Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution à l'étude du système de phosphotransfert de carbohydrates dépendant du phosphoénolpyruvate {PTS) chez B. melitensis 16M

COPIN, Richard

Award date:
2004

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.

Download date: 04. May. 2026

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU SYSTEME DE PHOSPHOTRANSFERT DE CARBOHYDRATES DEPENDANT DU PHOSPHOENOLPYRUVATE (PTS) CHEZ *B. MELITENSIS* 16M

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

Richard Copin

Juin 2004

Facultés Universitaires Notre-Dame de la paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 – 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 – Téléfax: + 32(0) 81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - http://www.fundp.ac.be/fundp.html

Contribution à l'étude du système de phosphotransfert de carbohydrates dépendant du phosphoénolpyruvate (PTS) chez *B. melitensis* 16M

COPIN Richard

Résumé

Les mécanismes moléculaires de virulence mis en jeu par les bactéries pathogènes du genre *Brucella* sont encore peu caractérisés. L'étude des systèmes de régulation du métabolisme trouve sa place dans la compréhension des stratégies mises en œuvre par *Brucella* pour s'adapter à l'environnement intracellulaire de l'hôte. Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes intéressés au système de régulation global PTS (phosphotransferase system). Ce système, intervient dans le transport et la phosphorylation de substrats carbonés, et dans la régulation des voies associées au métabolisme de ces nutriments.
Afin de contribuer à l'étude du système PTS chez *Brucella melitensis* 16M, trois approches ont été menées. Dans un premier temps, une analyse *in silico* des loci PTS a été effectuée afin d'identifier les acteurs PTS potentiellement présents chez *B. melitensis* 16M. Dans un second temps, des tests d'interaction entre les différents partenaires PTS identifiés ont été réalisés. Enfin, la construction de mutants délétés pour les gènes *PTS* a été entreprise afin d'étudier l'implication des acteurs du PTS dans la virulence de *B. melitensis* 16M.
Au cours de ce travail, un modèle impliquant cinq acteurs du système PTS chez *B. melitensis* 16M a été proposé. Ce modèle a été partiellement validé par les résultats obtenus lors du test d'interaction en double hybride qui montrent que deux acteurs centraux interagissent physiquement. Par ailleurs, la construction des outils nécessaires à la délétion des gènes PTS chez *B. melitensis* 16M a été réalisée; un mutant dans ce système, *ΔNPr* a déjà pu être obtenu.

Mémoire de licence en Sciences biologiques
Juin 2004
Promoteur : J-J Letesson

Je vous remercie, monsieur Letesson. Pour votre enseignement, pour votre accueil, pour ces conversations qui changent la vie d'un homme et surtout, je vous remercie monsieur Letesson d'être l'homme que vous êtes (par souci d'honnêteté envers mes collègues mémorisants, j'arrêterais ici ces éloges véritablement pensées par moi-même, pour empêcher l'influence éventuelle qu'elles auraient sur la côte donnée par mon promoteur, en l'occurrence monsieur Letesson).

Monsieur De Bolle, j'aimerais ne pas vous remercier pour quoi que ce soit mais on m'a dit que j'étais obligé...(je rigoooole). Deux types de professeur existent; les professeurs qui inculquent que le seul moyen de maîtriser les connaissances est d'en connaître un maximum, et les professeurs qui considèrent que pour maîtriser des connaissances, il est tout d'abord nécessaire de trouver en nous ce qu'il les rend passionnantes. Vous excellez évidemment dans la seconde catégorie. Comme je vous l'ai déjà dit monsieur De Bolle, vous donnez aux choses ce petit goût salé qui donne soif de réponses.

Je vous remercie également monsieur Vandenhaute. Il fut à chaque fois très instructif et intéressant de venir parler dans votre bureau.

Merci à toi petite Marie. Tes explications, ta patience, ton sourire, ta compréhension, tes idées, le dagobert chez Ursule,... Merci de m'avoir pris en charge et de m'avoir épaulé durant tout ce travail. J'ai passé une expérience formidable à tes côtés.

Mes mémorisants d'amour, je vous aime bien beaucoup, énormément. Julien soit ta gentillesse te perdra car trop gentil, soit le nouveau messie est arrivé suivons le... Je plaisante, t'es vraiment géant Julien. Cédric, on a bien ri... Johann, ce ne serait pas un euphémisme de dire que tu me surclasses dans de nombreux domaines mais pas encore dans celui du concours de "rots".

Merci à vous Anne et Caroline, à la fois pour ce que vous avez fait pour moi et mon travail, mais également pour votre attention et votre gentillesse. Gardez ces qualités bien précieusement.

Chantal, outre le fait que je te remercie de faire partie de mon jury de mémoire (blabla), je voudrais que tu saches que je t'apprécie beaucoup et que ce fut un plaisir de travailler avec toi.

Valérie et grande Marie. Comment passer à côté de vous sans vous voir. Mes yeux se brûleraient si cela devait arriver. Merci pour votre sympathie et votre caractère très singulier. Vous n'êtes pas du genre à demander en rue à quelqu'un si elle n'aurait pas une personnalité pour vous à prêter et ça, c'est plutôt très positif.

Sophie, j'admire ton caractère et ta fermeté. Tu peux mener les choses en grand capitaine alliant finesse, douceur et respect. Outre cela, il y a bien d'autres choses que j'admire chez toi (point de vue caractère bande d'idiots!).

Merci aux autres dames du labo dont les conseils ont toujours été pertinents (Sandrine, Rose-May, et Z)

Vous, les hommes, je vous rassemble. Régis, je te dois beaucoup. Je t'admire également beaucoup, voir peut être je t'idolâtre voir plus...enfin Merci. Merci à toi Nico pour tout ces bons moments de détente que tu m'as apportés. Merci, Max pour tout. Sans toi, on aurait pu couper mon mémoire en deux. Merci Christian de toute ces chouettes petites matinée passées en ta compagnie près de la tasse de café. Merci à tout les gémos. Et en fin toi Jonathan... en fait je ne t'ai jamais aimé non plus (rire: AAA OOO iii).

La personne qui me tient le plus à cœur de remercier est mon amoureuse Laurence. Merci pour tout ton amour. Du souper préparé, aux petits moments de douceur en passant par la correction de l'orthographe. Je le dis dans un mémoire que je garderai toute ma vie, JE T'AIME.

INTRODUCTION 1

1. LES PRINCIPAUX SYSTÈMES DE TRANSDUCTION DU SIGNAL CHEZ LES PROCARYOTES 1
1.1. LES SYSTÈMES À DEUX COMPOSANTS 1
1.1.1. Généralités 1
1.1.2. Architecture 2
1.1.3. Les systèmes à deux composants complexes 2
1.1.4. Modulation des systèmes à deux composants 3
1.2. SÉRINE/THRÉONINE KINASES ET TYROSINE KINASES 4
1.2.1. Généralités 4
1.2.2. Architecture 4
1.2.3. Modulation des sérine/thréonine kinases et des tyrosine kinases 5
1.3. SYSTÈMES PTS 6
1.3.1. Généralités 6
1.3.2. Architecture (Postma et al., 1993) 6
1.3.3. Les enzymes PTS générales : EI et HPr 7
2. EXEMPLES DE SYSTÈMES RÉGULÉS PAR LES SYSTÈMES PTS 10
2.1. RÉPRESSION CATABOLIQUE DU CARBONE 10
2.1.1. Phénomène de régulation transcriptionnelle globale 10
2.1.2. Mécanismes de prévention des phénomènes d'induction 11
2.2. PTS : SYSTÈME DE TRANSDUCTION DU SIGNAL DANS LE CHÉMOTACTISME 13
2.3. PTS : SYSTÈME DE RÉGULATION DU MÉTABOLISME AZOTÉ 14
3. PHYLOGÉNIE DES SYSTÈMES PTS 15
4.* LE GENRE *BRUCELLA 16
4.1. GÉNÉRALITÉS 16
4.2. PATHOGÉNIE 17

BUT DU MÉMOIRE 18

MATÉRIEL ET MÉTHODES 19

1. MATÉRIEL 19
1.1. SOUCHES ET PLASMIDES 19
1.2. MILIEUX DE CULTURE 21
1.2.1. Milieux de culture Bactériens 21
1.2.2. Milieux de culture levuriens 22
1.2.3. Antibiotiques, X-gal et IPTG 23
1.3. TAMPONS 23
1.4. SOLUTIONS 24
2. MÉTHODES 25
2.1. TECHNIQUES RELATIVES À L'UTILISATION DE BACTÉRIES 25
2.1.1. Techniques classiques de biologie moléculaire 25
2.1.2. Extraction d'ADN génomique de Brucella sp 28
2.1.3. Séquençage de l'ADN 28
2.1.4. Analyse par southern blot 29
2.1.5. Clonage Gateway™ 30
2.1.6. Conjugaison bactérienne 31
2.2. TECHNIQUES RELATIVES À L'UTILISATION DES LEVURES 32
2.2.1. Test d'interaction protéique en double-hybride 32
2.2.2. Transformation par choc thermique 32
2.2.3. Technique de la réplique sur velours 33
2.2.4. Coloration X-GAL en surcouche 33

RESULTATS 34

1. ANALYSE GÉNOMIQUE DU SYSTÈME PTS CHEZ *B. MELITENSIS* 16M 34
1.1. RECHERCHE DES DIFFÉRENTS ACTEURS IMPLIQUÉS DANS LES SYSTÈMES PTS CHEZ *B. MELITENSIS* 16M 34
1.2. ANALYSE BIOINFORMATIQUE DES SÉQUENCES DE *BRUCELLA* ET DE LEUR LOCUS 35
1.2.1. EI^{ntr} (BMEI0190) 35
1.2.2. $EIIA^{ntr}$ (BMEI1786) 36
1.2.3. Hpr (BMEI2031), $EIIA^{m}$ (BMEI2032) et HprK/P (BMEI2034) 36
1.3. CONSTRUCTION D'UN MODÈLE PRÉDICTIF 38
2. TEST D'INTERACTION EN DOUBLE-HYBRIDE 39
2.1. PRINCIPE 39
2.2. PREMIÈRE ÉTAPE : CHOIX DES ORF ET CLONAGE GATEWAY 40
2.3. REALISATION DE LA MATRICE D'INTERACTION PROTEINE-PROTEINE 41
2.4. ANALYSE DES RESULTATS 42
3. CONSTRUCTION DE MUTANTS DANS LES ORF *PTS* DE *B. MELITENSIS* 16M 43
3.1. CONSTRUCTION DES VECTEURS DE DÉLÉTION 44
3.1.1. Amplification par PCR des parties amont et aval des gènes d'intérêt 44
3.1.2. Clonage des fragments PCR dans le pSKoriT-cat 44
3.2. CONSTRUCTION DES MUTANTS PTS CHEZ *B. MELITENSIS* 16M 45
3.2.1. Conjugaison et sélection de clones candidats délétants 45
3.2.2. Validation des mutants par PCR 46
3.2.3. Validation des mutants par Southern blot 46
4. RÉCAPITULATIF DES RÉSULTATS OBTENUS 46

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 48

1. DISCUSSION 48
2. PERSPECTIVES 51

BIBLIOGRAPHIE 52

Introduction

INTRODUCTION

1. LES PRINCIPAUX SYSTÈMES DE TRANSDUCTION DU SIGNAL CHEZ LES PROCARYOTES

Comme toutes les cellules, les bactéries sont bombardées par une variété d'informations d'origine environnementale ou produites par leur propre métabolisme. Dans la majorité des cas, la ou les réponse(s) consiste(nt) *in fine* en l'activation transcriptionnelle de gènes dont le produit permet l'adaptation de l'organisme aux changements dans le milieu. L'essence des systèmes de transduction du signal est donc la conversion d'un stimulus externe ou interne en une réponse cellulaire adaptative résultant de l'activation d'un ou plusieurs gènes.

Malgré la grande diversité des stimuli et des réponses possibles, un nombre relativement restreint de stratégies moléculaires est utilisé, aussi bien chez les procaryotes que chez les organismes supérieurs. Chez les bactéries, on distingue trois stratégies de régulation qui se différencient par leur mécanisme de phosphorylation. Il s'agit des systèmes à deux composants, des systèmes mettant en jeu les Sérine/Thréonine ou Tyrosine kinases et enfin des systèmes PTS (Phosphotransferase system).

