'agarose. Un fragment de 4.9 kb est observé. (figure 9).

3.1.2.2 Ligation

Les produits PCR et les plasmides restreints furent mis en présence, dans un rapport 3 :1, de l'enzyme de ligation T4 DNA ligase (Roche).

Les constructions obtenues sont appelées pFT*virB*, pFT*fliF*, et pFT*babR*. (figure 10).

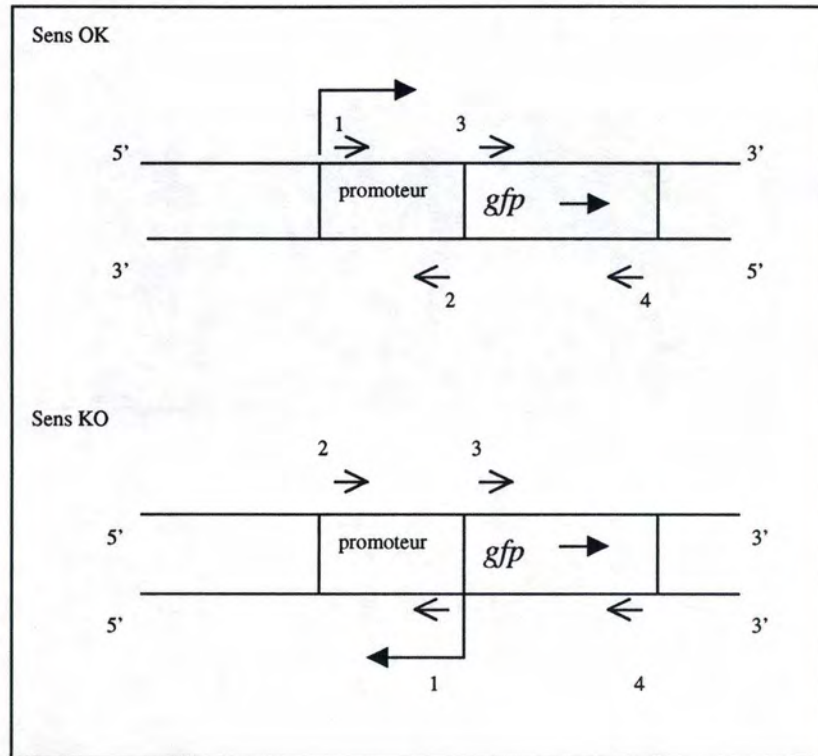


Figure 11: Schéma montrant les amorces à utiliser pour vérifier le sens de l'insertion des promoteurs dans le pSKoriTCATgfp2.

- 1 = amorce amont du promoteur (*PvirBm*, *PbabRm*, *MFTfliF*)
- 2= amorce aval du promoteur (*VFTvirB*, *VFTbabR*, *VFTfliF*)
- 3= amorce amont de la *gfp* (forward *gfp*)
- 4= amorce aval de la *gfp* (reverse *gfp*)

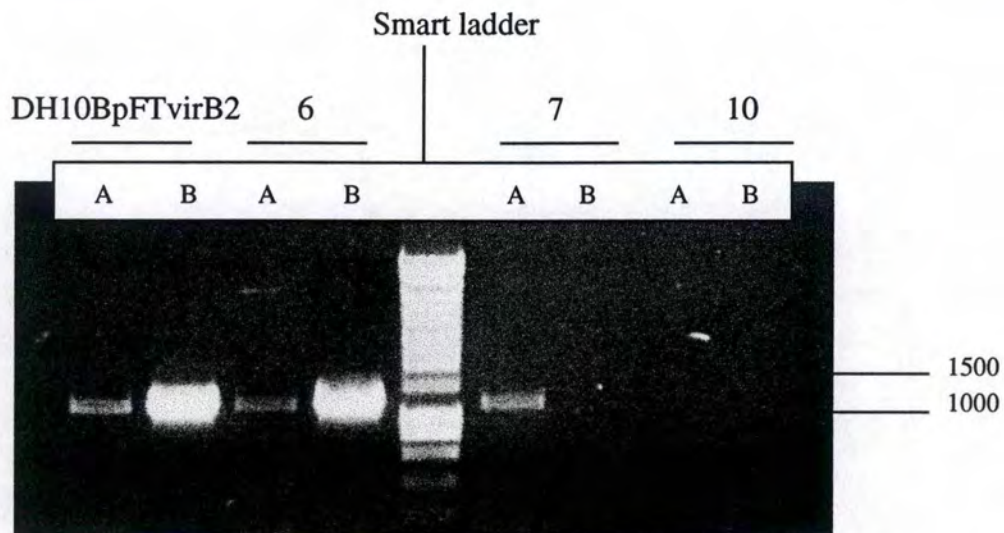


Figure 12 : Migration électrophorétique de 1/10^e du volume final de la PCR diagnostique des candidats DH10B-pFTvirB 2, 6, 7, et 10.

Chaque candidat est testé avec le couple d'amorces *PvirBm*-RGFP (A) et le couple *VFTvirB*-RGFP (B) Si l'amplification se fait par le couple (A), c'est que l'insert cloné est dans le sens de la *gfp*. Si l'amplification se fait par le couple (B), c'est que l'insert est dans le sens inverse de la *gfp*. Enfin, si aucune amplification n'a lieu, c'est que le plasmide n'a pas incorporé l'insert.

3.1.2.3 Transformation et analyse des clones recombinants

Des cellules *E.coli* DH10B CaCl₂ compétentes ont ensuite été transformées par les ligations. Les cellules ont été étalées sur milieu sélectif LB+chloramphénicol de manière à sélectionner les DH10B transformées.

Lors de la réaction de ligation, le produit PCR a pu s'insérer dans le plasmide, dans le sens de la *gfp*, ou dans le sens inverse. Le plasmide a également la capacité de se refermer sur lui-même, sans incorporer l'insert. Dans les trois cas, les *E.coli* DH10B sont Cm^R.

Afin de vérifier le sens de l'insert, deux stratégies sont envisageables, la PCR diagnostique, et la restriction diagnostique. La première utilise des amorces spécifiques pour déterminer le sens de l'insert, la seconde, une enzyme de restriction. Le principe de la restriction diagnostique consiste à restreindre les plasmides des différents candidats par une enzyme qui donne des profils différents selon que l'insert est ou non dans le bon sens, ou même absent.

Nous avons d'abord décidé de réaliser des PCR diagnostiques. (Figure 11).

Si il y a amplification avec le couple d'amorces *PvirBm* (ou *PbabRm*, ou *MFTfliF*) + reverse *gfp* (RGFP), c'est que l'insert est dans le bon sens, si c'est avec le couple d'amorces VFT (-*virB*, -*babR*, ou -*fliF*) + RGFP, l'insert est dans le sens inverse de la *gfp*. Enfin, si aucune amplification n'est observée, c'est que le plasmide s'est refermé sur lui-même. Les tailles attendues en cas d'amplification, quelque soit le couple d'amorce, sont de 1226 bp, 990 bp, et 1082 bp pour respectivement les constructions pFT*virB*, pFT*flif*, et pFT*babR*.

Une première PCR diagnostique (sur colonie) sur 4 candidats pour la construction pFT*virB*, appelés respectivement DH10B-pFT*virB* 2, 6, 7 et 10, a été réalisée. Pour chaque candidat, l'amplification avec les couples d'amorces *PvirBm*/RGFP et VFT*virB*/RGFP est analysée. (Figure 12).

Le candidat DH10B-pFT*virB* 7 montre une amplification avec le couple d'amorces *PvirBm*/RGFP, ce qui suggère que l'insert est dans le sens de la *gfp*. Aucun couple d'amorces ne donne d'amplification lors de la PCR sur le candidat DH10B-pFT*virB* 10, ce qui suggère que ce clone possède un vecteur qui s'est refermé sur lui-même. Par contre pour les candidats DH10B-pFT*virB* 2 et 6, les deux couples d'amorces entraînent une amplification, ce qui n'est pas possible. La PCR est peut-être plus sensible aux contaminations. C'est pourquoi nous

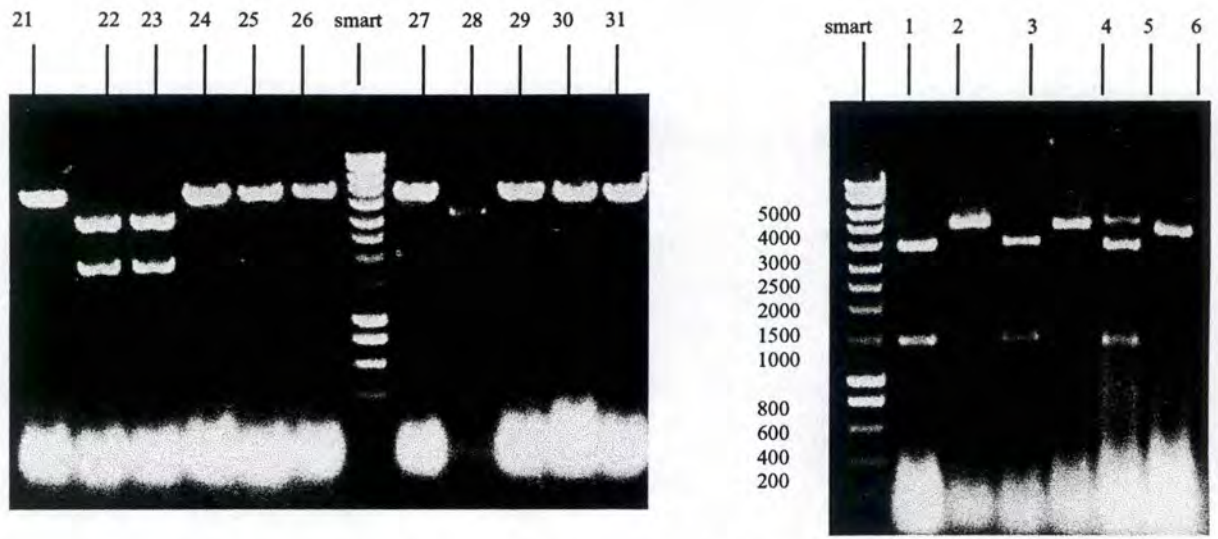


Figure 13°: Restriction diagnostique *ScaI* des candidats DH10BpFT*virB* (clones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 21-31)

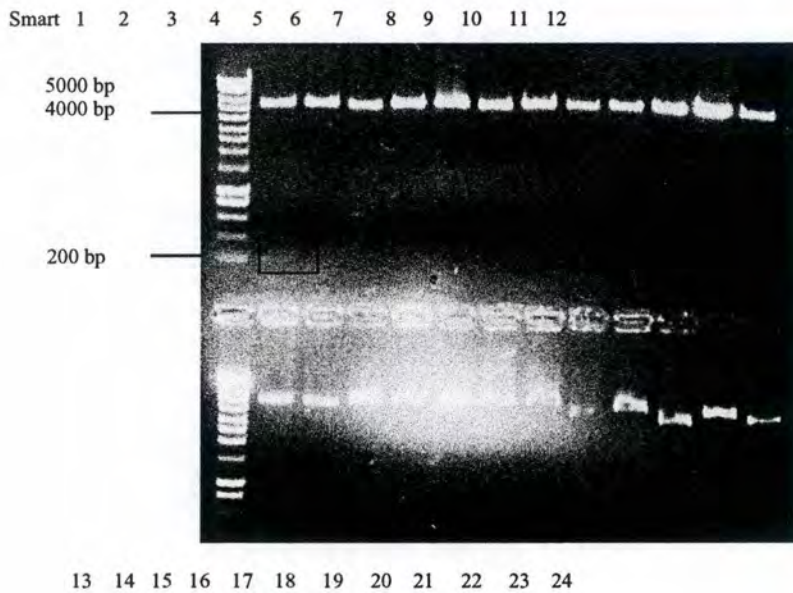


Figure 14°: Restriction diagnostique *HindIII* des candidats DH10BpFT*fliF* (clones 1-24)

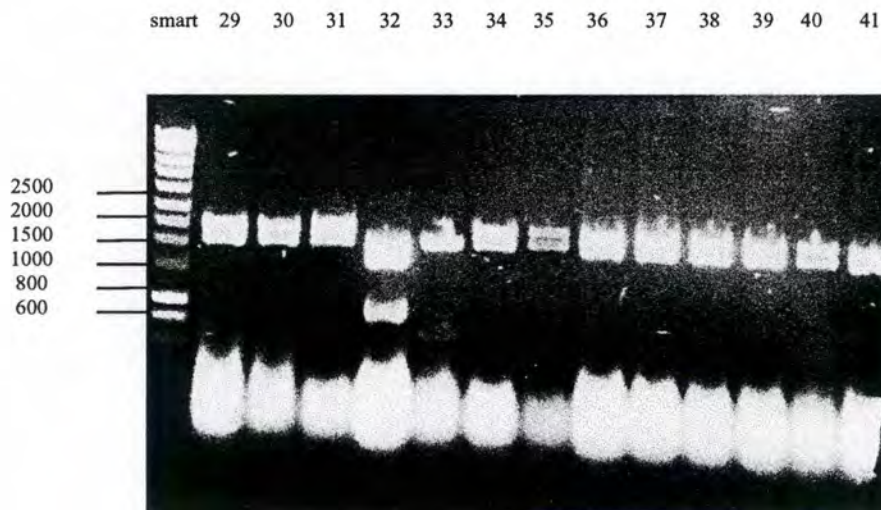


Figure 15°: Restriction diagnostique *EcoRI* des candidats DH10BpFT*babR* (clones 29-41)

avons préféré la restriction diagnostique pour vérifier s'il s'agit ou non, de candidats possédant le promoteur dans le sens de la *gfp*.