Dans les sections suivantes, nous décrirons brièvement les systèmes à deux composants et les systèmes Ser/Thr et Tyr kinases. Nous aborderons ensuite de façon plus approfondie les systèmes PTS.

1.1. Les systèmes à deux composants

1.1.1. GÉNÉRALITÉS

Les systèmes de transduction du signal à deux composants (que nous appelerons par la suite SDC) sont les mécanismes majoritaires par lesquels les bactéries perçoivent et répondent aux différents stimuli environnementaux. Ces systèmes sont ubiquistes chez les eubactéries. Le génome d'*Escherichia coli*, par exemple, comporte 62 gènes encodant des protéines de ces systèmes, impliquées dans divers processus de régulation tels que la chémotactisme, l'osmorégulation, le métabolisme et le transport à travers la paroi bactérienne (Mizuno, 1997). On retrouve également les SDC chez les bactéries pathogènes où, en plus de leur fonction dans la régulation des gènes dits « housekeeping », ils contrôlent l'expression de toxines et d'autres facteurs de virulence (Parkinson and Kofoid, 1992). Bien qu'ils aient été mis en

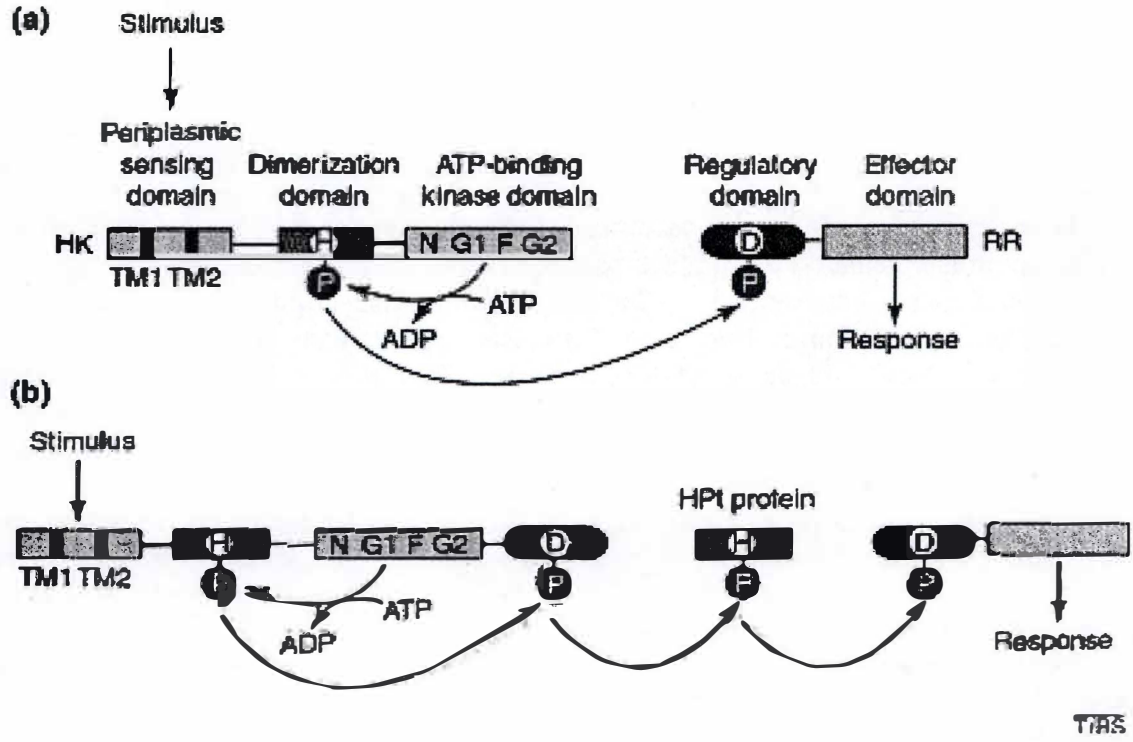


Fig. 1 (d'après West & Stock, 2001) Schéma d'un système à deux composants (SDC).
(a) SDC typique constitué de l'histidine kinase (HK) et du régulateur de réponse (RR). L'HK comprend trois domaines: un domaine senseur à segments transmembranaires (TM), un domaine de dimérisation et un domaine de liaison à l'ATP caractérisé par un motif de séquence conservée N, G1, F, G2. Le RR comprend deux domaines: un domaine régulateur et un domaine effecteur. L'HK catalyse l'autophosphorylation dépendante de l'ATP d'un résidu histidine (H) conservé du domaine de dimérisation. Le groupement phosphate (P) est ensuite transféré sur un résidu aspartate (D) localisé au sein du domaine régulateur du RR. Cette phosphorylation active le domaine effecteur de ce RR qui initie alors une réponse cellulaire spécifique.
(b) Exemple de "phosphorelay" constitué d'une HK, d'une HK hybride et d'un RR.

évidence chez certains eucaryotes, comme par exemple chez la levure où ils médient le développement de l'hyphe (Calera *et al.*, 2000), ou chez les plantes où ils interviennent dans des processus importants comme l'osmorégulation ou la croissance (Urao *et al.*, 2000), l'analyse des génomes du ver, de la mouche et de l'homme suggère que les protéines des SDC ne sont pas encodées dans les génomes animaux (West and Stock, 2001).

1.1.2. ARCHITECTURE

Les SDC sont structurés autour de deux types de protéines conservées (West and Stock, 2001) : une histidine protéine kinase (HK) et une protéine régulatrice de réponse (RR), qui peuvent être phosphorylées au niveau d'un résidu histidine et aspartate respectivement (fig. 1A). L'HK constitue la protéine senseur. Généralement transmembranaire et dimérique, elle est composée d'un domaine de reconnaissance du signal (connu également sous le nom de "input domain") et d'un domaine autokinase qui catalyse l'autophosphorylation dépendante d'ATP d'un résidu histidine spécifique présent au sein du domaine de dimérisation. Le RR, quant à lui, est généralement constitué de deux domaines structuraux : un domaine régulateur conservé en N-terminal, dit receveur, et un domaine effecteur variable en C-terminal. Le RR catalyse le transfert du groupement phosphate depuis l'histidine phosphorylée de l'HK jusqu'à un résidu aspartate (Asp) conservé, situé au sein de son domaine régulateur. La phophorylation de ce résidu induit une large réorientation de la chaîne latérale d'un résidu thréonine très conservé au niveau du site actif du RR, ce qui permet l'activation du domaine effecteur, initiant ainsi la réponse cellulaire en jouant, dans la majorité des cas, le rôle de facteur de transcription (Hoch, 2000)[1].

Le SDC, tel que nous le décrivons ci-dessus, est une simplification nous permettant d'illustrer les mécanismes fondamentaux du transfert des groupements phosphates qui constitue le socle de ces systèmes. Néanmoins, comme tous les mécanismes régulateurs, les SDC ne s'agencent pas autour d'un canevas absolu. D'un système à l'autre, il existe différents arrangements de domaines conservés au sein d'une protéine, et diverses protéines peuvent être intégrées dans le système pour donner naissance à des SDC plus élaborés.

1.1.3. LES SYSTÈMES À DEUX COMPOSANTS COMPLEXES

Il existe une version plus complexe du schéma de base du transfert de groupements phosphates dans les SDC, mettant en jeu des chaînes de protéines kinases qui se

[1] Chez les eucaryotes, les bases du SDC sont les mêmes, mais il existe des différences significatives par rapport aux procaryotes en ce qui concerne l'agencement des protéines du système. En effet, dans les systèmes procaryotes, l'effecteur de la réponse se trouve être le RR lui-même jouant souvent le rôle de facteur de transcription. Dans les systèmes eucaryotes, on retrouve les protéines des SDC au début de cascades de signalisation où elles interagissent avec des systèmes de signalisation eucaryotes plus conventionnels tels que la voie des MAPK (mitogen-activated protein kinase) ou celle de l'AMPcWest, A. H. & Stock, A. M. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**, 369-76 (2001)..

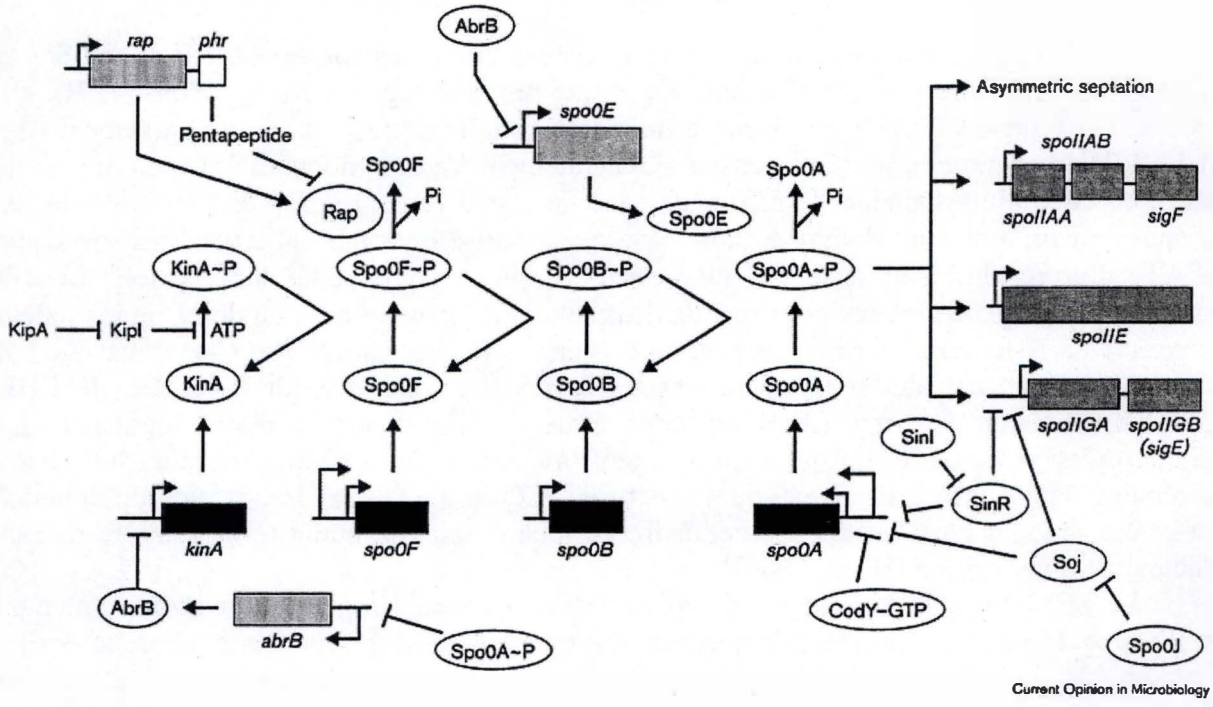


Fig. 2 (d'après Sonenshein, 2000).
Exemple de "phosphorelay". Voie de régulation impliquée dans l'initiation de la sporulation chez *B. subtilis.*

phosphorylent séquentiellement selon le schéma : histidine puis aspartate puis histidine puis aspartate, etc (fig. 1B) (Perraud *et al.*, 1999).

Ce système, appelé "phosphorelay", implique donc plusieurs étapes de transfert de groupements phosphates, et fait souvent intervenir plus de deux protéines. La plupart de ces "phosphorelays" sont constitués de kinases hybrides qui contiennent, en plus de leurs domaines habituels, un domaine homologue au domaine receveur du RR. On retrouve également des protéines appelées histidines phosphotransférases d'environ 120 acides aminés dont le rôle essentiel est de servir d'intermédiaire entre ces kinases hybrides et le RR cytoplasmique. Ces "phosphorelays" apportent une plus grande versatilité dans les stratégies de signalisation et la possibilité d'une régulation plus fine. Un exemple très bien étudié se retrouve chez *Bacillus subtilis* où un "phosphorelay" est impliqué dans le contrôle de l'initiation de la sporulation (Sonenshein, 2000). Lorsque la population bactérienne atteint une certaine densité, un transfert séquentiel de groupement phosphate provenant de l'ATP s'effectue entre plusieurs HK (telle que KinB et KinC) et deux protéines intermédiaires SpoOF et SpoOB, pour aboutir au facteur transcriptionnel SpoOA (fig. 2). Ce facteur réprime notamment le gène *abrB* qui encode un répresseur de nombreux gènes requis pour la sporulation (Strauch *et al.*, 1989).