Sur base de la séquence disponible de *B.melitensis* 16M, nous avons choisi les enzymes de restriction permettant au mieux de différencier les candidats selon leur plasmide.

Les enzymes choisies sont : *ScaI* pour les constructions pFT*virB*, *HindIII* pour les constructions pFT*fliF*, et *EcoRI* pour les constructions pFT*babR*.

Les profils sont les suivants :

	Insert (sens <i>gfp</i>)	Insert (sens inverse)	Plasmide sans insert
pFT <i>virB</i> par <i>ScaI</i>	3909 et 1513 bp	3412 et 2010 bp	4919 bp
pFT <i>fliF</i> par <i>HindIII</i>	4946 et 240 bp	5147 et 39 bp	4919 bp
pFT <i>babR</i> par <i>EcoRI</i>	2264, 2251, et 763 bp	2264, 1958, et 1056 bp	2655 et 2264 bp

Les plasmides de 31 clones DH10B, candidats pour la fusion traductionnelle FT*virB*, ont été isolés et restreints par *ScaI*. Sur ces 31 candidats potentiels, 25 montrent le profil d'un plasmide qui s'est refermé sur lui-même, trois, DH10BpFT*virB* 1, 3, et 5, montrent le profil d'un plasmide où l'insert est dans le sens de la *gfp*, et trois (22, 23, 28) montrent le profil d'un plasmide où l'insert est dans le sens inverse de la *gfp*. (figure 13).

Les plasmides de 48 clones DH10B, candidats pour la fusion traductionnelle FT*fliF*, ont été isolés et restreints par *HindIII*. Sur ces 48 clones, seul un, DH10B-pFT*fliF* 1, montre le profil attendu, c'est à dire l'insert dans le sens de la *gfp*, les autres sont des plasmides qui se sont refermés sur eux-mêmes. (figure 14).

Les plasmides de 41 clones DH10B, candidats pour la fusion traductionnelle FT*babR*, ont été isolés et restreints par *EcoRI*. L'analyse des profils de restriction montrent que parmi ces 41 clones, deux seulement portent l'insert, un dans le sens attendu, DH10B-pFT*babR* 33, l'autre dans le sens inverse. (figure 15).

```

Query: 1   agtacttcaccggctagctgaaatccaggcgttgagatcgccatgacaggcatatttcaa 60
          |||
Sbjct: 1085 agtacttcaccggctagctgaaatccaggcgttgagatcgccatgacaggcatatttcaa 1144

Query: 61   cgcgacatattcatttgctaccgcatttgcgacccttcgcgccaacaccacttttctga 120
          |||
Sbjct: 1145 cgcgacatattcatttgctaccgcatttgcgacccttcgcgccaacaccacttttctga 1204

Query: 121  tgccgcctaattggagcaagttcggtaaaaatttagccagcttggatgtctgccaattatg 180
          |||
Sbjct: 1205 tgccgcctaattggagcaagttcggtaaaaatttagccagcttggatgtctgccaattatg 1264

Query: 181  tagagcgatttcttggtcgggttacaaccatggcaaagggcctcttgtctcatgcaaggcg 240
          |||
Sbjct: 1265 tagagcgatttcttggtcgggttacaaccatggcaaagggcctcttgtctcatgcaaggcg 1324

Query: 241  cgccggcaccgcgcaaaaatgaaaatcaccgcataccacttggatataagattttgta 300
          |||
Sbjct: 1325 cgccggcaccgcgcaaaaatgaaaatcaccgcataccacttggatataagattttgta 1384

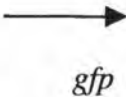
Query: 301  aaaaagaatcttctaataagaaccaataacaagtgccccaaaattctgactgggctcattc 360
          |||
Sbjct: 1385 aaaaagaatcttctaataagaaccaataacaagtgccccaaaattctgactgggctcattc 1444

Query: 361  acacaatatatagccccctcacaagcatatttgccatataatcggttaaacacactac 420
          |||
Sbjct: 1445 acacaatatatagccccctcacaagcatatttgccatataatcggttaaacacactac 1504

Query: 421  ccaataatgaccgatatcgctgatctataattaaggctatcataataatcgccattctc 480
          |||
Sbjct: 1505 ccaataatgaccgatatcgctgatctataattaaggctatcataataatcgccattctc 1564

Query: 481  tgagaaggagacgatcctatg gc a tct agt aaa 513
          |||
Sbjct: 1565 tgagaaggagacgatcctatg gc a tct agt aaa 1597

```



Site de la coupure par EcoRV

Figure 16 : Alignement pairé (Blast2 seq NCBI) de la région promotrice séquencée sur le clone pFTvirB3 et de la séquence attendue pour le pFTvirB (déterminée sur base de la séquence de *B.melitensis* disponible sur le site de Scranton).

Query = pFTvirB3, subject = pFTvirB attendue

La phase de la *gfp* est soulignée.

3.1.3 Vérification des candidats par séquençage

Les séquences nous permettent de vérifier deux choses, d'une part que la séquence du promoteur amplifié correspond à la séquence attendue, et d'autre part que l'ATG de notre insert est en concordance de phase avec la *gfp*.

3.1.3.1 pFT*virB*

Les trois candidats, DH10B-pFT*virB* 1, DH10B-pFT*virB* 3, et DH10B-pFT*virB* 5 ont été séquencés.

L'analyse des séquences montre que la phase de lecture de la *gfp* est respectée chez les trois clones. Les séquences des clones 1 et 3 correspondent à la séquence attendue, si ce n'est la présence d'une substitution localisée au même endroit chez les deux clones. (une adénine par une cytosine). (figure 16). Le clone 5 a en plus de cette même substitution, une autre substitution (une guanine par une thymine).

Cependant, si les séquences intergéniques en amont de *virB* de *B.suis*, *B.abortus*, et *B.melitensis* sont analysées par alignement multiple, il apparaît que la substitution de l'adénine par la cytosine existe déjà, au même endroit, chez *B.suis* et *B.abortus*. Il est donc supposé qu'elle n'affecte pas le promoteur.

3.1.3.1 pFT*fliF*

L'unique candidat, DH10B-pFT*fliF* 1, a été séquencé.

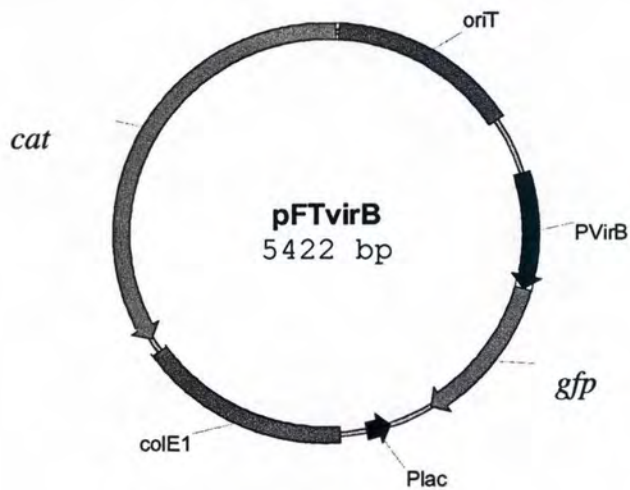
L'analyse de la séquence révèle que la phase de la *gfp* est respectée et que la région intergénique amplifiée ne possède aucune mutation.

3.1.3.1 pFT*babR*

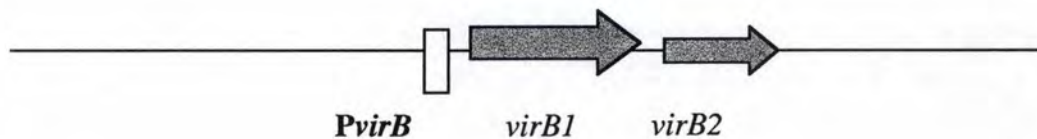
De même, le candidat DH10B-pFT*babR* 33, a été séquencé et vérifié.

L'analyse de la séquence du plasmide du clone DH10B-pFT*babR* 33 montre que la séquence correspond à la séquence attendue déterminée sur base de la banque de Scranton, et que la phase de lecture de la *gfp* est conservée.

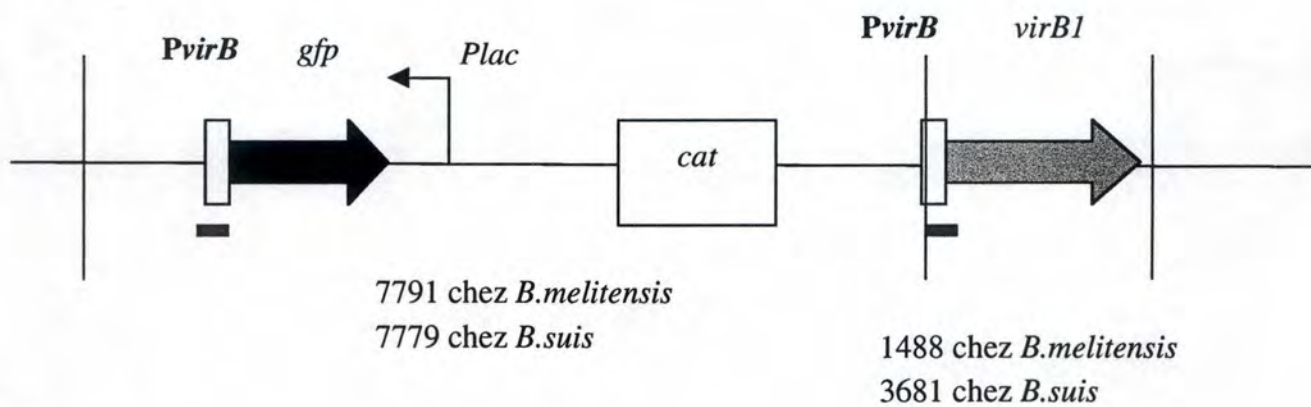
pFTvirB



ADNg



Intégration du pFTvirB dans le génome de *Brucella* par simple recombinaison entre les régions appelées PvirB.



| = site HindIII

■ = sonde(PvirB)

Figure 17 : Représentation schématique de l'insertion du plasmide pFTvirB par simple recombinaison entre les promoteurs de *virB* portés par le plasmide et celui du génome de *Brucella*.
Positionnement des sites de restriction *HindIII* et de la sonde pour le Southern.

3.2 Intégration du plasmide pFTvirB chez *Brucella*

Dans la suite du travail nous nous sommes concentrés sur la construction de souches de *Brucella* ayant intégré le pFTvirB3 dans leur génome. Les souches de *Brucella* utilisées sont *B.melitensis* 16M Nal^R, *B.melitensis* 16MΔ*vjbR*3 (Nal^R), *B.abortus* 544 (Nal^R), *B.abortus* 544Δ*vjbR*49 (Nal^R).

L'intégration doit se faire via une recombinaison homologue entre la région intergénique en amont de *virB* portée sur le pSKoriTCATgfp2, et la région homologue du génome (figure 17).

Le plasmide pFTvirB3 a été transféré par conjugaison dans les différentes souches de *Brucella* et les mélanges de conjugaison ont été étalés sur milieu sélectif 2YT Nal Cm. Les souches de *Brucella* utilisées sont naturellement résistantes à l'acide nalidixique. Les souches de *Brucella* délétantes pour l'ORF *vjbR*, portent de plus la résistance à la kanamycine. Celles qui auront intégré le plasmide seront donc respectivement Nal^R Cm^R et Nal^R Kan^R Cm^R.

Les conjugaisons ont permis d'isoler 2 candidats pour 544pFTvirB et 4 candidats pour 544Δ*vjbR*49pFTvirB, mais aucun pour 16M et 16MΔ*vjbR*3.

L'étape suivante consiste à confirmer, par une analyse génotypique, que l'intégration s'est faite par recombinaison homologue, et non ectopique.

3.2.1 Analyse génotypique des candidats intégrants pour le pFTvirB

La technique du Southern blot permet de vérifier l'intégration du pFTvirB au niveau de la région promotrice de l'opéron *virB* dans le génome des *Brucella*.

Les candidats ont été nommés comme suit : *B.abortus* 544 V1, 544 V7, pour les souches sauvages transformées par le pFTvirB, et 544Δ49 V1, 544Δ49 V2, 544Δ49 V3, et 544Δ49 V4, pour les souches délétantes transformées par le pFTvirB.

L'ADN génomique de ces souches et des souches sauvages *B.abortus* 544, et *B.abortus* 544Δ49 a été préparé.

Il faut, pour vérifier que l'intégration s'est faite au niveau du promoteur de *virB*, déterminer une sonde et une enzyme adéquates afin de réaliser le southern blot. L'utilisation

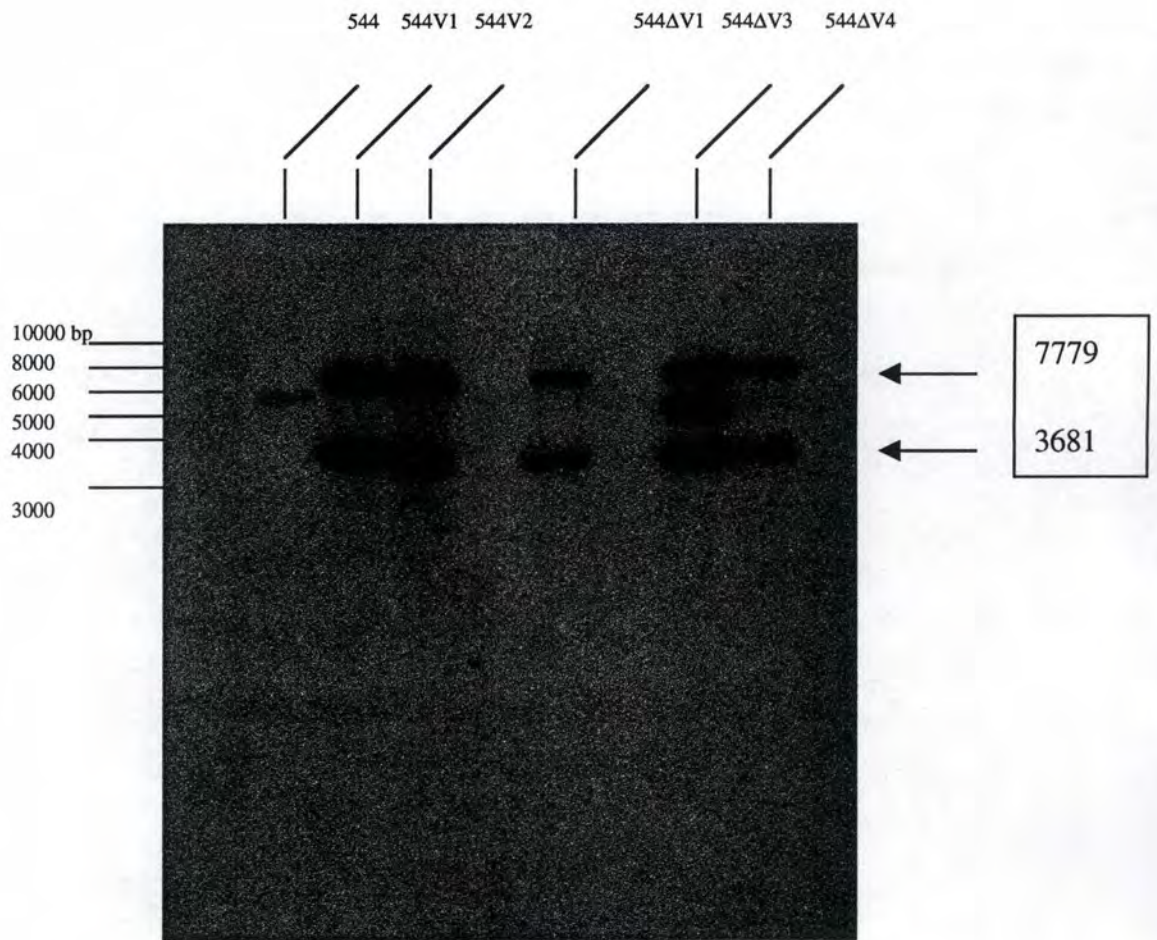


Figure 18 : Southern blot réalisé sur l'ADNg des 6 candidats intégrants restreint par l'enzyme *HindIII*. La première piste correspond au marqueur de taille Smart ladder. Il permet d'estimer la taille des fragments d'ADNg des 6 candidats (544V1, 544V2, 544ΔV1, 544ΔV2, 544ΔV3, 544ΔV4) et de la souche sauvage (544)

de la région promotrice de *virB* comme sonde, combinée à une restriction de l'ADN génomique par l'enzyme *HindIII*, permet cette vérification.

Nos clones ont été obtenus chez *B.abortus*. Il n'est cependant pas possible de déterminer le profil de restriction *HindIII* de *B.abortus* car la totalité du génome n'est pas disponible dans une banque de données, comme l'est celui de *B.melitensis*.

Les profils attendus, pour un intégrant et une souche sauvage, avec cette sonde et cette restriction ont donc été déterminé d'une part sur base de la séquence génomique de *B.melitensis* 16M disponible sur la banque de données Scranton, et d'autre part sur celle de *B.suis*, disponible, en partie, dans la banque de données Tigr. Quoi qu'il en soit, les profils seront différents entre la souche sauvage et l'intégrant.

Les profils attendus sont les suivants :

	Sauvage (contrôle)	Intégrant
<i>B.melitensis</i>	3857 bp	7791 et 1488 bp
<i>B.suis</i>	6038 bp	7779 et 3681 bp

L'ADN génomique des candidats a été restreint par *HindIII*.

La restriction de l'ADN génomique a été vérifiée sur gel avant d'être chargée sur le gel de migration du Southern, de manière à estimer les quantités à charger sur ce gel pour avoir une quantité équivalente d'ADN restreint dans chaque puits. L'ADN du candidat 544ΔV2 a été perdu au cours de sa purification.

Après migration l'ADN a été transféré sur une membrane de nitrocellulose.

La sonde promoteur *virB*, marquée au dCTP³², est incubée une nuit avec la membrane à une température de 68°C favorisant son hybridation de manière spécifique. La membrane radioactive est ensuite mise en présence d'un film autoradiographique révélant la présence des fragments où s'est hybridé la sonde.

La figure 18 montre les résultats du Southern.

Le contrôle sur la sauvage est positif puisqu'un fragment d'environ 6000 bp a été obtenu. Les candidats 544 V1, 544 V7, 544Δ49 V1, et 544Δ49 V4 ont le profil attendu pour une intégration au niveau de la région intergénique en amont de *virB*. Le profil du candidat 544ΔV4 ne correspond pas au profil d'un intégrant.

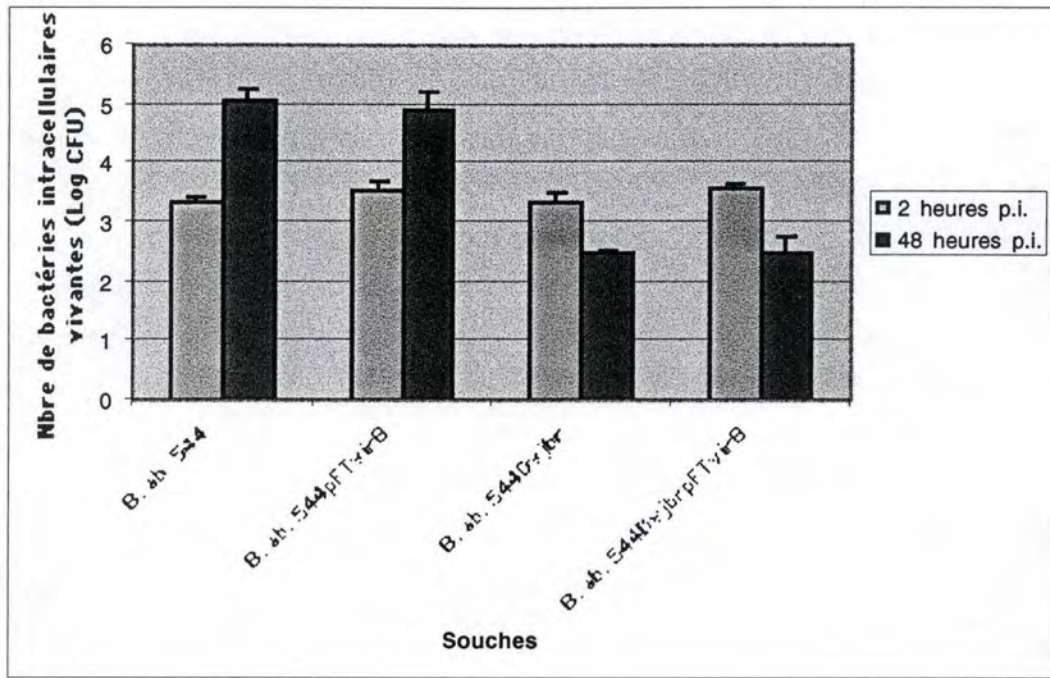


Figure 19 : Estimation de la virulence des *Brucella* après leur transformation par la construction plasmidique pFTvirB.

L'analyse du Southern montre que les profils obtenus par une intégration dans le génome de *B.abortus* correspond au profil qui serait obtenu par une intégration dans le génome de *B.suis*, et non au profil qui serait obtenu par une intégration dans le génome de *B.melitensis*.

3.2.2. Dénombrement des bactéries intracellulaires vivantes

Afin de vérifier que l'insertion du plasmide pFTvirB n'influence pas la virulence de *Brucella*, nous avons réalisé des infections de cellules HeLa avec les souches intégrantes *B. abortus* 544pFTvirB et *B. abortus* 544ΔvjbRpFTvirB et les souches parentales correspondantes. Nous avons dénombré les bactéries intracellulaires vivantes après 2 heures et 48 heures d'infection pour vérifier respectivement que ni la capacité de pénétration, ni la survie intracellulaire dans les cellules HeLa ne sont affectées par l'intégration plasmidique.

Des cellules HeLa ont été infectées par le délétant et la souche parentale à raison d'environ 300 bactéries par cellule. Des dilutions de la dose d'infection ont été réalisées et déposées sur milieu solide 2YT afin de dénombrer les bactéries formant une unité (CFU). Après 1 heure, les cellules ont été mises en présence de gentamicine afin de tuer les bactéries extracellulaires. Après 2 heures et 48 heures, les cellules ont été lysées et des dilutions sériées du lysat ont été réalisés et déposées sur milieu solide 2YT afin de dénombrer les bactéries intracellulaires vivantes.

L'estimation des doses infectantes nous révèlent que nous avons infectés les cellules HeLa avec une multiplicité cellulaire de 30000 soit 100X plus que celle que nous avions prévue.

Le nombre de *B. abortus* 544 et *B. abortus* 544ΔvjbR intracellulaires vivantes après 2 heures d'infection est comparable à celui de la souche *B. abortus* 544pFTvirB et *B. abortus* 544ΔvjbRpFTvirB (Figure 19). Pour le point à 48 heures, le nombre de *B. abortus* 544 et de *B. abortus* 544pFTvirB vivantes sont équivalents. Il en est de même pour le nombre de *B. abortus* 544ΔvjbR et de *B. abortus* 544ΔvjbRpFTvirB vivantes. (Figure 19). L'intégration n'affecte donc pas la virulence de *Brucella*. La figure 20 montre également qu'à 48 heures, le nombre de *B.abortus* délétantes pour l'ORF vjbR (*B. abortus* 544ΔvjbR et de *B. abortus* 544ΔvjbRpFTvirB) est inférieur au nombre de *B.abortus* où vjbR est fonctionnel (*B. abortus* 544 et de *B. abortus* 544pFTvirB). Ces résultats confirment que vjbR est important dans la virulence de *Brucella*, et qu'il n'intervient pas dans la pénétration, mais dans la capacité de *Brucella* à survivre dans la cellule et à se multiplier.

IV. DISCUSSION

La question à la base de notre travail est l'implication de VjbR dans la régulation de l'opéron *virB*, et des gènes *fliF* et *babR*, cibles choisis à priori (But du travail). La stratégie que nous avons choisi d'utiliser est de réaliser des fusions des promoteurs putatifs des gènes *virB*, *fliF* et *babR* avec un gène rapporteur et de les intégrer dans le contexte chromosomique d'une *Brucella* sauvage et d'une *Brucella* délétée pour le gène *vjbR*.

Le but de nos expériences est d'analyser, selon que VjbR soit ou non présent, l'activation des promoteurs de l'opéron *virB*, et des gènes *fliF*, et *babR* en cellules HeLa. Le gène rapporteur que nous avons choisi est le gène *gfp*, qui encode pour la green fluorescent protein (GFP). Il existe d'autres systèmes rapporteurs, *lacZ*, *lux* et *cat*. Les produits qu'ils encodent, respectivement la β -galactosidase, la luciférase, et la chloramphenicol acetyltransferase, ont besoin de substrats additionnels pour permettre la détection d'une éventuelle activation par le promoteur cloné en amont. La GFP a l'avantage de ne requérir que de la lumière. Il semble donc plus pratique d'utiliser la GFP. De plus des études menées au laboratoire ont montré que la GFP n'interfère pas avec la croissance et la virulence de *Brucella*.

Afin de pouvoir tester si l'expression de *virB*, *fliF* et *babR* est différente dans une souche de *Brucella* sauvage et une souche ne possédant plus VjbR (*Brucella* Δ VjbR), il nous fallait un gène rapporteur permettant une étude en intracellulaire. En effet, à ce jour, nous ignorons si le gène *vjbR* est exprimé hors de la cellule. De plus, il a été montré que les gènes *virB* et *fliF* sont des gènes spécifiquement induits dans les cellules et actuellement aucune condition *in vitro* d'expression de *fliF* n'a été identifiée. De plus, nous envisageons dans la suite du travail de caractériser en immunofluorescence (IF) le compartiment dans lequel s'expriment ou ne s'expriment plus les 3 gènes selon qu'ils soient dans la souche sauvage ou délétante. Afin de réaliser nos objectifs avec une même construction, nous devons donc utiliser un gène rapporteur visualisable en IF et dont l'expression pouvait être quantifiable. Le gène *gfp* répondait à nos exigences. En effet, la détection de l'expression de *lacZ* a pour principal désavantage de ne pouvoir être détectées sans destruction des cellules (Zhang YZ *et al.*, 1991), comment dès lors analyser l'expression différentielle au cours du trafic intracellulaire de la bactérie. La luciférase, quant à elle, nécessite l'O₂ pour catalyser l'oxydoréduction produisant la bioluminescence, dès lors son utilisation est limitée à des conditions où la

concentration en oxygène est suffisante ce qui pourrait être une limitation à son utilisation en intracellulaire. De plus actuellement, aucune étude n'a montré la possible utilisation de ce gène rapporteur chez *Brucella*.