Les SDC procaryotiques utilisent généralement le schéma de transfert de groupements phosphates le plus simple alors que la majorité des SDC eucaryotes utilisent plutôt les "phosphorelays" et les kinases hybrides (West and Stock, 2001).

1.1.4. MODULATION DES SYSTÈMES À DEUX COMPOSANTS

De nombreuses stratégies sont utilisées pour moduler les SDC. En plus de l'HK et du RR, beaucoup de systèmes présentent des protéines régulatrices auxiliaires. De manière ultime, la cible directe ou indirecte de toutes les stratégies de régulation des SDC est le niveau de phosphorylation du RR qui détermine la réponse cellulaire en vue de l'adaptation bactérienne (West and Stock, 2001).

Le RR présente par exemple lui-même une activité autophosphatase qui limite la durée de vie de son état phophorylé. Dans d'autres systèmes interviennent également des phosphatases auxiliaires ou des protéines qui augmentent l'activité autophosphatase du RR. L'HK peut elle aussi présenter une activité phosphatase. Dans ce cas, l'activité kinase ou phosphatase de l'HK peut être régulée soit directement par des stimuli (dans le cas d'une HK senseur transmembranaire) soit indirectement par des interactions avec d'autres protéines (dans le cas d'une HK cytoplasmique). Un niveau de régulation additionnel existe lorsque plusieurs HK interagissent avec un seul RR ou une seule HK avec plusieurs RR (West and Stock, 2001).

1.2. Sérine/Thréonine kinases et Tyrosine kinases

1.2.1. GÉNÉRALITÉS

La phosphorylation réversible des résidus sérine, thréonine ou tyrosine par l'intervention de protéines kinases et de phosphatases joue un rôle clé dans la régulation des différents processus cellulaires chez les organismes eucaryotes. Les Sérine/Thréonine kinases (STK) et les Tyrosine kinases (TK) constituent dès lors chez ces organismes des acteurs essentiels dans les cascades de transduction du signal. On estime en effet qu'une cellule eucaryote contient environ deux mille gènes encodant de telles kinases (Hunter, 1995).

Bien qu'on ait longtemps pensé que les STK et les TK étaient exclusives aux eucaryotes, il est apparu au début des années 90 qu'elles étaient également impliquées dans la régulation des processus eubactériens. En 1991 le premier gène encodant une STK procaryote, *pknI*, a été identifié chez *Myxoccocus xanthus* (Munoz-Dorado *et al.*, 1991). Des analyses par Northern blot ont montré que l'expression de *pknI* était régulée durant le développement de la bactérie, tandis qu'un mutant "knockout" pour *pknI* montrait une différenciation prématurée et une sporulation précoce. D'autres études réalisées par après chez d'autres bactéries telles qu'*E coli* ou *Streptomyces coelicolor* ont montré des résultats similaires.

L'abondance des STK et des TK est variable selon les genres bactériens. On compte, par exemple, 52 gènes encodant des STK et des TK chez *Anabaena* (Wang and Wu, 2002)contre un seul chez *Borrelia burgdorferi* (Shi *et al.*, 1998).

D'une manière générale, les phénotypes de mutants pour les gènes encodant des STK sont généralement peu marqués, ce qui suggère que les protéines kinases eubactériennes ont des fonctions partiellement redondantes, phénomène courant également chez les eucaryotes. Une interprétation alternative serait que les conditions de laboratoire ne mimeraient pas parfaitement les habitats bactériens naturels où les protéines kinases joueraient un rôle différent et probablement plus crucial en maintenant, par exemple, une structure au niveau communautaire (Bakal and Davies, 2000).

1.2.2. ARCHITECTURE

Chez les eucaryotes, la voie de transduction du signal qui implique les STK est indépendante de celle qui engage les TK. L'activation de nombreuses voies de signalisation métabolique implique le recrutement de STK au niveau de complexes protéiques associés en membrane où des protéines liant le GTP, telles que les protéines proto-oncogènes Ras ou Rho, initiant les cascades de signalisation. A l'heure actuelle, des protéines "Ras-like" liant le GTP ont été identifiées chez *Pseudomonas aeruginosa* (Chopade *et al.*, 1997) et *Mycobacterium tuberculosis* (Shankar *et al.*, 1997). Néanmoins, l'implication de ces protéines dans la transduction du signal chez les bactéries reste peu claire. *M. xanthus* possède également une protéine, MglA, homologue aux GTPases eucaryotes de faible poids moléculaire normalement requises pour le développement multicellulaire et la mobilité (Hartzell and

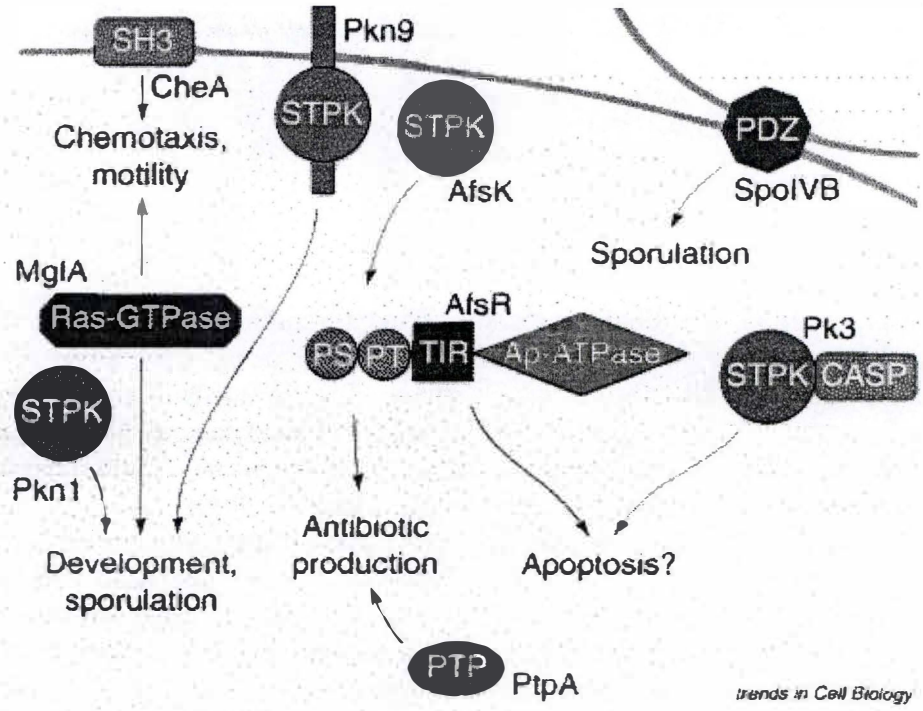


Fig. 3 (d'après Bakal & Davies, 2000).
Voie de transduction du signal impliquant les sérine/thréonine kinases. Pkn1 Pkn9 et MglA de *Myxococcus xanthus*; AfsK, AfsR, PtpA et Pk3 de *Streptomyces coelicolor*; SpoIVB de *Bacillus subtilis*; et CheA de *Thermotoga maritima*.
Abréviations: CASP, caspase; PS, sérine phosphorylée; PT, thréonine phosphorylée; SH3, Src-homology 3; STPK, serine/threonine protein kinase.

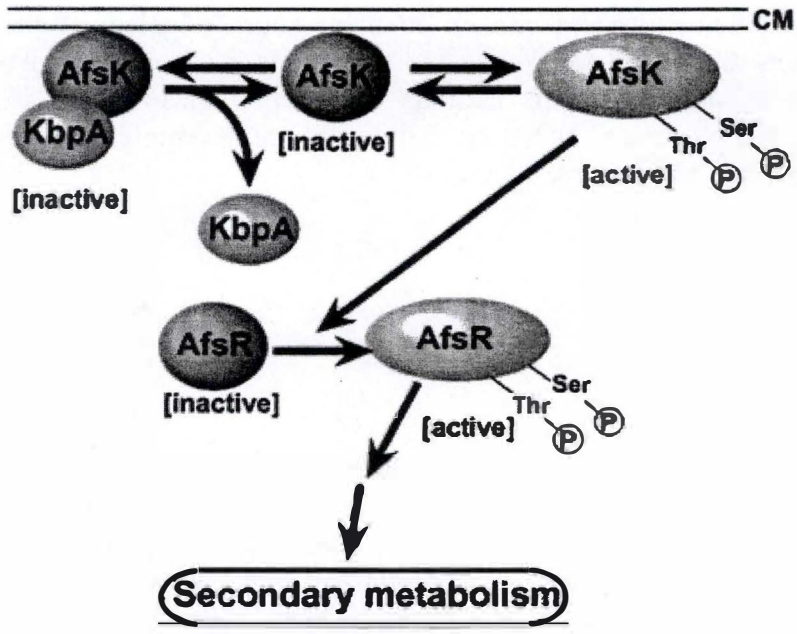


Fig. 4 (d'après Umeyama *et al.*, 2002).
Modèle de régulation d'AfsR chez *Streptomyces coelicolor*. La STK AfsK s'autophosphoryle puis transfère ses groupements phosphates au niveau des résidus sérine et thréonine de AfsR. Ainsi activé, AfsR-P promeut l'activation de gènes du métabolisme secondaire. Le contrôle de la quantité d'AfsR-P s'effectue via la déphosphorylation par PtpA et l'inhibition de l'autophosphorylation de AfsK par KbpA.

Kaiser, 1991). Bien que le détail du cheminement de l'information dans ce système ne soit pas encore connu chez les bactéries, il a été montré que certaines STK jouaient un rôle d'activateur transcriptionnel. C'est le cas notamment de la STK transmembranaire Pkn9 de *M. xanthus*. La délétion du gène *pkn9* provoque une sévère diminution de la progression cellulaire au cours du développement, de la sporulation et de l'expression de cinq protéines membranaires (appelées KREP9) (Hanlon *et al.*, 1997)(fig. 3).

La phosphorylation des protéines au niveau de résidus tyrosines chez les procaryotes est un phénomène peu documenté. Cependant, de telles kinases ont été identifiées chez une grande variété de bactéries par l'utilisation d'anticorps spécifiques (Kennelly and Potts, 1999). Beaucoup d'espèces de *Streptomyces* semblent utiliser cette modification post-traductionnelle pour un grand nombre de leurs protéines, alors que chez d'autres organismes seulement une ou deux protéines sont ainsi modifiées. Si les choses sont bien décrites chez les organismes supérieurs, les éléments concernant ce sujet chez les bactéries restent très peu exhaustifs. Par exemple, l'analyse de séquences génomiques n'a pas mis en évidence l'existence d'homologues de récepteurs du type TK de mammifères (tels que le récepteur kinase du facteur de croissance épidermique EGF ou de kinases de la famille src). Cela n'est néanmoins pas surprenant puisque ces TK sont également absentes chez les plantes, les levures et les champignons (Bakal and Davies, 2000).

1.2.3. MODULATION DES SÉRINE/THRÉONINE KINASES ET DES TYROSINE KINASES

La régulation de ces réseaux de signalisation implique non seulement une action coordonnée des protéines kinases mais également l'intervention de protéines phosphatases. Chez les eucaryotes, ce rôle est pris en charge par les familles des sérine protéines phosphatases appelées PP (protein phosphatase) et par les familles plus conventionnelles de tyrosine protéines phosphatases PTP.

Des homologues bactériens des PP ont été identifiés (Shi *et al.*, 1998) (Kennelly and Potts, 1999), mais leur rôle reste encore obscur. La régulation des protéines kinases procaryotes par les PP a été suggérée pour la première fois chez des organismes du genre *Anabaena* où l'on retrouve une ORF encodant une PP du nom de PrpA, proche du gène *pknE* encodant une STK (Zhang *et al.*, 1998). La disruption de l'un ou l'autre de ces gènes affecte les même processus biologiques, ce qui suggère que leur produit présente des cibles similaires et qu'ils seraient donc confondus dans une même voie signalétique.

Des PTP conventionnelles existent également chez les procaryotes. Beaucoup de ces enzymes sont des facteurs de virulence sécrétés par des bactéries pathogènes et ciblant la signalisation de l'hôte eucaryote. Une hypothèse suggère que ces gènes aient été acquis par les bactéries via des événements de transferts horizontaux avec leur organisme hôte (Bakal and Davies, 2000).