Toutefois la GFP a le désavantage de ne pas amplifier le signal contrairement aux enzymes produites entre autres par *lacZ* ou *lux*. Ces enzymes, par leur activité catalytique, permettent d'augmenter le signal, et dès lors peuvent rendre compte d'une activation par le promoteur, si faible soit elle. La GFP ne détectera pas de faibles activations car la fluorescence est proportionnelle au nombre de GFP solubles dans la cellule bactérienne. Une solution à ce problème pourrait être d'utiliser un plasmide réplcatif et présent en multiples copies chez *Brucella*. Cette alternative est utilisée dans de nombreuses études utilisant le *gfp* comme gène rapporteur chez les bactéries (Valdivia and Falkow, 1996 ; Valdivia *et al.*, 1996 ; Dhandayuthapani *et al.*, 1995). Cependant, l'utilisation de ce type de plasmide peut apporter un inconvénient majeur dans une étude sur la régulation transcriptionnelle. En effet, le nombre de promoteurs régulables ne reflète pas les conditions naturelles et tous ces promoteurs pourraient excéder la quantité de régulateurs transcriptionnels produits dans le contexte chromosomique. Cela entraînerait qu'une partie des gènes rapporteurs ne soient pas régulés. Si le régulateur est un répresseur, il y aura répression d'une partie des gènes rapporteurs, les autres seront transcrits et l'expression de la *gfp* sera détectée, ce qui donnera lieu à de faux résultats. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser un plasmide suicide afin d'être dans un système intégratif en copie unique. De plus, des travaux visant à analyser l'expression différentielle de gènes et la localisation de protéines durant la sporulation chez *Bacillus subtilis*, montrent qu'il est tout à fait possible d'étudier l'expression de la *gfp* dans un système de copie unique (Webb *et al.*, 1995). Pour nous réconforter d'avantage dans notre choix, des travaux menés au laboratoire confirment que le fait de travailler en système intégratif avec le gène rapporteur *gfp* permet d'analyser efficacement l'activation de promoteurs (Flore Bellefontaine, communication personnelle).

Une partie de notre travail a été de cloner les promoteurs putatifs de l'opéron *virB*, et des gènes *babR*, et *fliF*, en amont du gène rapporteur *gfp*. Les régions intergéniques comprenant les promoteurs putatifs ont été clonées dans le pSKoriTCATgfp2, en fusion traductionnelle avec la *gfp*. Dans un plasmide conçu pour une fusion traductionnelle, le gène rapporteur se trouve dépourvu de son ATG et de son RBS. Dès lors, les promoteurs putatifs, clonés au site multiple de clonage en amont du gène rapporteur, doivent apporter le codon start ATG de l'ORF qu'ils régulent et le site de fixation du ribosome (RBS pour Ribosome Binding Site). Dans un plasmide conçu pour une fusion transcriptionnelle, le gène rapporteur possède son

propre codon start, et, en amont se trouve le site d'initiation de la traduction soit le RBS. Dès lors, la région clonée ne doit contenir ni l'ATG, ni le RBS.

Il est avantageux de réaliser des fusions traductionnelles pour diverses raisons :

- 1 Dans une fusion traductionnelle, comme dans une fusion transcriptionnelle, la transcription du gène rapporteur est régulée par la région promotrice clonée en amont. Mais la fusion traductionnelle permet en plus de réguler l'initiation de la traduction du gène rapporteur, puisqu'elle apporte le RBS et l'ATG. Ceci a pour avantage que les premières étapes de la traduction à partir de l'ARNm du gène rapporteur soient équivalentes aux premières étapes de la traduction à partir de l'ARNm du gène situé en aval du promoteur dans la souche sauvage. Les conditions d'expression du gène rapporteur dans une fusion traductionnelle sont donc d'avantage similaires à celles observées chez la souche de *Brucella* sauvage.
- 2 Un autre avantage de la fusion traductionnelle est lié à un désavantage de la fusion transcriptionnelle. Les promoteurs clonés en amont du gène rapporteur étant putatifs, il n'est pas certain que lors de leur détermination, les boîtes -10, -35, ou le RBS n'ont pas été intégrés. Lors de la fusion, il est donc possible qu'il y ait non seulement les sites d'initiation de la transcription et de la traduction du gène rapporteur, mais aussi ceux insérés par la région clonée. Le ribosome risque ainsi d'avoir deux sites de liaison possible, le choix de celui apporté par la région clonée risque d'aboutir à un biais dans la traduction du gène rapporteur.

Lors d'une fusion traductionnelle, il faut vérifier que l'ATG apporté dans la fusion soit en phase avec le reste des codons encodant la GFP. Dans notre cas la restriction *EcoRV* du pSKoriTCATgfp2 génère un décalage de phase dans le gène *gfp* (Figure 7 dans Résultats). Afin de rétablir la phase, il a fallu ajouter deux bases à l'ATG amené lors du clonage des régions intergéniques situées en amont de l'opéron *virB* et des gènes *fliF* et *babR*. Ces deux bases ont été choisies de manière à ne pas générer d'acide aminé pouvant perturber la structure et/ou la fonction de la GFP. Le meilleur choix consiste en un acide aminé non chargé et non encombrant. C'est pourquoi nous avons choisi de créer une glycine. Cependant, la demi-vie des protéines réside dans leur extrémité N-terminale (N-end rule). Ce signal est appelé le N-degron, et selon sa composition en acides aminés, la protéine est plus ou moins rapidement dégradée. La voie de dégradation fait intervenir de nombreux composants nécessaires à la reconnaissance et à la dégradation des protéines. Il existe des résidus stabilisants, et des résidus déstabilisants. Les résidus déstabilisants se répartissent en trois

catégories, selon qu'ils se lient à la N-recognition, à la Leu/Phe-tRNA-protein transferase, ou à l'amidohydrolase N-terminale. Les résidus stabilisants, chez *E.coli*, sont la glycine, la valine, et la méthionine. Ils sont dits stabilisants car les protéines de reconnaissance et de dégradation ne les lient pas de manière suffisante que pour mener à la dégradation de la protéine. Ces protéines ont donc un temps de demi-vie plus long (Varshavsky, 1996). L'ajout d'une glycine à l'extrémité N-terminale de la GFP nous apparaît donc être stabilisatrice.

Les promoteurs putatifs ont donc été amplifiés sur l'ADNg de la souche de *B. melitensis* 16M (NaI^R). Ils ont ensuite été clonés dans un plasmide portant le gène rapporteur *gfp*, le pSKoriTCATgfp2, pour donner les plasmides pFT*virB*, pFT*fliF*, et pFT*babR*. Après avoir construit les fusion traductionnelles, elles ont du être insérer dans des souches de *Brucella* sauvage et des souches où l'ORF *vjbR* avait été délétée. Ces plasmides sont des vecteurs suicide chez *Brucella* et doivent donc obligatoirement s'intégrer dans le génome pour se maintenir. Cette intégration est supposé se faire par recombinaison entre les promoteurs putatifs du plasmide et leur homologue dans le génome. Au départ de ce travail, il existait, au laboratoire, un mutant dans le gène *vjbR*, appelé mutant 32D3. Ce mutant fait partie d'une banque de mutants transpositionnels miniTn5-*Kmcat*, il possède donc le gène *cat*, qui code pour une protéine conférant la résistance au chloramphénicol. Cette caractéristique du mutant 32D3 pose un double problème. Tout d'abord, le gène *cat* s'exprime dans le mutant 32D3 ce qui conduit au fait que le mutant 32D3 est résistant au chloramphénicol. Or, l'antibiotique à utiliser pour sélectionner les bactéries transformées par le pSKoriTCATgfp2 et ses dérivés, les plasmides pFT*virB*, pFT*fliF*, et pFT*babR*, est le chloramphénicol. Il n'y a donc pas moyen de sélectionner des candidats potentiellement transformés par les plasmides pFT*virB*, pFT*fliF*, et pFT*babR* dans le mutant 32D3. Le second désavantage est que le plasmide pourrait s'intégrer non pas au niveau des régions homologues du génome de *Brucella*, mais au niveau de la cassette *cat* du transposon intégré dans l'ORF *vjbR*. Cette situation apparemment non dérangeante puisqu'on se trouve en une copie unique dans la souche bactérienne, ne nous permettrait pas de comparer l'expression du gène rapporteur dans une souche sauvage et la souche délétée pour *vjbR* car le contexte chromosomique de chacune des intégrations est différent. Pour résoudre ce problème, des souches délétantes pour *vjbR* ont été créées d'une part chez *B. melitensis*, et d'autre part chez *B. abortus*, Il était intéressant d'obtenir un délétant pour *vjbR* dans ces deux souches de *Brucella* virulentes car certains travaux montrent des résultats contradictoires concernant notamment l'expression de l'opéron *virB*. En effet Sieira *et al.* (2000) ont montrés que l'opéron *virB* est induit en phase stationnaire chez *B. abortus* c'est-à-dire lorsque la densité de population est importante et que les AHL produites

activent normalement des régulateurs transcriptionnelles spécifiques (Figure 11 dans l'introduction). Cependant les travaux menés au laboratoire sur démontrent que l'addition de la C₁₂-HSL, AHL produite par *B. melitensis*, entraîne la répression de la transcription de l'opéron *virB* chez des bactéries en moitié de phase exponentielle, (Taminiau B., communication personnelle). Nous avons obtenu 4 souches de *Brucella* délétantes pour le gène *vjbR*, 3 chez *B. abortus*, et une chez *B. melitensis* 16M. Des cellules HeLa ont ensuite été infectées par ces quatre souches, afin d'analyser l'effet de la délétion sur la capacité des *Brucella* à se répliquer en cellules. Les résultats confirment ceux obtenus lors de l'analyse du mutant 32D3, à savoir que la perte de *vjbR* affecte la survie intracellulaire de *Brucella*. Afin d'expliquer d'avantage ce que nous entendons par survie intracellulaire dans le contexte du mutant transpositionnel *vjbR*, il faut savoir que ce mutant pénètre dans les cellules HeLa en nombre similaire à la souche sauvage (environ 1000 *Brucella* sont intracellulaires après 2 heures d'infection des cellules HeLa). Mais au contraire de la souche sauvage qui se multiplie dans les cellules HeLa après une période de latence de 12 heures, le mutant *vjbR* ne fait que survivre. Cela signifie que les 1000 bactéries intracellulaires détectées au début de l'infection (p.i. 2 heures) restent vivantes dans les cellules et sont dénombrées après 48 heures d'infection.

La construction pFTvirB a été obtenue chez *Brucella* 544, et *Brucella abortus* 544Δ*vjbR*. Avant de faire les différents tests pour analyser l'expression des gènes *virB* dans les souches sauvages et délétantes, nous avons réalisé des infections cellulaires pour vérifier que la construction ne modifie pas la virulence par son insertion dans le génome. Les résultats montrent que la pénétration et la réplication ne sont pas modifiées par l'intégration de la construction dans le génome des *Brucella*. Ces résultats indiquent également que *vjbR* n'est pas requis pour la pénétration en cellule HeLa, puisqu'au point 2 heures, il n'y a pas de différences entre les souches délétantes et les souches sauvages.

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de notre travail était de déterminer si la protéine VjbR est impliquée dans la régulation de l'opéron *virB*, des gènes *fliF* et *babR*. A cette fin, nous avons choisi d'étudier l'activation des promoteurs de *virB*, *fliF*, et *babR* à l'aide de la technique du gène rapporteur *gfp* dans le contexte chromosomique d'une souche sauvage et d'une souche délétée de l'ORF *vjbR*. Lors de ce travail, nous avons créé les constructions nécessaires à ces études. D'abord, nous avons réalisé des souches de *B. abortus* 544 et *B. melitensis* 16M délétantes pour l'ORF *vjbR*. Des analyses réalisées en infections cellulaires par R.M. Delrue révèlent que cette délétion atténue la virulence de *Brucella* en cellules HeLa de manière similaire au mutant transpositionnel dans l'ORF *vjbR*. En parallèle nous avons créé les systèmes rapporteurs (fusion avec le gène *gfp*) permettant d'étudier les effets de l'absence de VjbR sur la régulation de l'opéron *virB*, et des gènes *fliF*, et *babR*. Le système rapporteur permettant d'étudier l'effet de VjbR sur la régulation de l'opéron *virB* a été intégré dans les souches de *B. abortus* 544 sauvage et délétante pour l'ORF *vjbR*.

A la suite de ce travail, il faudrait étudier analyser l'expression de l'opéron *virB* dans la souche sauvage et la souche délétante pour *vjbR* en cellules HeLa.. En effet, actuellement, on ignore si *vjbR* s'exprime de manière constitutive ou si des stimuli sont nécessaires. La seule donnée expérimentale que nous avons est que VjbR est nécessaire aux *Brucella* pour atteindre leur compartiment de réplication lors d'une infection de cellules HeLa.. De plus, des données expérimentales montrent que *virB* est spécifiquement exprimé au cours de l'infection de macrophages (O'Callaghan, communication personnelle). C'est donc le long d'une cinétique d'infection qu'il faut analyser l'expression de l'opéron *virB* dans les souches sauvages et délétantes pour l'ORF *vjbR*. Par cette expérience, nous pourrions répondre rapidement à la question « Est-ce que VjbR régule *in vivo* l'expression du système de sécrétion de type IV ? ».

Au cours de la cinétique nous pourrions également déterminer le moment d'induction de l'activation de la transcription de l'opéron *virB*. Nous pourrions alors à ce temps d'infection, caractériser, par double marquage en immunofluorescence, le compartiment cellulaire dans lequel cette expression a lieu.

Dans le cas où, en cellules HeLa, nous observerions une expression différentielle de l'opéron *virB* dans une souche sauvage de *Brucella* et une souche délétante pour l'ORF *vjbR*, il serait intéressant d'analyser l'expression de l'opéron *virB* en réponse à différents stress *in*

in vitro dans les 2 souches de *Brucella*. Nous choisirions de réaliser un choc acide, une limitation en nutriment, un choc osmotique, la réponse à différents ions, un choc oxydatif... qui sont autant de stimuli rencontrés au cours de l'infection de cellules eucaryotes. Il semblerait déjà que l'opéron *virB* soit induit à pH acide, et dans un milieu minimum de composition particulière appelé « minimal E-medium ». (O'Callaghan, communication personnelle). Ces expériences nous permettront d'analyser si VjbR est impliqué dans toutes les conditions d'activation ou de répression de la transcription de l'opéron *virB*.

Un autre test à réaliser *in vitro* est l'analyse de l'activation du promoteur de *virB* au cours de la courbe de croissance afin de déterminer le moment d'induction, et d'observer si la délétion de *vjbR* affecte cette induction. VjbR étant un régulateur du quorum sensing, son activité devrait être densité de population-dépendante. Dès lors, s'il régule l'opéron *virB*, cette régulation variera selon que les *Brucella* sont en phase de latence, exponentielle, ou stationnaire. Or il a été montré que chez *B.melitensis* et chez *B.abortus*, *virB* est régulé en fonction de la densité de population, même si les résultats obtenus chez ces deux espèces sont contradictoires, d'où l'intérêt de réaliser ces études en parallèle dans les deux espèces de *Brucella*. En effet, B.Taminiau a montré que *virB* était réprimé par la C₁₂-HSL tandis que les travaux de Sieira *et al.*, 2000, montrent une induction de l'opéron en phase stationnaire. Dans cet optique nous pourrions également déterminer si dans des conditions d'expression de l'opéron *virB* chez *B. melitensis*, l'addition de C₁₂-HSL réprime son expression de manière similaire dans la souche sauvage et la souche délétante pour l'ORF *vjbR*. Cette expérience nous permettra de mettre en évidence si VjbR se trouve dans la voie de répression de la transcription de l'opéron *virB* activé par la C₁₂-HSL.

Les mêmes types d'études devront être réalisées avec les constructions pFT*fliF*, et pFT*babR* afin d'analyser l'effet de la délétion sur la régulation de ces gènes.

Si VjbR régule un des gènes que nous avons décidé d'étudier, il serait intéressant de caractériser la forme prise par VjbR pour lier la séquence promotrice. Les régulateurs transcriptionnels densité de population-dépendants, tels que TraR d'*Agrobacterium tumefaciens* (Qin *et al.*, 2000), et LuxR de *Vibrio fischeri* (Fuqua, Winans and Greenberg, 1996, review) dimérisent en présence de leur AHL spécifique pour lier leur séquence consensus dans la région promotrice. Il sera dès lors intéressant d'analyser si la présence de C₁₂-HSL, l'AHL identifiée chez *Brucella*, promeut la liaison de VjbR, en induisant sa dimérisation, au promoteur des gènes qu'elle régule. Nous pourrions ainsi déterminer si la C₁₂-HSL est l'AHL capable de lier VjbR.

La souche délétante construite au cours de ce travail permettra en outre de réaliser des expériences avec l'ARNmessenger pour compléter l'approche utilisée avec le gène rapporteur *gfp*. Elle permettra de confirmer l'induction ou la non-induction par VjbR de l'opéron *virB* et des gènes *fliF* et *babR* par la technique du Slot Blot. Elle nous permettra de montrer l'induction ou la répression de la transcription des gènes d'intérêt sans que le contexte chromosomique de ces gènes ne soient en quelque manière modifié. Le désavantage de la quantification de l'ARNm est que pour cette analyse il est nécessaire d'avoir déjà déterminé des conditions *in vitro* avant d'entamer cette analyse. En effet, nous risquons d'être limité par la quantité d'ARNm que nous pourrions obtenir à partir de bactéries récupérées après une lyse cellulaire.

Dans l'optique de l'identification de gènes potentiellement régulés, elle permettra également d'identifier de nouvelles cibles, notamment par la technique du differential display.

VI. MATERIELS ET METHODES

1. Souches bactériennes et plasmides

1.1 Souches bactériennes

1.1.1 *E.coli* S17 -1 :

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

1.1.2 *E.coli* DH10B :

Cette souche est utilisée pour la transformation par divers plasmides ou produits de ligation. Son génotype est le suivant : F⁻ mcrA Δ {mrr-hsdRMS-mcrBC} φ80dlacZΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ (ara, leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL λ.

1.1.3 *Brucella* sp. :

La souche *B. melitensis* 16M est une souche de phénotype lisse, l'agglutination se produit avec un anti-sérum M. La souche utilisée est une variante de la souche sauvage résistante à l'acide nalidixique (Nal^R). La souche *B. abortus* 544, est une souche lisse, avec laquelle l'agglutination se produit avec un anti-sérum A. La souche utilisée est une variante de la souche sauvage résistante à l'acide nalidixique (Nal^R).

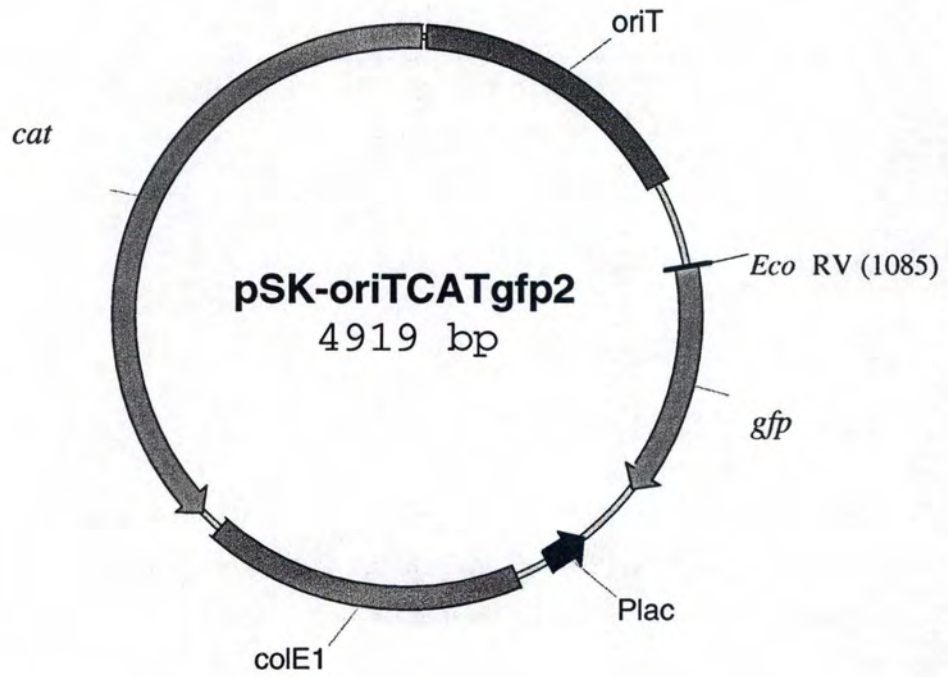


Figure 1 :Représentation schématique du pSKoriTCATgfp2

Le gène *cat* encode une protéine conférant la résistance au chloramphénicol et disrulte le gène *bla* du pSKoriT.

L'*oriT* est l'origine de transfert.

ColE1 = origine de répllication chez *E.coli*.

gfp = gène rapporteur

Le site *EcoRV* est montré.

1.2 Plasmides

1.2.1 pSKoriTCATgfp2 :

Le pSKoriTCATgfp2 est un dérivé du pSKoriT qui est lui-même issu du pBluescript SK(-) dans lequel une origine transfert conjugatif oriT a été clonée.

Le pSKoriT, en plus de l'oriT, possède une origine de réplication ColEI non fonctionnelle chez *Brucella* (il s'agit donc d'un vecteur suicide dans cette bactérie), et le gène *bla*, encodant la résistance à l'ampicilline. La disruption du gène *bla* du pSKoriT par la cassette *cat*, encodant la résistance au chloramphénicol, donne le pSKoriTCAT. Le gène rapporteur *gfp* a été cloné dans le site multiple de clonage du pSKoriTCAT, en sens inverse du Plac (le Plac est un promoteur fort et constitutif chez *Brucella*), ce qui donne le pSKoriTCATgfp2. (Figure 1).

L'utilisation du gène encodant la GFP comme gène rapporteur :

La GFP (Green Fluorescent Protein) a été isolée chez un poisson luminescent, *Aequorea victoria*. Elle est composée de 238 acides aminés, et fait ~2.7 kDa. Elle absorbe la lumière bleue à une longueur d'onde maximale de 395 nm, et émet de la lumière verte à un pic d'émission de 508 nm. Elle s'exprime dans des systèmes hétérologues, tels que des cellules eucaryotes et procaryotes.

Contrairement à d'autres gènes rapporteurs comme la β -galactosidase ou la luciférase, elle ne nécessite ni substrats additionnels, ni cofacteurs. Elle ne requiert que l'irradiation lumineuse. (Chalfie *et al.*, 1994).

La GFP est très stable, puisqu'elle reste fluorescente à des températures de l'ordre de 65°C, ainsi qu'à pH11. Elle résiste à 1% de SDS, et aux protéases durant plusieurs heures. (Cubitt *et al.*, 1995).

Elle résiste également au paraformaldéhyde, elle peut donc être utilisée dans l'examen de préparations fixées. (Chalfie *et al.*, 1994).

Elle doit sa fluorescence à un chromophore formé par la cyclisation des acides aminés Serine 65, Tyrosine 66, et Glycine 67, et la déhydrogénation de la tyrosine. (Cubitt *et al.*, 1995).

Cormack *et al.*, 1996, ont isolé trois mutants, GFPmut1, 2 et 3, de cette protéine apportant divers avantages par rapport à la protéine sauvage. Leur fluorescence maximale est de 100

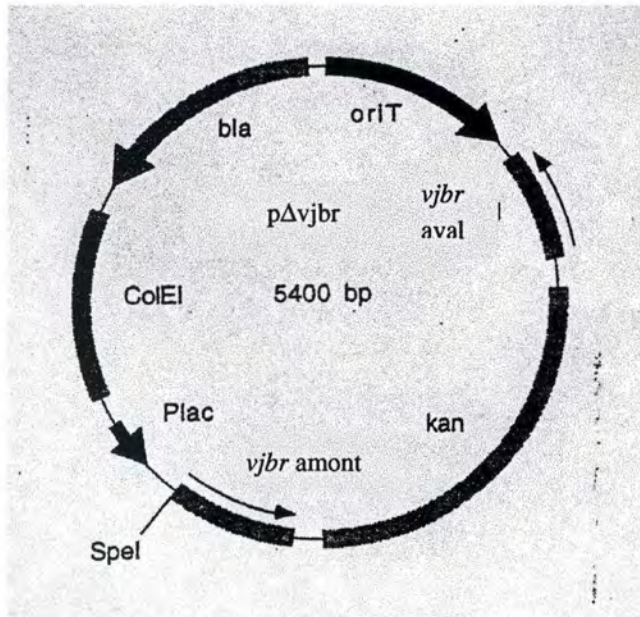


Figure 2 : Schéma du plasmide pΔvjbr.

Le gène *bla* codant pour une protéine conférant la résistance à l'ampicilline.

L'*oriT* est l'origine de transfert.

ColE1 = origine de répllication chez *E.coli*.

La cassette *kan* code pour une protéine conférant la résistance à la kanamycine.

vjbr amont correspond à la région en amont de l'ORF *vjbr* dans le génome.

vjbr aval correspond à la région en aval de l'ORF *vjbr* dans le génome.

fois supérieure à celle de la sauvage, leur chromophore se forme plus rapidement. La GFPmut 2 et 3 ainsi que la 1 mais à moins forte raison sont solubles. Alors qu'à 37°C, il faut de une à deux heures pour détecter la fluorescence avec la protéine sauvage, il ne faut que 8 minutes avec les trois variantes. Enfin, et c'est l'avantage principal, elles absorbent à une longueur d'onde plus élevée. En effet, leur pic d'absorption optimal est situé entre 480 et 501 nm, ce qui est compatible avec la lumière d'excitation utilisée dans le FACS. Le pic d'émission reste inchangé (entre 507 et 511 nm). (Cormack *et al.*, 1996).

La GFPmut3 qui diffère de la GFP par deux substitutions (S65G et S72A), est la forme que nous utiliserons dans notre travail.

1.2.2 p Δ vjbr:

Le p Δ vjbr est un dérivé du pSKoriT. Il contient donc le gène *bla*, l'oriT, et l'ori ColE1. Il porte en plus la cassette *kan*, encodant la résistance à la kanamycine, bordée des régions amont et aval de l'ORF *vjBR* de *Brucella melitensis*. (Figure 2).

2. Milieux de culture

2.1 milieu Luria Bertani (LB) :

- Hydrolysate de caséine (peptone) 1 g/100 ml
- NaCl 0,5 g/100 ml.
- Yeast extract 0,5 g/100 ml.

Le milieu est autoclavé (20 minutes à 120°C).

2.2 Milieu LB solide :

Il s'agit du même milieu si ce n'est que celui-ci contient en plus 2% d'agar. Après avoir été autoclavé, le milieu est refroidi à 55°C. Il peut ensuite être additionné d'antibiotiques (comme mentionné ci-dessous) ou d'autres additifs.

Noms et abréviations	Solution de dissolution	Concentration	Concentration
----------------------	-------------------------	---------------	---------------

		stock	finale
Acide nalidixique / Nal	NaOH 0,2N	25mg/ml	25µg/ml
Kanamycine / Kan	H ₂ O	25mg/ml	25µg/ml
Chloramphénicol / Cm	EtOH 70%	20 mg/ml	20µg/ml

2.3 Milieu 2YT :

La composition de base de ce milieu est la même que celle du LB, à la différence près que le 2YT contient 2 fois plus de Yeast extract.