A côté de ces phosphatases, existent des protéines inhibitrices des STK. Par exemple, la protéine KbpA se lie à la STK Afsk non phosphorylée de *Streptomyces coelicolor*, empêchant son autophosphorylation, et ainsi la phosphorylation de sa cible, AfsR, responsable de l'activation transcriptionnelle de gènes impliqués dans la biosynthèse d'antibiotiques (Umeyama and Horinouchi, 2001). KbpA inhibe également PtpA, phosphatase spécifique de AfsR. Il permet donc une régulation fine de la synthèse de métabolites secondaires chez *S. coelicolor* (Umeyama *et al.*, 2002) (fig. 4).

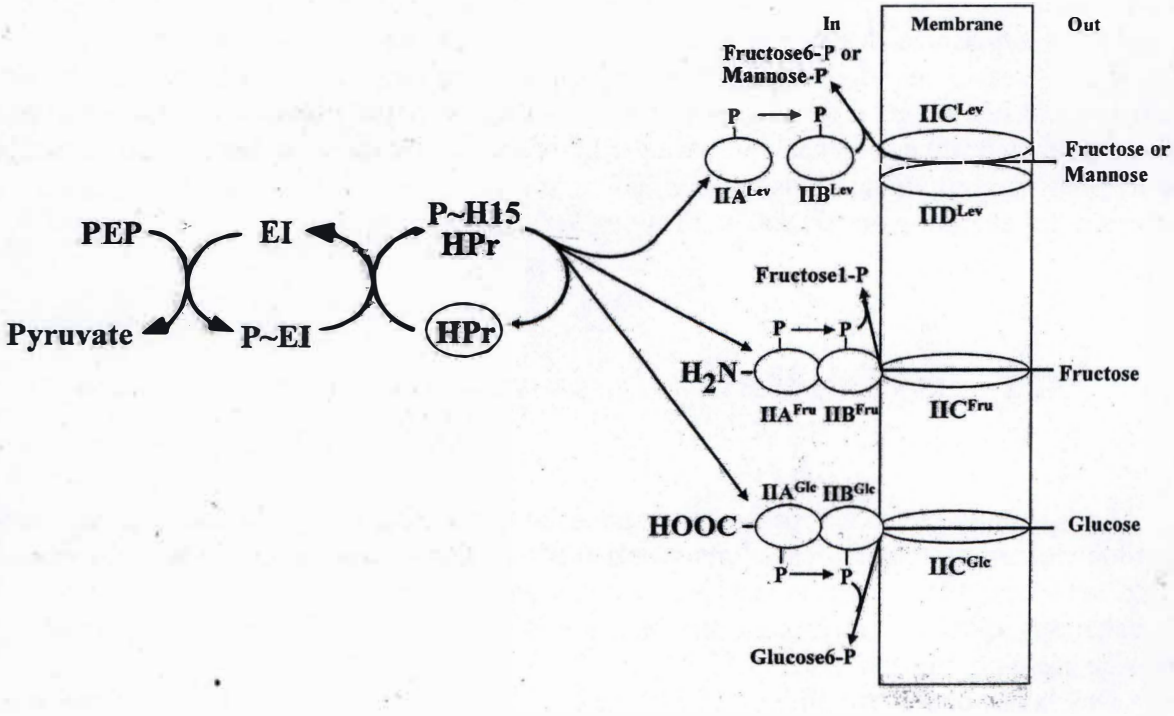


Fig. 5. Architecture des systèmes PTS.

Bien que l'identification et la disruption subséquente de certains gènes aient permis d'établir le rôle important des STK et des TK dans le développement procaryote, beaucoup d'études restent à mener en ce qui concerne les régulateurs situés en amont ainsi que les cibles en aval.

1.3. Systèmes PTS

1.3.1. GÉNÉRALITÉS

Les systèmes de phosphorylation des carbohydrates dépendants du phosphoénolpyruvate (PTS pour *PhosphoTransferase System*) sont les principaux systèmes d'incorporation des sources carbonées chez les bactéries (Tchieu *et al.*, 2001). Ils permettent le transport des sucres à travers les enveloppes bactériennes grâce à l'utilisation de l'énergie fournie par le transfert d'un groupement phosphate depuis le phosphoénolpyruvate (PEP) jusqu'au substrat carboné, en passant par une cascade d'intermédiaires protéiques. Les systèmes PTS jouent également un rôle crucial dans la régulation globale du métabolisme cellulaire (Saier and Reizer, 1994) et dans le chémotactisme (Lux *et al.*, 1995). En effet, certaines protéines de ces systèmes interviennent dans l'adaptation des cellules procaryotes en modulant l'expression de certains gènes ou en interagissant avec d'autres partenaires protéiques, soit par allostérie, soit par phosphorylation.

1.3.2. ARCHITECTURE (POSTMA *ET AL.*, 1993)

Les systèmes PTS sont constitués de deux enzymes cytoplasmiques responsables du couplage énergétique, l'enzyme I (EI) et HPr, et d'un nombre variable d'enzymes EII chacune spécifique de la phosphorylation et du transfert d'un sucre.

Chaque système s'agence de la manière suivante : EI transfère le groupement phosphate fourni par le PEP sur la protéine HPr. Celle-ci transfère alors ce groupement sur les différentes enzymes EII aussi appelées transporteurs PTS. Les transporteurs PTS sont au minimum composés de trois unités fonctionnelles, IIA, IIB, IIC, qui peuvent soit constituer des domaines d'un complexe unique soit être indépendantes les unes des autres. Au sein de ces transporteurs, IIA et IIB acheminent de manière séquentielle le groupement phosphate depuis HPr vers le sucre transporté. IIC constitue la perméase du système et permet la translocation effective du sucre (fig. 5).

La suite de ce travail abordera une description plus approfondie des systèmes PTS. Cette description se base sur les modèles bactériens *E. coli* pour les bactéries à Gram – et *B. subtilis* pour les bactéries à Gram +.

1.3.3. LES ENZYMES PTS GÉNÉRALES : EI ET HPR

EI et HPr sont les deux constituants protéiques des systèmes PTS intervenant dans le transport des sucres qui ne présentent aucune spécificité pour les différentes sources carbonées introduites dans la cellule procaryote. Elles sont responsables de l'initiation du transfert du groupement phosphoryle extrait du PEP et de son acheminement vers les complexes de transporteurs EII^{sucre} spécifiques du carbohydrate extracellulaire. Ces enzymes fonctionnent donc principalement comme coupleurs énergétiques.

1.3.3.1. Enzyme EI

L'Enzyme EI est une protéine d'environ 60 kDa qui présente une forte tendance à l'homodimérisation. Elle est caractérisée par un domaine carboxy-terminal de reconnaissance du PEP et par un domaine catalytique d'autophosphorylation centré sur une histidine conservée (His-189 chez *E. coli*). Ces domaines présentent de fortes similarités avec les domaines correspondants de la PEP synthase et de la pyruvate:phosphate dikinase (Saier, 1987). Ces trois enzymes catalysent toutes une réaction d'autophosphorylation dépendante du PEP en employant les mêmes mécanismes. EI diffère des deux autres enzymes par la présence d'un domaine amino-terminal de reconnaissance de la protéine HPr, mais également par l'absence d'un domaine de reconnaissance de l'ATP (Pocalyko *et al.*, 1990).

La réaction d'autophosphorylation a lieu en position N-3 sur le résidu histidyl conservé du domaine catalytique et requiert vraisemblablement la forme dimérique de la protéine (Kukuruzinska *et al.*, 1982). C'est en présence de PEP et de Mg^{2+} que les monomères sont les plus susceptibles de se phosphoryler l'un l'autre. Le dimère phosphorylé se dissocie alors en monomères capables individuellement de phosphoryler HPr. L'étape limitante dans l'entièreté de ce cycle semble être la réassociation subséquente des deux monomères déphosphorylés.

1.3.3.2. HPr

Hpr est une petite protéine monomérique de 9 KDa chez *E. coli* constituée d'un seul domaine et caractérisée par une forte stabilité thermique. Elle sert d'intermédiaire dans le transfert de l'énergie contenue dans les groupements phosphoryles entre EI et la variété de complexes d'enzymes EII^{sucre} des systèmes PTS. Contrairement à EI, aucun homologue non-PTS de HPr n'a été identifié à l'heure actuelle. Bien que la séquence d'HPr varie considérablement chez les nombreux genres bactériens, sa structure tridimensionnelle est quant à elle extrêmement bien conservée aussi bien chez les bactéries à Gram + que chez les bactéries à Gram - (Jia *et al.*, 1994).

Les études structurales et fonctionnelles d'HPr ont mis en évidence le rôle essentiel de deux résidus conservés localisés au niveau du site actif de l'enzyme : His-15 et Arg-17 (Kalbitzer *et al.*, 1982). Ces études ont également mis en évidence qu'HPr était caractérisée par deux conformations différentes : une conformation dite "ouverte" et une conformation dite "fermée" correspondant respectivement aux formes non phosphorylée et phosphorylée de la protéine. Dans la conformation ouverte, les deux résidus cités ci-dessus sont situés à l'opposé l'un de l'autre, ce qui permet la phosphorylation de HPr par EI au niveau de His-15. Cette

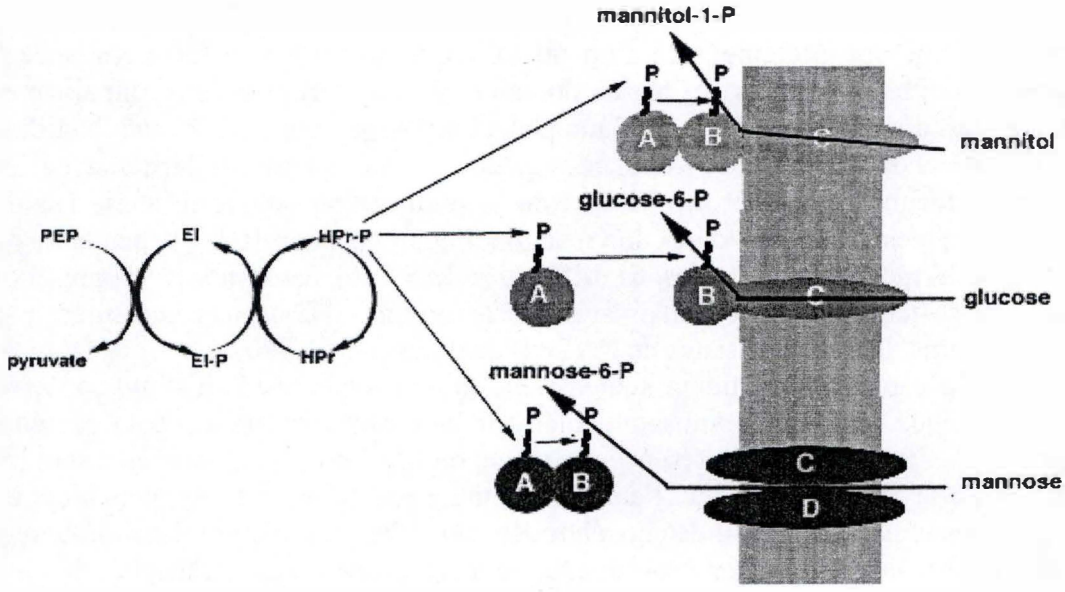


Fig. 6. Représentation des familles PTS spécifiques du mannitol, du glucose et du mannose.

réaction provoque alors le redressement de la protéine et le rapprochement subséquent de His-15-P et de Arg-17. A ce moment, l'Arg-17 stabilise la conformation fermée en interagissant avec le groupement phosphoryle. Il a en effet été montré que des substitutions de ce résidu (Arg-17) par des acides aminés tels que la glycine ou la lysine provoquaient une réduction de l'efficience catalytique de la réaction de 100 à 1000 fois (Anderson & Waygood, 1993).

1.3.3.3. Les enzymes PTS EII

Les constituants EII correspondent aux complexes de transporteurs des carbohydrates dans les systèmes PTS. Comme il l'a déjà été mentionné plus haut, ces complexes sont tous spécifiques du type de sucre transporté. Ils peuvent être constitués d'une à quatre protéines, dont au moins une est membranaire. Dans tous les cas, chaque complexe est constitué d'un minimum de trois domaines fonctionnels (IIA, IIB, IIC) à un maximum de quatre dans le cas du mannose avec IID en supplément.