-NaCl 0,5g/100ml

-Yeast Extract 1g/100ml

-Hydrolysa de caséine (peptone Gibco BRL) 1g/100ml

-(Agar 2g/100ml en cas de 2YT solide) Le milieu est autoclavé 20 minutes à 120°C

3. Techniques d'ADN recombinant

3.1 Extraction d'ADN plasmidique (par minipréparation)

Une miniprep comprend 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 plasmidique et enfin sa resuspension.

- Ensemencer 5 ml de milieu liquide (LB+antibiotiques) avec une colonie isolée.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.
- Centrifuger 1.5 ml de la culture dans un eppendorf pendant 5 minutes à 5000 rpm et éliminer le milieu de culture.
- Resuspendre ce culot dans 300 µl de P1(avec RNase A)
- Ajouter 300 µl de P2 et mélanger doucement, incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 300 µl de P3 et mélanger doucement, incuber 10 minutes sur glace.
- Centrifuger 15 minutes à 12500 rpm et récupérer le surnageant.
- Précipiter l'ADN en ajoutant 0.7 volume d'isopropanol, homogénéiser.

- Centrifuger 15 minutes à température ambiante (à 12500 rpm), éliminer le surnageant.

- Laver l'ADN en ajoutant 300 µl d'éthanol 70% et centrifuger 5 minutes à 12500 rpm à 4°C. Éliminer prudemment l'éthanol.

- Sécher sous vide quelques minutes.

- Resuspendre dans 20 à 50 µl d'H₂O distillée stérile (suivant le nombre de copies du plasmide récupéré).

Solutions et tampons:

- Tampon P1 (stocké à 4°C):

RNAse A 100 µg/ml

Tris-HCl 50 mM, pH 8.0

EDTA 10 mM

- Tampon P2:

NaOH 200 mM

SDS 1% (stocké à température ambiante)

- Tampon P3: KAc 3.0 M pH 5.5 (stocké à 4°C)

3.2 Restriction de l'ADN :

Le clivage de l'ADN bicaténaire à des sites précis se fait par des endonucléases de restriction qui reconnaissent de courtes séquences d'ADN. En pratique, la réaction se fait par incubation de l'ADN avec une ou plusieurs enzymes de restriction commerciale.

Mélange de restriction:

- x µg d'ADN à restreindre en suspension dans de l'eau distillée.

- Tampon de restriction 10x concentré: 1/10 du volume final (tampon commercial fourni avec l'enzyme).

Enzyme de restriction: au maximum 1/10 du volume final, sinon le glycérol dans lequel baigne l'enzyme modifie son activité. Entre 2 et 10 unités d'enzyme par µg d'ADN (en fonction de la pureté de l'ADN et de l'efficacité de l'enzyme).

- Eau distillée stérile pour atteindre le volume final.

- Incubation d'1h30 à la température optimale pour l'enzyme (souvent 37°C).

- Analyse par électrophorèse en gel d'agarose.

- La réaction peut aussi être stoppée soit par chauffage (15 à 20 minutes à 65°C) si l'enzyme est thermosensible, soit extraite par une extraction en phénol/chloroforme.

3.3 Extraction au phénol/chloroforme :

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

Méthode :

- Porter le volume de la solution à un minimum de 100 µl.
- Ajouter 1 volume d'une solution de phénol saturé en chloroforme. Vortexer.
- Centrifuger 5 minutes dans une microfuge à vitesse maximale.
- Prélever avec précaution la phase supérieure, en évitant de reprendre l'interface.
- Sécher le culot au speed vac quelques minutes
- Précipiter l'ADN à l'éthanol.

3.4 Précipitation à l'éthanol :

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

- Vortexer et placer 30 minutes à -80°C.
- Centrifuger à vitesse maximale pendant 25 minutes à 4 °C dans une minifuge , éliminer le surnageant prudemment.
- Laver en ajoutant de l'éthanol 70% froid
- Centrifuger 5 minutes à 4 °C, éliminer le surnageant.
- Resuspendre dans un volume adéquat d'eau stérile.

3.5 Electrophorèse en gel d'agarose :

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

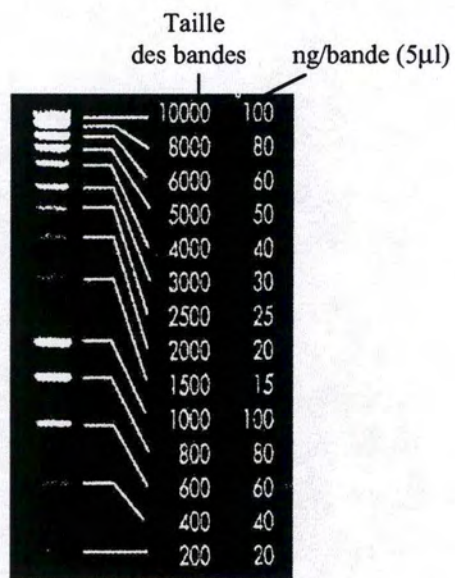


Figure 3 : Smart Ladder (Eurogentec).

La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Fut utilisé, comme marqueur de taille, le SmartLadder commercialisé par Eurogentec. (Figure 3).

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. Le bromure d'éthidium, molécule fluorescente, marque l'ADN et est visible sous illumination UV. Il faut cependant noter que la fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille, mais aussi à la quantité d'ADN présente. En connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de taille, on peut estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison de l'intensité de la fluorescence.

Méthode :

- Immerger le gel dans une cuve d'Electrophorèse remplie de tampon TAE, auquel on a ajouté quelques µl d'une solution de bromure d'éthidium.
- Préparer les échantillons en ajoutant 1/10 de solution d'alourdisseur 10x concentré.
- 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: -glycérol 50%
 - EDTA 100mM, SDS 1%
 - Bleu de bromophénol
- Tampon TAE (50 fois concentré) : -Tris-HCl, pH 8,0 40mM
 - EDTA 2mM
 - Acide acétique glacial 0,1M

3.6 Réaction de ligation :

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

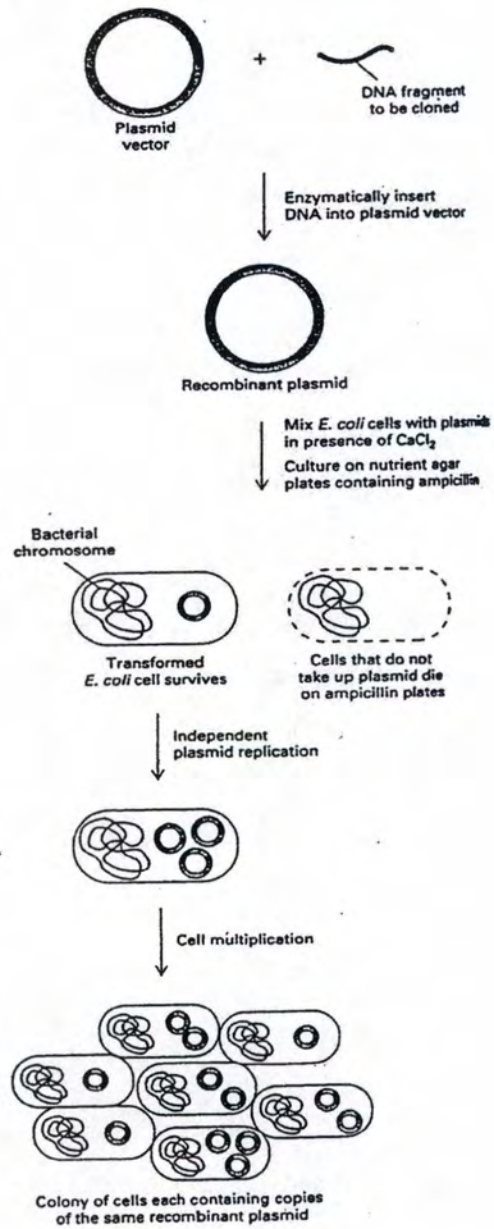


Figure 4 : Représentation du principe de transformation bactérienne

travaille avec environ 100 ng de vecteur restreint et un rapport molaire vecteur/insert de 1/5 à 1/10.

Méthode:

- Dans un eppendorf, placer un mélange des deux fragments à liguer
- Ajouter 1 µl d'ADN ligase T4.
- Ajouter 1/10 du volume total de tampon de ligation (10x concentré, commercial).
- Compléter avec de l'eau distillée stérile.
- Incuber à 14-16°C pendant 10 à 14 heures si les extrémités sont protrudantes, ou quelques heures à environ 25° si les extrémités sont à bouts francs.
- La ligase est inactivée 15' à 78°C.
- Conserver le mélange de ligation à -20°C.

Témoins à utiliser:

- Un vecteur restreint dont le mélange de ligation ne contient pas de ligase: les molécules de ce vecteur restent linéaires et sont par là-même incapables de transformer efficacement les *E. coli* compétentes. Les colonies apparues sur milieu sélectif après transformation s'expliquent par la présence de vecteurs non-restreints; ce témoin permet d'évaluer la proportion des transformants due aux vecteurs non restreints.
- Un vecteur restreint soumis à l'action de la ligase, il permet de vérifier l'efficacité de la ligase.

3.7 Transformation bactérienne :

La transformation de bactéries compétentes consiste à faire entrer de l'ADN exogène (dans ce cas, un plasmide) dans une bactérie. (Figure 4).

3.7.1 Electroporation bactérienne :

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

Méthode:

Préparation de cellules compétentes

Par une suite de lavages, les bactéries sont dessalées.

- Inoculer 500 ml de LB liquide avec 0,5 ml d'une culture fraîche de bactéries *E. coli*.
- Incuber les bactéries à 37 °C sous forte agitation jusqu'à ce que la culture ait atteint une D.O. de 0,5 à 0,8 à 550 nm (phase mi-log de croissance).
- Placer la culture 15 à 30 minutes dans la glace, culotter les bactéries en centrifugeant à 4°C, à 3000 rpm pendant 15 minutes.
- Éliminer le surnageant. Resuspendre le culot dans 500 ml d'eau MilliQ stérile froide.
- Centrifuger.
- Resuspendre dans 250 ml d'eau froide et centrifuger.
- Resuspendre dans 10 ml d'eau froide contenant 10% de glycérol. Centrifuger.
- Resuspendre dans un volume final de 1 à 2 ml d'eau froide contenant 10% de glycérol. (La concentration cellulaire est d'environ $1 \text{ à } 3 \cdot 10^{10}$ cellules/ml.
- Cette suspension peut être aliquotée sur glace et conservée à -80°C.

Electroporation

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

3.7.2 Transformation chimique

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

Des bactéries gram-négatives *E. coli* en début de phases exponentielle de croissance sont rendues artificiellement compétentes par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium (CaCl_2). Celui-ci déstabilise la paroi de la bactérie, qui gonfle alors en prenant l'aspect d'un sphéroblaste. L'ADN plasmidique ajouté forme avec le calcium un complexe résistant aux désoxyribonucléases. Ce complexe est supposé adhérer à la bactérie. Les bactéries sont soumises à un choc thermique qui permet au complexe de rentrer dans la cellule.

Un temps d'incubation en milieu riche non sélectif permet aux bactéries de régénérer une paroi normale et aux gènes de résistance introduits de s'exprimer. Les transformants sont ensuite isolés par culture sur boîte de milieu sélectif.

Méthode :

Préparation de cellules compétentes

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

Transformation des cellules compétentes

- A 50 à 150 μl de cellules compétentes, ajouter environ 10 μl de mélange de ligation ou 10 à 100 ng d'ADN.
- Déposer 30 minutes sur glace.
- Réaliser un choc thermique de 2 minutes à 42°C.
- Ajouter 900 μl de SOC liquide.
- Incuber 30 min. à 1 heure à 37°C.
- Etaler sur boîtes de milieu sélectif et incuber une nuit à 37°C.

Témoin de transformation

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

3.8 Amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) :

La PCR permet l'amplification de fragments d'ADN.

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

Une ADN polymérase thermostable est alors utilisée pour synthétiser à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque amorce un brin d'ADN. Les différentes enzymes disponibles au laboratoire sont la Taq (Biotools) ,Pwo (Roche) et l'Expand (mélange de Taq et de Pwo) (Roche). Les deux dernières sont des enzymes proof-reading. Un cycle consiste en 3 étapes: dénaturation, hybridation des amorces et élongation. En répétant ce cycle, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies de la cible.

La température d'hybridation utilisée correspond à la température de melting T_m des amorces. Ce T_m se calcule de la façon suivante: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$. De plus, les amorces devront contenir environ le même pourcentage de bases G-C que l'ADN cible. Il est également recommandé, de façon à limiter l'amplification non spécifique, que l'amorce contienne un excès de G/C à l'extrémité 5' et au centre et que les 2 ou 3 dernières bases de l'extrémité soient A/T.