Les caractéristiques communes sont les suivantes (Lengeler *et al.*, 1990) : (1) un domaine hydrophile IIA (environ 100 a.a.) présentant un résidu conservé His phosphorylable par HPr-His-P, (2) un domaine hydrophile IIB (environ 100 aa) phosphorylable par IIA-P au niveau d'un résidu cystéine (parfois histidine), (3) un domaine IIC de 350 résidus constitué de 6 à 8 hélices transmembranaires, d'au moins une boucle hydrophile et possédant un résidu glutamate essentiel à son bon fonctionnement. Bien que certains points restent à confirmer, le modèle suivant est utilisé pour décrire la suite d'événements conduisant au transport et à la phosphorylation des substrats carbonés au niveau des complexes EII des systèmes PTS (Postma *et al.*, 1993): (i) le substrat périplasmique se lie avec une grande affinité à son complexe EII spécifique (on considère que si ce complexe n'est pas sous sa forme phosphorylée, le substrat peut traverser la paroi par diffusion simple à travers le domaine IIC mais de façon très lente); (ii) la phosphorylation de IIB permet la translocation rapide du substrat en direction de la face cytoplasmique de la cellule via IIC; (iii) le domaine IIB peut alors phosphoryler le substrat. Cette réaction provoque la dissociation du substrat phosphorylé dans le cytoplasme. On constate ainsi qu'en conditions physiologiques normales, le transport semble être couplé à la phosphorylation bien que, d'un point de vue fonctionnel, ces deux processus soient séparés (Postma *et al.*, 1993).

On considère que la variété de formes qui caractérise les complexes de transporteurs est le résultat de phénomènes de fusion ou de division au cours de l'évolution mais ne traduit en aucun cas une différence mécanistique.

Les protéines et domaines EII peuvent être regroupés en quatre familles au minimum sur base de leurs similarités de séquences (fig. 6) (Lengeler *et al.*, 1990) (Reizer *et al.*, 1991). On décrit de cette manière les transporteurs du Glucose, du Mannitol, du Lactose et du Mannose. Pour être considéré comme appartenant à une même famille, chaque membre doit partager avec les siens un minimum de 25% d'identité au niveau de sa séquence en acides aminés sur l'entièreté de la protéine.

a) <u>La famille du glucose-sucrose</u>

Tous les membres de cette famille phosphorylent leur substrat (glucose, disaccharides constitués d'un glucose, et sucres aminés) au niveau du $6^{ème}$ carbone du cycle glucopyranoside. Comme pour les autres EII, le domaine hydrophobe IIC constitue le canal

de translocation. Dans cette famille, les domaines IIB et IIC sont toujours fusionnés soit dans l'ordre IICB pour le groupe du glucose ou dans l'ordre IIBC pour celui du sucrose (en partant de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale). Le domaine IIA, quant à lui, est libre ou connecté par un linker au niveau de l'extrémité carboxy-terminale des deux domaines précédents (par exemple, $IICBA^{Nag}$ (N-acétylglucosamine) et $IIBCA^{Bgl}$)[2].

b) La famille du mannitol-fructose

Le transporteur EII^{Mtl} (spécifique du mannitol) correspond à une seule grande protéine du type IICBA qui ne présente que très peu d'identité avec la famille du glucose. De par sa similarité de séquence, le complexe II^{Fru} (spécifique du fructose) a été classé dans la même famille bien qu'il soit du type IIBC, avec EIIA séparé. Cependant, l'arrangement et la taille du complexe sont particuliers. En effet, il est constitué, chez les bactéries entériques, d'une protéine membranaire (encodée par le gène *fruA*) de 553 résidus présentant une structure du type IIB'BC où B' est une duplication intramoléculaire de IIB. De plus, au sein de l'opéron *fru* chez ces mêmes bactéries, on retrouve la séquence codante *fruf* qui encode une protéine appelée FPr ou pseudo-HPr constituée de trois domaines : un domaine amino-terminal IIA^{Fru} similaire au domaine IIA^{Mtl}, une partie centrale de fonction inconnue présentant de faibles similarités avec le domaine receveur des systèmes à deux composants (RR) et une extrémité carboxy-terminale ressemblant à HPr.

c) La famille du mannose-sorbose-fructose

Chez les bactéries entériques, on retrouve trois protéines EII très similaires spécifiques du mannose et du L-sorbose et qui contiennent quatre domaines (IIA, IIB, IIC, IID) à la place des trois habituels (IIA, IIB, IIC). Le complexe EII mannose est constitué d'une grande protéine soluble de 323 résidus (ManX) dans laquelle on retrouve les domaines IIA et IIB fusionnés par un linker. Deux protéines constituent le lien transmembranaire du système : IIC et IID[3].

---

[2] Beaucoup de EII appartenant à cette famille (telle que $IICB^{Mal}$, $IICB^{Tre}$, et $IIBC^{sucrose}$) sont capables d'interagir avec IIA^{Glc} et $IICB^{Glc}$. Cette observation confirme l'existence de relations étroites entre les différents membres d'une même famille et supporte l'hypothèse selon laquelle les EIIs de chaque famille auraient évolué à partir du même domaine protéique autonome Saier, M. H., Jr., Yamada, M., Erni, B., Suda, K., Lengeler, J., Ebner, R., Argos, P., Rak, B., Schnetz, K., Lee, C. A. & et al. Sugar permeases of the bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: sequence comparisons. *Faseb J* **2**, 199-208 (1988)..

[3] Le système PTS du mannose est également requis pendant l'infection des cellules d'*E. coli* par les bactériophages Lambda et N4. En effet, l'extrémité hydrophile amino-terminale de IID^{Man} semble essentielle à la reconnaissance du phage. Par contre, l'infection ne requiert ni $EIIAB^{Man}$ ni aucune réaction de phosphorylation Erni, B., Zanolari, B. & Kocher, H. P. The mannose permease of Escherichia coli consists of three different proteins. Amino acid sequence and function in sugar transport, sugar phosphorylation, and penetration of phage lambda DNA. *J Biol Chem* **262**, 5238-47 (1987)..

2. EXEMPLES DE SYSTÈMES RÉGULÉS PAR LES SYSTÈMES PTS

2.1. Répression catabolique du carbone

La répression catabolique du carbone (RCC) est un système d'autorégulation permettant l'utilisation contrôlée des sources de carbone extracellulaires mais également de celles présentes à l'intérieur de la cellule. La RCC s'articule sur deux mécanismes (Bruckner and Titgemeyer, 2002): le contrôle transcriptionnel médié par les protéines globales du type CRP ou CcpA et les processus de signalisation intracellulaire permettant d'empêcher l'induction des mécanismes d'incorporation et de métabolisation des sucres.

L'incorporation de la majorité des sucres chez les bactéries s'effectue par les systèmes PTS. En conséquence, les différents phénomènes de transduction du signal impliqués dans la RCC font intervenir plusieurs des acteurs des systèmes PTS.

2.1.1. PHÉNOMÈNE DE RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE GLOBALE

Les bactéries ont développé des circuits globaux de régulation transcriptionnelle dans lesquels des régulateurs pléiotropes sont activés. Ces protéines de contrôle global, appelées CAP (catabolite gene activator protein) ou CRP (cAMP receptor protein) chez *E. coli* et CcpA (catabolite control protein) chez les bactéries à Gram + à faible contenu en GC, agissent sur un très grand nombre d'opérons ou de gènes cataboliques. Pratiquement n'importe quelle source de carbone est capable de déclencher ce contrôle transcriptionnel global. La répression catabolique dépendante de CRP ou de CcpA est utilisée par les bactéries comme un mécanisme de régulation global plutôt que comme un système favorisant l'utilisation préférentielle de certaines sources carbonées. Associé à d'autres mécanismes d'autorégulation, ce système permet aux bactéries d'ajuster l'utilisation des sucres à leurs capacités métaboliques.

2.1.1.1. Régulation chez les bactéries à Gram - (Busby and Ebright, 1999)

Chez *E. coli*, l'absence de glucose maintient le composant protéique PTS $EIIA^{glc}$ sous sa forme phosphorylée. EIIA-P active l'adénylate cyclase et, en conséquence, augmente la concentration intracellulaire en AMP cyclique (AMPc). A un niveau d'AMPc suffisant, cet effecteur allostérique se lie à CRP pour permettre la liaison de ce régulateur transcriptionnel aux séquences d'ADN spécifiques présentes dans les régions "amont" de certains gènes (Postma *et al.*, 1993). Les bactéries à Gram – utilisent donc le médiateur CRP dans le cadre de

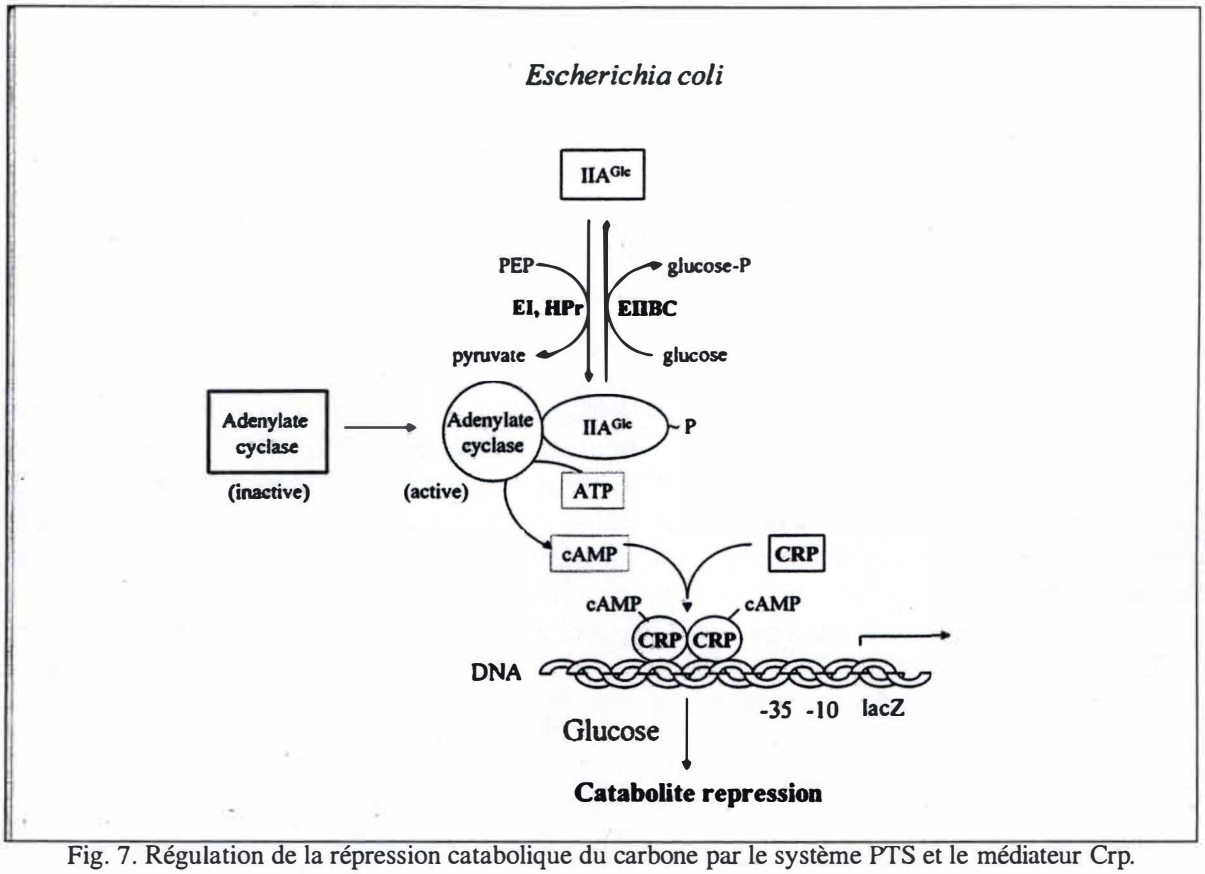


Fig. 7. Régulation de la répression catabolique du carbone par le système PTS et le médiateur Crp.