Méthode

- Mélange de réaction réalisé dans un microtube:
- 5 µl de tampon d'ADN polymérase (spécifique de l'enzyme utilisée) 10X concentré
- 2 µl de dNTP 10 mM
- 1 µl de primer 1 à 100 pmol/µl
- 1 µl de primer 2 à 100 pmol/µl
- 1 µl d'enzyme (2 U/µl) (Taq polymérase / Expand ou Pwo pour une amplification proof-reading)

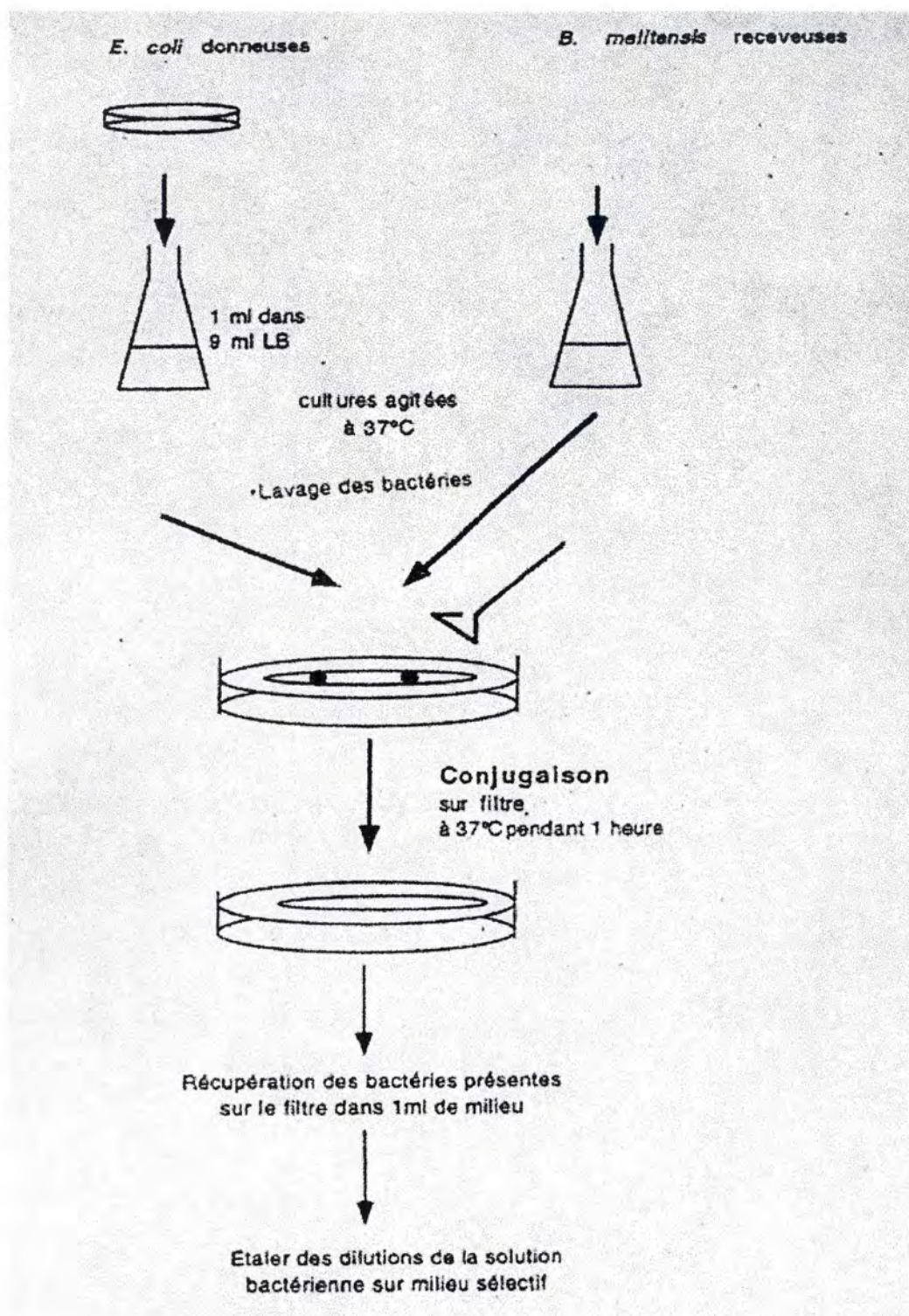


Figure 5 :Principe du protocole de conjugaison entre *E.coli* S17 et *Brucella*.

- Porter à 50 µl avec de l'eau distillée stérile
- Programmer l'appareil à PCR comme suit:
- Dénaturation de 5' à 95°C.
- 30 cycles d'amplification présentés comme suit:
 - 1 min. à 95°C pour la dénaturation
 - 1 min. à X°C pour l'hybridation (X est inférieur ou égal à la température d'hybridation des oligonucléotides)
 - Y sec. à 72°C pour la polymérisation (68°C pour l'Expand) (Y=1 minute / kb à amplifier)
- Elongation finale de 10 minutes à 72°C.
- Déposer 1/10^e du volume sur gel d'agarose et conserver le reste à -20°C
- Afin de purifier les produits d'amplification, le kit Gibco-BRL (rapid PCR purification system) fut utilisé .

4. Conjugaison

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

Les contrôles de résistance aux antibiotiques utilisés sont: les bactéries donneuses sont étalées sur un milieu sélectif contenant de l'acide nalidixique et les *Brucella* (Nal^R) receveuses sont étalées sur un milieu additionné de l'antibiotique auquel résiste les *E. coli* donneuses. (Fig.5).

Méthode

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

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

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

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

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

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

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

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

-Incuber 3-4 jours à 37°C.

5. Coloration de Gram

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

-Déposer une goutte de NaCl 7,5% sur une lame porte-objet

-Prélever quelques bactéries de la colonie à examiner

-Déposer ces bactéries dans la goutte et étaler sur la lame

-Laisser sécher

-Couvrir la lame d'alcool et flamber, laisser refroidir

-Couvrir de violet de gentiane (1 minute)

-Éliminer l'excès de colorant et couvrir de lugol (30 secondes)

-Rincer à l'eau, décolorer prudemment à l'éthanol, rincer de nouveau à l'eau

-Contre colorer à la safranine (1 minute)

-Sécher et observer au microscope à immersion

6. Extraction d'ADN génomique de *Brucella*

protocole :

- Centrifuger 1ml de culture en phase stationnaire 5' à 14.000 rpm
- Resuspendre le culot dans 567 µl de TENa
- Ajouter 30 µl de SDS 10%, 3 µl de protéinase K 20 mg/ml et 2 µl de RNase
- Homogénéiser en inversant doucement l'éppendorf
- Incuber 1h à 37°C sous agitation
- Ajouter 600 µl de phénol saturé en TENa, agiter fortement
- Centrifuger 20' à 13.500 rpm, 4°C
- Récupérer la phase aqueuse sans emporter le voile à l'interface !
- Ajouter 80 µl de NaClO₄ 5M et 600 µl de chloroforme ; agiter fortement
- Centrifuger 10' à 5.000 rpm 4°C (répéter cette extraction si un nodule blanc est visible à l'interface)
- Récupérer la phase aqueuse et ajouter 1 ml d'éthanol 100% froid (-20°C)
- Mélanger en inversant l'éppendorf, l'ADNg forme un amas visible
- Centrifuger 10' à 13.500 rpm, 4°C
- Eliminer le surnageant, ajouter 1 ml d'éthanol 70% (-20°C)
- Centrifuger 5' à 13.500 rpm, 4°C
- Eliminer le surnageant
- Sécher sous vide et resuspendre le culot d'ADN dans 100 µl d'eau distillée stérile (couper l'extrémité du tips afin d'éviter les forces de cisaillement qui pourraient dégrader l'ADN)
- Afin de faciliter la resuspension, incuber l'éppendorf à 37°C pendant quelques heures
- Conserver l'ADNg à -20°C.

Solutions :

- TENa : Tris 50 mM pH8
EDTA 50mM
NaCl 1mM
- protéinase K 20 mg/ml dans du tampon Tris 1mM pH 7,5 / CaCl₂ 1mM
- Phénol saturé en TENa (volume/volume)

7. Southern blot en radioactivité

Le Southern blot est une technique qui consiste à faire migrer un ADN cible en gel d'agarose, à le transférer sur une membrane de nitrocellulose chargée positivement et à le révéler au moyen d'une sonde spécifique marquée au P³².

Dans notre cas, nous avons restreint l'ADNg de différents mutants et nous avons comparé les profils obtenus en Southern blot par rapport à l'ADNg de la souche sauvage.

7.1 Restriction de l'ADN génomique :

Sur base des séquences théoriques, on détermine quelle enzyme de restriction permet de mettre en évidence une différence entre les souches que l'on veut étudier.

Protocole :

- ±10 µg d'ADNg
- 6 µl de tampon de restriction 10x concentré(spécifique de l'enzyme utilisée)
- 1,5 µl d'enzyme concentrée (40 Uµl) !
- ajuster le volume à 60 µl avec de l'eau distillée stérile
- vérifier la restriction en en déposant 1/10^o sur gel d'agarose 0,8%

7.2 Séparation des fragments d'ADN :

On sépare les fragments d'ADN restreints sur base de leur taille par migration sur gel d'agarose 0,8% à ± 70 volts. Il est important de charger les différents puits avec la même quantité d'ADN (on estime les quantités à charger sur base de la migration précédente). Ne pas oublier de charger le marqueur de taille (Smart ladder). Repérer à l'aide d'une latte les distances des différentes bandes du marqueur par rapport à la ligne de base.

7.3 Transfert sur membrane :

- rincer le gel dans de l'eau bidistillée
- incuber 2 x 20' dans la solution de dénaturation
- incuber 2 x 20' dans la solution de neutralisation

- transférer sur membrane de nylon ou de nitrocellulose par aspiration à l'aide d'un système de transfert sous vide, en veillant à ne pas laisser le gel à sec (le couvrir régulièrement de SSC 10 x).
- sécher la membrane 15' à 80°C entre deux papiers Whatman.
- fixer l'ADN aux UV (quelques secondes)

7.4 Préhybridation :

Il s'agit ici de saturer la membrane en ADN non spécifique. Pour ce faire, on utilise de l'ADN de thymus de veau.

- couvrir la membrane de la solution de préhybridation :
 - 5 ml de DenHardt 50x
 - 12,5 ml de SSC 20 x
 - 0,5 ml de SDS 10%
 - 100 µg/ml de thymus carrier dénaturé (10' dans eau bouillante, puis placé sur glace)
 - eau pour atteindre 50 ml
- 30' à 68°C

7.5 Hybridation :

- marquage de la sonde par "multiprime labelling" (kit Gibco-BRL : rad prime DNA labelling system):
- on utilise, comme sonde, 25 ng d'ADN (dans un volume final de 10 µl) que l'on dénature 5' à 100°C avant de placer sur glace (les brins restent ainsi sous forme dénaturée).
- quick spin, puis sur glace à nouveau
- ajouter 1 µl de dATP (500µM), 1 µl de dTTP (500µM), 1 µl de dGTP (500µM)
- + 20µl random primer solution 2,5 x
- + 5 µl de dCTP³²
- ajuster le volume à 49 µl en ajoutant 11 µl d'eau bidistillée
- mettre la polymérase (Klenow), 1 µl
- quick spin
- 10' à 37°C, quick spin
- ajouter le tout à la solution de préhybridation

- laisser incuber overnight à 68°C

7.6 Révélation

- laver la membrane avec du SSC 2x SDS 0,1%, 10'.
- répéter cette étape une 2° fois jusqu'à atteindre un signal d'émission de ~1000 cpm.
- mettre en cassette avec un film, incuber ~6 heures à -80°C, révéler.

Solutions : - dénaturation : NaCl 1,5 M / NaOH 0,5M

- neutralisation : NaCl 1,5 M / Tris HCl 0,5M pH7,2 / EDTA 0,001M
- SSC 20x : NaCl 3M / Na₃ citrate 0,3M
- SDS 20%

8. Infections cellulaires

8.1 Préparation des cellules HeLa et macrophages:

- Travailler sous hotte à flux laminaire et désinfectée à l'éthanol.
- Éliminer le milieu RPMI+ FCS 10% de la flasque contenant les cellules préalablement mises en culture.
- Ajouter 1 ml de trypsine pure et replacer la flasque à 37 C° 1 à 2 min. afin que les cellules puissent se décoller
- Après vérification au binoculaire que les cellules se sont bien décollées du fond de la flasque, ajouter 10 ml de RPMI+ FCS 10% et agiter la solution au moyen de la pipette afin d'éviter l'agrégation des cellules
- Prélever 10 µl de cette solution et les placer sur la cellule de Thomas, compter les cellules et effectuer les dilutions nécessaires dans du RPMI + FCS10 % de façon à obtenir 2.10⁴ cellules/ml.
- Déposer 100 µl de suspension cellulaire par puit.

8.2 Préparation des doses infectantes:

- La veille, lancer une préculture des mutants + la souche 16M dans 5 ml de 2YT liquide.
- Prélever 1,5 ml de préculture et centrifuger 10 min. à 4000 rpm.
- Resuspendre les culots dans 5 ml de RPMI+ FCS 10%.

- Prendre les D.O. et faire les dilutions dans RPMI+ FCS 10% nécessaire de façon à obtenir 6.10^6 bactéries/100 μ l
- Faire des dilution de 10 en 10 jusque 10^{-5} des doses infectantes
- Etaler 20 μ l de chaque dilution sur milieu 2YT. 3 jours d'incubation à 37C°.
- Compter le nombre de colony forming units (CFU) pour chaque dilution et chaque mutant.

8.3 Infections :

- Réduire la quantité de milieu RPMI + FCS 10 % dans les plaques multipuits à 45 μ l par puits.
- Ajouter 100 μ l de la dilution de *Brucella* à concentration $6.10^6/100\mu$ l. (300 bactéries par cellules).
- Infecter une heure à 37°C.
- Laver trois fois. (retirer doucement le milieu et remettre 100 μ l de RPMI + FCS 10 % avec précaution).
- Après le dernier lavage, ajouter 100 μ l de RPMI + FCS 10 %.
- Laisser incuber 48 h.