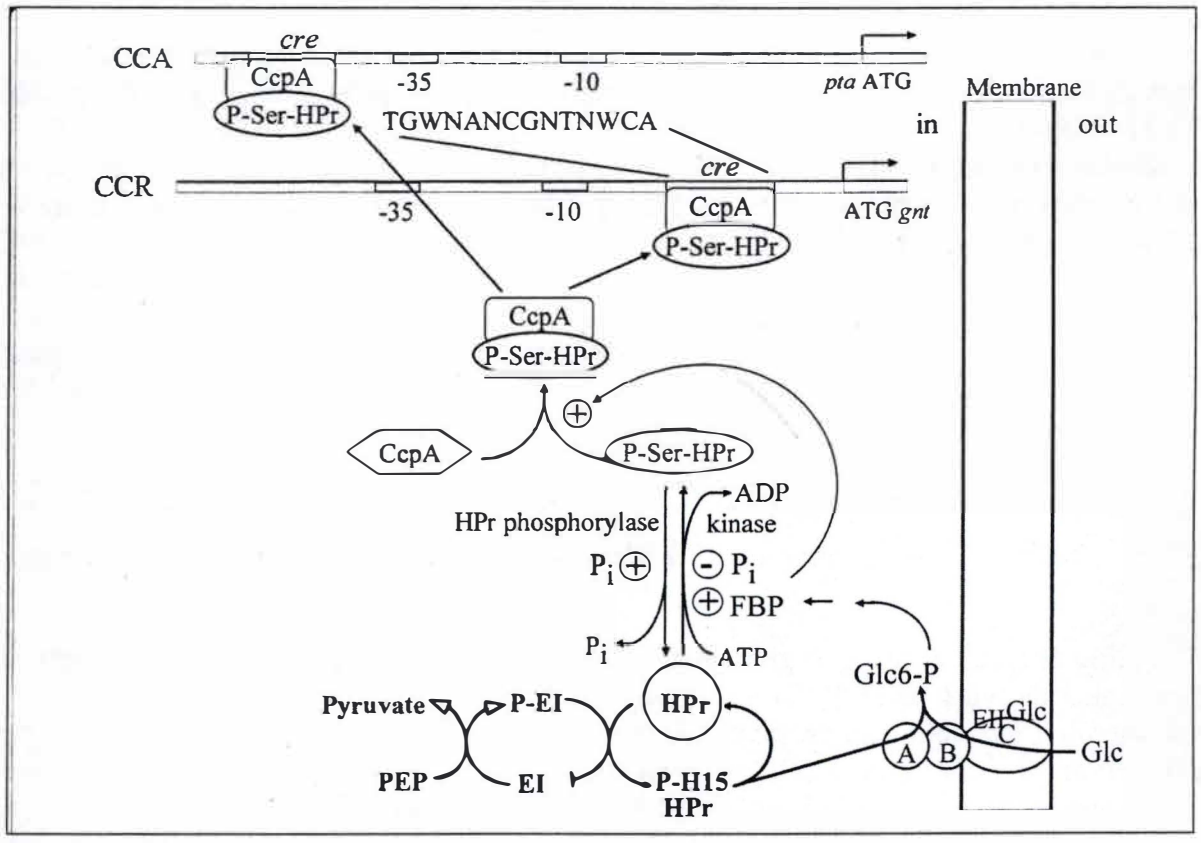


Fig. 8. Régulation de la répression catabolique du carbone par le système PTS et la protéine CcpA.

la RCC (fig. 7). En interagissant avec la machinerie de transcription, ce médiateur régule l'initiation de la transcription de plus de 100 gènes et opérons cataboliques.

2.1.1.2. Régulation chez les bactéries à Gram + (Henkin, 1996)

Chez les bactéries à Gram + à faible contenu en GC, la RCC fait intervenir la protéine CcpA. Contrairement au régulateur CRP, CcpA est responsable d'un mécanisme de régulation négatif. Le senseur primaire de la voie de signalisation de la RCC est une protéine particulière appelée HPr K/P (Deutscher and Saier, 1983).

La Kinase/Phosphorylase HPr (HPrK/P) est une enzyme hexamérique bifonctionnelle (Deutscher *et al.*, 1986) qui catalyse, en présence d'ATP ou de pyrophosphate, la phosphorylation mais également la déphosphorylation de la protéine HPr au niveau de son résidu sérine 46. La réaction de phosphorylation dépendante de l'ATP est stimulée principalement par la présence de certains intermédiaires glycolytiques dont le fructose-1,6-biphosphate (FBP). La réaction de déphosphorylation stimulée par le phosphate inorganique (Pi) est quant à elle considérée comme étant une réaction de phosphorolyse et non d'hydrolyse (Fieulaine *et al.*, 2001). HprK/P joue un rôle très important dans la modulation de l'incorporation des sucres grâce à sa capacité de contrôle sur le niveau intracellulaire de HPr-ser-P. HPr-ser-P est un très mauvais substrat pour la réaction de phosphorylation catalysée par EI aux dépens du PEP sur l'His-15 de HPr. Or HPr-his-P est nécessaire pour l'activité primaire des systèmes PTS, à savoir le transport des sucres. Donc, l'augmentation de la quantité de HPr-ser-P ralentit la phosphorylation des EII et peut empêcher l'incorporation des sucres. En résumé, les bactéries modulent le ratio des deux formes phosphorylées de HPr de façon à ajuster le taux d'incorporation au taux de métabolisation, et ainsi empêcher une accumulation excessive des intermédiaires glycolytiques.

Au niveau de la RCC, HPr-Ser-P se lie au régulateur CcpA et permet ainsi sa liaison à des sites consensus *cre* (catabolic responsive element) situés dans les régions promotrices des différents gènes cibles, engendrant ainsi leur répression transcriptionnelle[4] (fig. 8) (Deutscher *et al.*, 1995).

2.1.2. MÉCANISMES DE PRÉVENTION DES PHÉNOMÈNES D'INDUCTION

La RCC est également un mécanisme régulateur qui assure l'utilisation séquentielle des sucres disponibles dans le milieu extracellulaire (Postma *et al.*, 1993). Chez les bactéries, la sélection des sources carbonées se fait principalement via induction des mécanismes cellulaires spécifiques impliqués dans le métabolisme de ces sucres. Les bactéries sont capables d'établir une hiérarchie dans l'utilisation des différents sucres en contrôlant

[4] La grande différence entre la RCC dépendante de CRP des bactéries à Gram - et la RCC médiée par CcpA des bactéries à Gram + est l'étroitesse du couplage qu'il existe pour la première entre les mécanismes de transport et les fonctions de régulation des systèmes PTS. Dans les processus liés à CRP, la régulation de l'expression est directement connectée au renouvellement de IIA^{Glc}. Par contre, dans les systèmes impliquant CcpA, les mécanismes sont plus versatiles par le fait que le senseur primaire, HPr K/P, peut être activé par d'autres métabolites que les intermédiaires glycolitiques Warner, J. B. & Lolkema, J. S. CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 475-90 (2003)..

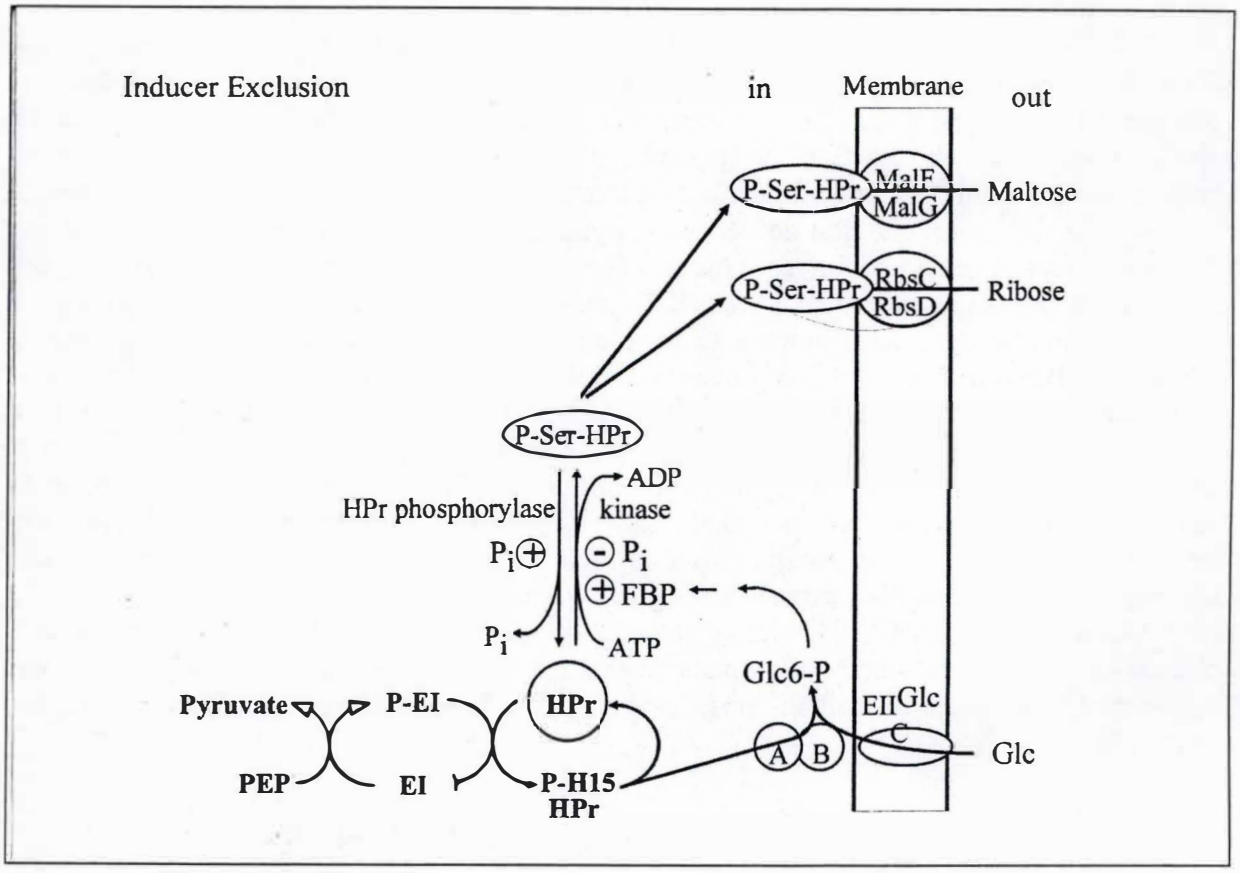


Fig. 9. Inhibition allostérique des perméases au maltose et au ribose par la protéine Hpr-ser-P chez les bactéries à Gram +, phénomène appelé exclusion d'inducteur.

directement l'activité des régulateurs ou la formation des inducteurs spécifiques de chaque source carbonée. Ce mécanisme est appelé « prévention des phénomènes d'induction ». C'est de cette manière que, par exemple, *E. coli* privilégie une niche écologique riche en glucose alors que *Streptococcus thermophilus* s'adapte mieux dans un milieu riche en lactose (van den Bogaard *et al.*, 2000).

Parmi les processus impliqués dans cette régulation, les principaux sont l'exclusion d'inducteur et le contrôle de l'activité des régulateurs à domaines PRD par les protéines PTS.

2.1.2.1. L'exclusion d'inducteur

L'exclusion d'inducteur est un processus régulateur par lequel un sucre inhibe l'incorporation d'une autre source de carbone (Postma *et al.*, 1993). Chez *E. coli*, ce phénomène est principalement médié par l'enzyme spécifique $EIIA^{glc}$ du système PTS correspondant (spécifique du glucose). Quand le glucose est présent, il permet le drainage du groupement phosphoryle acheminé par les systèmes PTS. Il en résulte une prédominance de la forme $EIIA^{glc}$ déphosphorylée. Dans cette conformation, la protéine est susceptible d'interagir par allostérie avec les perméases des sucres non incorporés par les systèmes PTS (tels que le lactose, le maltose, le mélibiose, et le raffinose) et d'inhiber le transport de ces sucres et la formation des inducteurs comme l'allolactose. L'absence d'inducteurs intracellulaires spécifiques permet de maintenir l'expression des opérons cataboliques correspondants à leur niveau basal. $EIIA^{glc}$ peut également se lier à la glycérol kinase et ainsi empêcher la phosphorylation du glycérol.

Chez les bactéries à Gram + à faible contenu en GC, un autre composant des PTS, la protéine HPr-ser-P, est impliqué dans l'exclusion d'inducteur (fig. 9) (Cornilescu *et al.*, 2002). En effet, chez *Lactobacillus casei* ou *Lactococcus lactis*, la phosphorylation de HPr par HPr K/P est essentielle, *in vivo*, à la répression des transporteurs de sucres non PTS.

2.1.2.2. Les domaines régulateurs PTS (PRD) (Stulke *et al.*, 1998)

Un autre mode de contrôle des phénomènes d'induction présentant une relevance physiologique importante pour la RCC est basé sur l'existence de domaines protéiques dupliqués et spécialisés sur des régulateurs transcriptionnels appelés PRD (PTS regulator domain). La phosphorylation de ces domaines permet de moduler l'activité des régulateurs transcriptionnels auxquels ils appartiennent et donc l'expression des opérons cataboliques cibles. Ces régulateurs peuvent être soit des activateurs, soit des antiterminateurs. Les régulateurs caractérisés par des domaines PRD sont contrôlés par la phosphorylation dépendante des systèmes PTS selon des modalités différentes chez les bactéries à Gram - et +. Chez les bactéries à Gram -, ils sont contrôlés par la phosphorylation positive (c'est-à-dire activatrice) de la protéine HPr et par la phosphorylation négative (c'est-à-dire inhibitrice) de l'enzyme EIIB spécifique du sucre inducteur. L'activité est ainsi fonction de la balance entre phosphorylation positive et phosphorylation négative, elle-même dépendante des espèces de sucres présentes.

En l'absence de glucose et d'un autre sucre inducteur, c'est-à-dire en l'absence d'un accepteur final du groupement phosphate, HPr et EIIB restent phosphorylés. Ces deux protéines peuvent alors transférer leur groupement phosphate respectif sur les deux domaines PRD des régulateurs qui contrôlent l'activité des opérons intervenant dans le métabolisme du

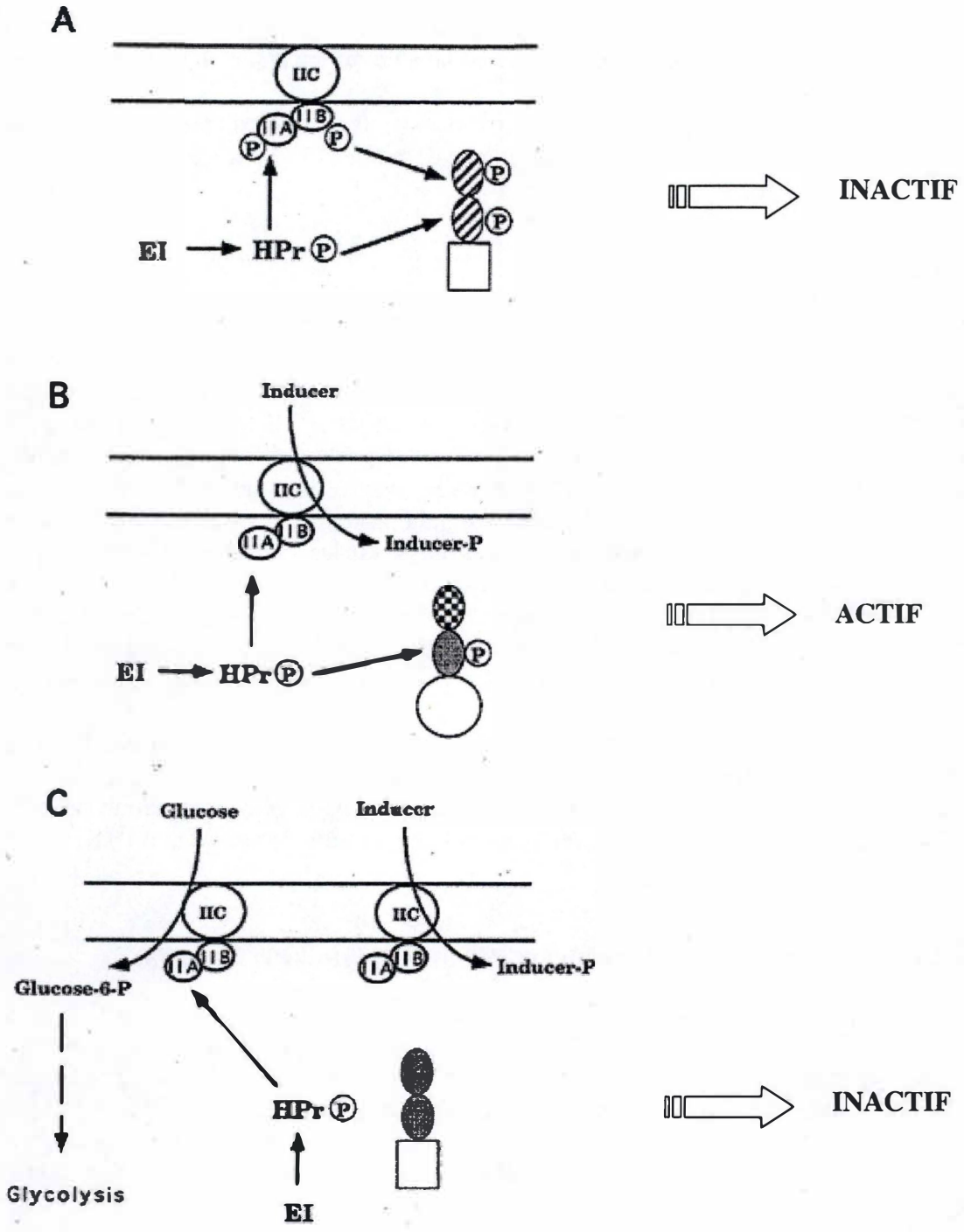


Fig. 10. Modèle du contrôle médié par les protéines PTS des régulateurs à domaines PRD. A) L'absence de glucose et de sucre inducteur provoque la double phosphorylation du régulateur à domaines PRD par les protéines EIIB-P et HPr-P. Cette réaction conduit à l'inactivation du régulateur. B) L'absence de glucose et la présence du sucre inducteur permettent la phosphorylation du régulateur à domaines PRD par la protéine HPr uniquement. Cette phosphorylation étant activatrice, elle provoque la stimulation du régulateur. C) La présence du glucose et du sucre inducteur ne permet pas la phosphorylation du régulateur à domaines PRD par les protéines HPr et EIIB. La phosphorylation de HPr étant nécessaire à l'activation du régulateur, celui-ci reste inactif.

sucre inducteur. Cette double phosphorylation provoque l'inactivation du régulateur PRD, la phosphorylation positive étant contrebalancée par la phosphorylation négative. En présence du sucre inducteur mais en absence de glucose, EIIB transfère son groupement phosphate sur le sucre inducteur et n'exerce donc plus son activité inhibitrice sur les régulateurs PRD. HPr, quant à elle, reste suffisamment phosphorylée pour transférer son groupement phosphate sur ces régulateurs et provoquer de cette manière leur activation. Dans le dernier cas où à la fois le sucre inducteur et le glucose sont présents, toutes les protéines PTS sont déphosphorylées. Les régulateurs PRD ne peuvent en conséquence plus être stimulés par la phosphorylation dépendante de HPr et sont dès lors inactifs (fig. 10).

Chez les bactéries à Gram +, le système reste globalement similaire et emploie les mêmes acteurs. La différence réside au niveau du contrôle de l'activité stimulatrice de la protéine HPr. En présence de source carbonée rapidement métabolisable, la phosphorylation dépendante de l'ATP au niveau de la sérine 46 de HPr par HPr K/P empêche la phosphorylation de HPr sur son résidu histidine par l'enzyme EI et ainsi l'activation des régulateurs à domaines PRD.

La protéine LevR de *B. subtilis* est un exemple de protéine à domaines PRD dont la régulation a pu être élucidée en détails (Martin-Verstraete *et al.*, 1998). Cette protéine contrôle l'expression de l'opéron lévenase impliqué dans l'incorporation et la dégradation des polymères de fructose (Martin-Verstraete *et al.*, 1990).

2.2. PTS : système de transduction du signal dans le chémotactisme

L'une des voies de signalisation du chémotactisme les mieux connues est celle impliquant les protéines chémotactiques acceptrices de groupements méthyles (MCP) comme senseurs membranaires. Deux protéines, CheA et CheY, équivalant respectivement à l'histidine kinase et au régulateur de réponse des systèmes à deux composants, forment l'unité centrale de ce système. La phosphorylation de CheY par CheA permet notamment sa liaison au composant FliM du moteur flagellaire. Cette interaction provoque la rotation horlogique du flagelle (Welch *et al.*, 1998).

Les systèmes PTS sont considérés comme étant le second système de transduction du signal intervenant dans le chémotactisme positif en présence de sucres PTS (Lengeler and Vogler, 1989). La stimulation de ce type de chémotactisme nécessite l'incorporation et la phosphorylation des substrats carbonés via les transporteurs EII. Ce mécanisme n'implique aucune MCP puisqu'il reste entièrement fonctionnel chez des mutants ne possédant pas l'une ou l'autre de ces protéines (Niwano and Taylor, 1982). Par contre, les cellules mutées pour un complexe EII spécifique perdent leur chémoattraction vers le substrat correspondant.

Les activités de transport, de phosphorylation et de chémoréception imputées aux EII sont trois réactions étroitement liées. En effet, aucune mutation affectant EII et éliminant le comportement chémotactique n'épargne le transport ou la phosphorylation du sucre correspondant. L'absence de EI ou de HPr empêche quant à elle l'attraction biochimique vers un quelconque sucre PTS même si le complexe EII correspondant est présent en parfaite intégrité.

Bien que les choses restent obscures, le modèle utilisé pour expliquer l'interaction entre le chémotactisme et les systèmes PTS propose que le signal chémotactique dépendant du PTS correspondrait à un changement de l'état de phosphorylation de EI et/ou HPr et suggère qu'il

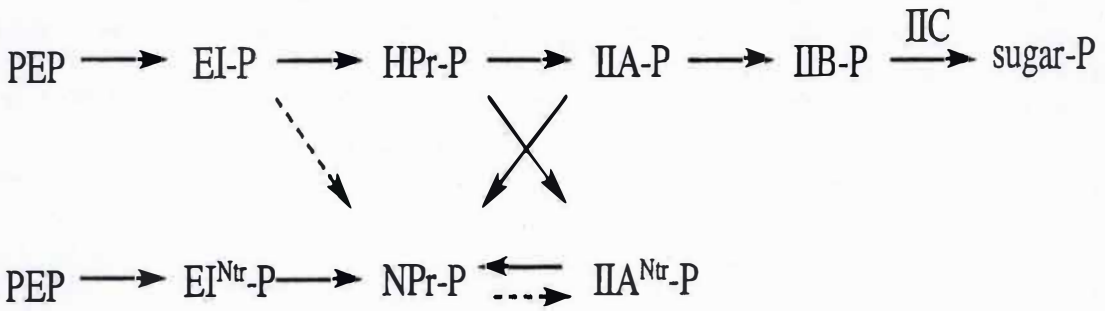


Fig. 11 (d'après Rabus *et al.*, 1999).
Interconnections entre le système PTS impliqué dans le métabolisme azoté et le système PTS du système carboné.

existerait un lien avec les réseaux impliquant les MCP puisque EI interviendrait directement sur la déphosphorylation de CheA (Lengeler *et al.*, 1981).

2.3. PTS : système de régulation du métabolisme azoté

Bien que les choses restent mal définies, une connection entre l'utilisation de l'azote et celle du carbone pu être mise en évidence. En effet, des analyses informatiques ont montré que plusieurs bactéries à Gram - possèdaient un homologue de EIIA présentant la particularité d'être cotranscrit au niveau de l'opéron *rpoN* avec le facteur σ54 (ou σN) qui le régule négativement (van Montfort and Dijkstra, 1998). Cette protéine a en conséquence été appelée $EIIA^{ntr}$ (ntr pour *nitrogen*), car chez *E. coli* σ54 est un facteur clé responsable de la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme de l'azote. Cette observation a permis d'avancer l'hypothèse selon laquelle IIA^{ntr} fournirait un lien régulateur entre le PTS et le métabolisme azoté chez les bactéries. En plus du gène *ptsN* encodant IIA^{ntr}, le gène *npr* encodant une protéine HPr-like appelée NPr ainsi que le gène *ptsP* encodant l'enzyme EI^{ntr} ont été, par la suite, mis en évidence. Il a pu être montré que ces trois protéines constituaient une chaîne de transfert de groupements phosphoryles fonctionnant parallèlement à celle formée par leurs homologues classiques respectifs, EI, HPr et EIIA. NPr serait en effet phosphorylé par EI^{ntr} aux dépens du PEP, après quoi le groupement phosphate serait transféré vers $EIIA^{ntr}$ (Powell *et al.*, 1995). Cette nouvelle chaîne de transfert PTS pourrait être interconnectée avec le métabolisme carboné puisqu'il a été montré que des connexions entre Hpr et $EIIA^{ntr}$ étaient possibles chez *P. aeruginosa* (Jin *et al.*, 1994) (fig. 11).