8.4 Lyse des cellules:

- Faire 3 rinçages avec 100 μ l de RPMI + FCS 10%.-Ajouter 100 μ l de PBS Triton X100.- Laisser les cellules incuber 10 à 20 min. à 37 C° jusqu'à l'obtention de la lyse cellulaire.
- Effectuer des dilutions croissantes du surnageant de la lyse d'une dilution 10^{-1} jusqu'à une dilution 10^{-5}
- Déposer une goutte de 20 μ l de chaque dilution sur une boîte de pétri inclinée de sorte que la goutte coule et forme une bande sur le milieu 2YT agar.
- Incuber trois jours à 37°C.
- Compter le nombre de CFU et calculer, en fonction de la dilution, le nombre de *Brucella* internalisées par les macrophages ou cellules HeLa en 48 heures.

VII. BIBLIOGRAPHIE

- Aderem Alan and David M. Underhill (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.*, **17**, 593-623.
- Arenas, Graciela N., Ana Sandra Staskevich, Alejandro Aballay, and Luis S. Mayorga. (2000) Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect Immun*, **66**, 2387-2392.
- Campbell G.A., L.G. Adams, B.A. Sowa (1994) Mechanism of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **41**, 295-306.
- Chalfie Martin, Yuan Tu, Ghia Euskirchen, William W. Ward, Douglas C. Prasher (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, **263**, 802-805.
- Charles T.C., Nester E.W. (1993) A chromosomally encoded two-component sensory transduction system is required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol*, **175** (20), 6614-25.
- Cheng H.P., Walker G.C. (1998) Succinoglycan production by *Rhizobium meliloti* is regulated through the ExoS-ChvI two-component regulatory system. *J. Bacteriol*, **180** (1), 20-6.
- Christie Peter J. (2001) Type IV secretion : intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Molecular Microbiology*, **40**(2), 294-305.
- Christie Peter J. and Antonello Covacci (2000) Bacterial type IV secretion systems: DNA conjugation machines adapted for export of virulence factors. "Cellular microbiology", chapter 14. *Asm press*.
- Comerci Diego J., Maria José Martínez-Lorenzo, Rodrigo Sieira, Jean-Pierre Gorvel and Rodolfo A. Ulgade (2001) Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus* -containing vacuole. *Cellular microbiology*, **3**, 159-168.
- Cormack Brendan P., Raphael H. Valvidia and Stanley Falkow (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, **173**, 33-38.
- Cossart Pascal and Marc Lecuit (2000) Microbial pathogens: an overview. "Cellular microbiology", chapter 1. *Asm press*.
- Covacci Antonello, John L. Telford, Giuseppe Del Giudice, Julie Parsonnet, Rino Rappuoli (1999) *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*, vol. **284**, pp. 1328-1333.

Cubitt Andrew B., Roger Heim, Stephen R. Adams, Aileen E. Boyd, Larry A. Gross and Roger Y. Tsien (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Elsevier Science, Tibs* **20**, 448-455.

De Kievit Teresa R. and Barbara H. Iglewski (2000) Bacterial quorum sensing in pathogenic relationship. *Infect Immun*, **68**, 4839-4849.

Delrue R.-M., M.J. Martinez, P. Lestrade, I. Danese, V. Bielarz, P. Mertens, X. De Bolle, A. Tibor, J.-P. Gorvel and J.-J. Letesson (2001) Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cellular Microbiology*, in press.

Detilleux Philippe G., Billy L. Deyoe, Norman F. Cheville (1991) Effect of endocytic and metabolic inhibitors on the internalization and intracellular growth of *Brucella abortus* in Vero cells. *Am J Vet Res*, **52**, 1658-1664.

Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G., and Griffiths, G. (1994) Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J. Cell Biol.*, **124**, 677-688.

Dhandayuthapani S, Via LE, Thomas CA, Horowitz PM, Deretic D, Deretic V (1995) Green fluorescent protein as a marker for gene expression and cell biology of *Mycobacterial* interactions with macrophages. *Mol. Microbiol.*, **17**, 901-912.

Dricot Amélie (2000) Identification de gènes de virulence chez *Brucella melitensis* 16M par "Signature Tagged Mutagenesis". FUNDP, Namur.

Endley Seema, David McMurray, and Thomas A. Ficht (2001) Interruption of the *cydB* locus in *Brucella abortus* attenuates intracellular survival and virulence in the mouse model of infection. *Journal of Bacteriology*, **183**, 2454-2462.

Enright, F.M., Araya, L.N., Elzer, P.H., Rowe, G.E., and Winter, A.J. (1990) The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. In *Animal Brucellosis*. Nielsen, K., and Duncan, J.R. (eds). Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 301-320.

Ferrari Giorgio, Hanno Langen, Makoto Naito, and Jean Pieters (1999) A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of *Mycobacteria*. *Cell*, **97**, 435-447.

Finlay B.Brett, Pascale Cossart (1997) Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science*, **276**, 718-725.

Fuqua Clay, Stephen C. Winans, E.Peter Greenberg (1996) Census and consensus in bacterial ecosystems: The LuxR-LuxI family of quorum sensing transcriptional regulator. *Annu. Rev. Microbiol.*, **50**, 727-751.

Gagescu Raluca and Jean Gruenberg (2000) Membrane trafficking in the endocytic pathway of eukaryotic cells. "Cellular microbiology", chapter 7. *Asm press*.

Gilbert Gwendolyn L. (1993) Brucellosis: continuing risk. *The medical journal of Australia*, **159**, 147-148.

- Gross Antoine, Sandra Spiesser, Annie Terreza, Bruno Rouot, Emmanuelle Caron, and Jacques Dornand (1998) Expression and bacterial activity of nitric oxide synthase in *Brucella suis*-infected murine macrophages. *Infect Immun*, **66**, 1309-1316.
- Husmann LK, Johnson X. (1992) Adherence of *Legionella pneumophila* to guinea pig peritoneal macrophages, J774 mouse macrophages, and undifferentiated U937 human monocytes: role of Fc and complement receptors. *Infect. Immun.*, **60**, 5212-5218.
- Joshi Amrita D., Sheila Sturgill-Koszycki and Michele S. Swanson (2001) Evidence that Dot-dependent and -independent factors isolate the *Legionella pneumophila* phagosome from the endocytic network in mouse macrophages. *Cellular Microbiology*, **3**, 99-114.
- Karp Gerald (1998) Biologie cellulaire et moléculaire. *De Boeck université*.
- Köhler Stephan J., Marion Layssac, Aroem Naroeni, Ivaylo Gentshev, Michael Rittig, and Jean-Pierre Liautard (2001) Secretion of listeriolysin by *Brucella suis* inhibits its intramacrophagic replication. *Infect Immun*, **69**, 2753-2756.
- Léonard Sandrine (2000) Etude de l'implication du système de sécrétion de type IV de *Brucella melitensis* dans son trafic intracellulaire. FUNDP, Namur.
- Lithgow James K., Adam Wilkinson, Andrea Hardman, Belen Rodelas, Florence Wisniewski-dyé, Paul Williams and J. Allan Downie (2000) The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Molecular Microbiology*, **37**, 81-97.
- Méresse, 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-E188
- Nareoni Aroem, Nicolas Jouy, Safia Ouahrani-Bettache, Jean-Pierre Liautard and Françoise Porte (2001) *Brucella suis*-impaired specific recognition of phagosomes by lysosomes due to phagosomal membrane modifications. *Infect Immun*, **69**, 486-493.
- O'Callaghan, D., Cazevieille, C., Allardet-Servent, A., Boschioli, M.L., Bourg, G., Foulongue, V., Frutos, P., Kulakov, Y. and Ramuz, M. (1999) A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion system is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol Microbiol*, **33**, 1210-1220.
- Payne NR, Horwitz MA. (1987) Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J. Exp. Med.*, **166**, 1377-1389.
- Pizarro-cerdá, J., Meresse, S., Parton, R.G., Van der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goni, I., Moreno, E. and Gorvel, J.P. (1998a) *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of non professional phagocytes. *Infect Immun*, **66**, 5711-5724.
- Pizarro-cerdá, J., Moreno, E., Sanguedolce, V., Mege, J.L. and Gorvel, J.P. (1998b) Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect Immun*, **66**, 2387-2392.

Pizarro-Cerdá, J. and Edgardo Moreno, a.J.-P.G. (1999) *Brucella abortus* invasion and survival within professional and non professional phagocytes. In Inc., J.P. (ed.), Vol.6, pp.201-232.

Pizarro-cerdá, J., Edgardo Moreno, Jean-Pierre Gorvel. (2000) Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microbes and infection*, **2**, 829-835.

Porte, F., Liautard, J.P. and Köhler, S. (1999) Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun*, **67**, 4041-4047.

Qin Yinping, Zhao-Qing Luo, Audra J. Smith, Ping Gao, Susanne Beck von Bodman and Stephen K. Farrand (2000) Quorum-sensing signal binding results in dimerization of TraR and its release from membranes into the Cytoplasm. *The EMBO Journal*, **19**, 5212-5221

Rittig, Michael G., Gerd-Rüdiger Burmester and Andreas Krause. (1998) Coiling phagocytosis : when the zipper jams, the cup is deformed. *Trends Microbiol.*, **6**, 384-388.

Rittig, Michael G., Maria-Teresa Alvarez-Martinez, Françoise Porte, Jean-Pierre Liautard, and Bruno Rouot (2001) Intracellular survival of *Brucella* spp. In human monocytes involves conventional uptake but special phagosomes. *Infect Immun*, **69**, 3995-4006.

Rodelas Belen, James K. Lithgow, Florence Wisniewski-dye, Andrea Hardman, Adam Wilkinson, Anastassios Economou, Paul Williams, and J. Allan Downie (1999) Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere-expressed (*rhi*) genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. *Journal of bacteriology*, **181**, 3816-3823.

Sieira Rodrigo, Diego J. Comerci, Daniel O. Sanchez, and Rodolfo A. Ugalde (2000) A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *Journal of bacteriology*, **182**, 4849-4855.

Sola-Landa, A., Pizarro- cerdá, 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.

Sourjik Victor, Werner Sterr, Josef Platzer, Ineke Bos, Martin Halsbeck, Rüdiger Schmitt (1998) Mapping of 41 chemotaxis, flagellar and motility genes to a single region of the *Sinorhizobium meliloti* chromosome. *Gene*, **223**, 283-290.

Sturgill-Koszycki, S., P. Schlesinger, P. Chakraborty, P. Haddix, H. Collins, A. Fok, R. Allen, S. Gluck, J. Heuser, and D. G. Russell (1994) Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vacuolar proton-ATPase. *Science*, **263**, 678-681.

Taminiau Bernard, Mavis Daykin, Simon Swift, Maria-Laura Boschiroli, Anne Tibor, Pascal Lestrade, Xavier De Bolle, David O'Callaghan, Paul Williams, and Jean-Jacques Letesson (2001) Identification of a quorum sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Submit for publication*.

- Uchiya, K., Barbieri, M.A., Funato, K., Shah, A.H., Stahl, P.D. and Groisman, E.A. (1999) A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J*, **18**, 3924-3933.
- Valdivia RH and Falkow S. (1996) Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. *Mol. Microbiol.*, **22**, 367-378.
- Valdivia RH, Hromockyj AE, Monack D, Ramakrishnann L, Falkow S. (1996) Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interaction. *Gene*, **173**, 47-52.
- Varshavsky Alexander (1996) The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12142-12149.
- Via Laura E., Dusanka Deretics, Roseann J. Ulmer, Nina S. Hibler, Lukas A. Hubert, and V. Deretics (1997) Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *The journal of biological chemistry*, **272**, 13326-13331.
- Webb Chris D., Amy Decatur, Aurelio Teleman, and Richard Losick (1995) Use of green fluorescent protein for visualization of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, **177**, 5906-5911.
- Winans, S.C., Burns, D.L., and Christie, P.J. (1996) Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules. *Trends Microbiol.*, **4**, 64-68.
- Young E. J. (1995) An overview of human brucellosis. *Clinical infectious diseases*, **21**, 283-290.
- Zhang YZ, Naleway JJ, Larison KD, Huang ZJ, Haugland RP. (1991) Detecting lacZ gene expression in living cells with new lipophilic, fluorogenic beta-galactosidase substrates. *FASEB J*, **5**, 3108-3113.

ANNEXE I : LISTE DES ABREVIATIONS

-^R	Résistant	PDI	Protein Disulfide Isomerase
-^S	Sensible	Plac	Promoter lac
3-MA	3-méthylcadénine	RBS	Ribosome Binding Site (Shine-Dalgarno consensus)
ADN	Acide Désoxyribonucléique	RE	Réticulum endoplasmique
ADNg	ADN génomique	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
AHL	acyl homosérine lactone	Δ	Délétant
Amp	Ampicilline	TACO	Tryptophane Aspartate-containing Coat Protein
ARN	Acide Ribonucléique	Tm	Température de Melting
ARNm	ARN messenger	V-ATPase	Vacuolar-ATPase
ATP	Adénosine Triphosphate	VjBR	Vacuolar jacking <i>Brucella</i> Regulator
Bp	Base pair		
BvrR	<i>Brucella</i> Virulence Related Regulatory protein		
BvrS	<i>Brucella</i> Virulence Related Sensor		
CFU	Colony Forming Units		
Cm	Chloramphénicol		
EEA1	Early Endosomal Antigen 1		
FT	Fusion Traductionnelle		
GFP	Green Fluorescent Protein		
GTP	Guanosyl Triphosphate		
HSL	Homosérine Lactone		
IF	Immunofluorescence		
Kan	Kanamycine		
LAMP	Lysosome Associated Membrane Protein		
LPS	Lipopolysaccharide		
Nal	acide Nalidixique		
ORF	Open Reading Frame		
p	plasmide		
PCR	Polymerase Chain Reaction		