Chez *E. coli,* la délétion du gène *ptsN* encodant la protéine $EIIA^{ntr}$ provoque une diminution de l'utilisation de plusieurs acides aminés (Powell *et al.*, 1995). De plus, il a été observé que certains sucres étaient capables d'inhiber la croissance du mutant *ptsN* en présence d'alanine ou d'aspartate comme seule source azotée. Bien que les détails de ce phénomène ne soient pas encore connus, cette observation confirme l'existence d'un mécanisme reliant l'assimilation du carbone à celle de l'azote. Une implication de la protéine $EIIA^{ntr}$ dans la régulation des GTPases ERA, semblant intervenir dans la progression du cycle cellulaire et dans l'initiation de la division cellulaire a également été proposée (Powell *et al.*, 1995).

Beaucoup de données biochimiques et physiologiques suggèrent que les protéines générales PTS, EI^{ntr} et NPr, en plus de jouer un rôle dans la régulation du métabolisme azoté, interviennent dans le métabolisme central. Une mutation du gène *ptsP* encodant la protéine EI^{ntr} de *Azotobacter vinelandii* altère le métabolisme du poly-β-hydroxybutyrate et contrecarre le pouvoir protecteur au niveau respiratoire de la nitrogénase en conditions limitées en sources carbonées (Segura and Espin, 1998). Chez *Rhizobium etli*, EI^{ntr} contrôle la production de mélanine (Michiels *et al.*, 1998), alors que chez *Legionella pneumophila*, cette protéine est impliquée dans la virulence (Higa and Edelstein, 2001).

Comme $EIIA^{ntr}$ semble être l'accepteur final de groupements phosphates de cette cascade métabolique, il apparaît probable que cette protéine soit un régulateur central qui interagirait avec une variété de cibles. Cependant, le mécanisme de son action reste mal connu

3. PHYLOGÉNIE DES SYSTÈMES PTS

Le séquençage et la disponibilité des génomes ont permis d'apporter des conclusions sur l'occurrence, la distribution et les origines des protéines spécifiques des systèmes PTS (Hu and Saier, 2002). De cette façon, il a été montré que, d'une part, toutes ces protéines sont exclusives au règne bactérien, ce qui suggère qu'elles soient apparues après la séparation phylogénétique entre les eubactéries, les archébactéries et les eucaryotes et, d'autre part, plusieurs différences permettent de distinguer les systèmes PTS au sein même des bactéries (Tchieu *et al.*, 2001).

E. coli et *B. subtilis* représentent les membres les mieux caractérisés du royaume des bactéries à Gram – et + respectivement. *E. coli* encode 22 perméases PTS appartenant notamment aux familles du fructose, du glucose et du mannose. *B. subtilis* en encode 15. Alors qu'*E. coli* encode 5 protéines paralogues ou domaines EI-like et 6 protéines paralogues ou domaines Hpr-like, *B. subtilis* n'encode qu'une seule enzyme EI et uniquement deux protéines HPr. Par contre *B. subtilis* possède beaucoup plus de régulateurs à domaine PRD (il en possède 8) qu'*E. coli* (qui n'en possède qu'un). De plus, le génome de *B. subtilis* est le seul des deux bactéries à encoder une HprK/P. Il semble ainsi clair que même si ces deux bactéries utilisent les systèmes PTS à des fins de régulation, les mécanismes choisis sont différents.

Le contraste qui existe entre *E. coli* et *B. subtilis* reflète la grande diversité existant chez les autres bactéries. Par exemple, aucune bactérie à Gram + possédant plus d'une enzyme EI n'a encore été recensée dans la littérature. Par contre, *Streptococcus pneumoniae* (à Gram +) encode autant de perméases EII PTS qu'*E. coli* en ayant un génome deux fois plus petit. Toutes les bactéries à Gram + à faible contenu en GC utilisent la HprK/P dans le cadre de la régulation métabolique. Bien que cette protéine soit absente chez les bactéries entériques telles qu'*E.* coli, l'ORF encodant HprK/P est présente dans le génome de beaucoup d'autres bactéries à Gram – telles que *Neisseria* ou *Brucella.* Par contre, la plupart de ces mêmes bactéries n'encodent aucune perméase EII PTS ce qui présuppose, dans ce cas-ci, une fonction exclusive des systèmes PTS dans la régulation du métabolisme de ces bactéries (Fraser *et al.*, 1998).

A partir de ces analyses comparatives, il apparaît clair que les systèmes PTS ont divergé à la fois structuralement et fonctionnellement selon l'organisme analysé.

4. LE GENRE *BRUCELLA*

Le cycle infectieux d'une bactérie pathogène consiste en une progression spatio-temporelle d'événements définis. Le bon déroulement de ce cycle nécessite une régulation fine et précise de l'expression des gènes impliqués dans l'adaptation de la bactérie pathogène à son environnement hôte. L'étude d'un système de régulation globale telle que le système PTS trouve donc sa place dans le cheminement vers la compréhension des mécanismes qui permettent à une bactérie de se comporter en pathogène.

Dans notre laboratoire, nous travaillons sur la bactérie pathogène du genre *Brucella*. L'identification des mécanismes impliqués dans la virulence de cette bactérie en sont à leur début. L'étude du système PTS et de ses cibles chez *Brucella* contribuera donc à élucider ces mécanismes. Dans la section suivante, nous décrirons brièvement les caractéristiques de *Brucella*.

4.1. Généralités

Les bactéries pathogènes du genre *Brucella* sont des coccobacilles à Gram - mesurant de 0.6 à 1.5 µm sur 0.5 à 0.8 µm.

Les *Brucella* sont regroupées dans la sous-classe alpha-2 des protéobactériacées (Moreno *et al.*, 1990) dans laquelle elle est phylogénétiquement proche des genres *Rhizobium, Rhodobacter, Agrobacterium* et *Rickettsia* qui sont, pour la plupart, des symbiontes ou pathogènes para ou intracellulaires de plantes et d'animaux. Classiquement, le genre *Brucella* est divisé en six espèces sur base de leur préférence pour des hôtes spécifiques et de tests biochimiques et immunologiques: *B. melitensis* (chèvre et mouton), *B. abortus* (bovins), *B. suis* (porc), *B. ovis* (mouton), *B. canis* (chien) et *B. neotome* (rat du désert) (Boschiroli *et al.*, 2001). *Brucella* est l'agent étiologique de la brucellose, une zoonose particulièrement répandue dans le bassin méditerranéen, le Golfe Persique et l'Amérique Latine. Cette maladie, responsable de problèmes d'avortement et de stérilité des mâles chez les animaux domestiques et sauvages, est un réel problème économique dans les pays où elle est endémique (Boschiroli *et al.*, 2001). Quatre espèces de *Brucella* sont pathogènes pour l'homme : *B. abortus, B. melitensis, B. suis* et *B. canis*. Chez l'homme, la brucellose est mieux connue sous le nom de fièvre de Malte et est responsable d'une grande diversité de symptômes cliniques (fièvre intermittante, frisson, sueurs, faiblesse, maux de tête, anorexie, dépression et occasionnellement splénomégalie). Les localisations cliniques sont aussi nombreuses que diverses et la brucellose chronique mène à une série de complications ostéoarticulaires, gastrointestinales, hépatobiliaires, pulmonaires, urogénitales, neurologiques et/ou cardiovasculaires (Young, 1995).

Il existe trois vaccins vivants atténués couramment utilisés pour la vaccination animale : la souche Rev1 de *B. melitensis* (chèvre et mouton) et les souches S19 et RB51 de *B. abortus* (bovin) (O'Callaghan and MacMillan, 2001). Tous ces vaccins restent virulents pour l'homme mais la thérapie antibiotique est efficace contre la maladie.

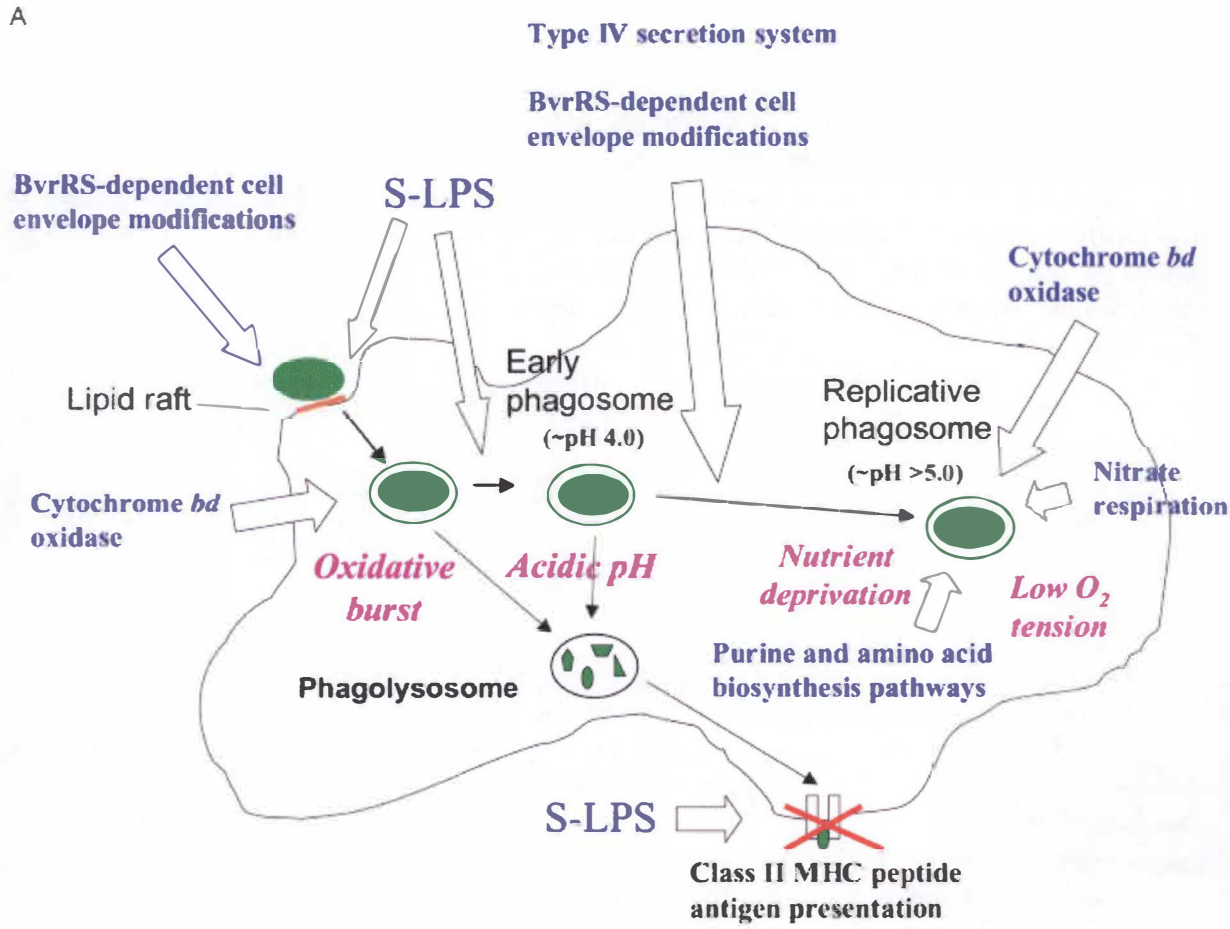


Fig. 12. Représentation schématique de l'environnement rencontré par *Brucella* lors de son cycle intracellulaire dans un macrophage. Les flèches blanches indiquent les endroits où interviennent les facteurs de virulence de *Brucella* (annotés en bleu) requis pour faire face aux conditions environnementales (annotées en mauve) rencontrées au cours de son trafic intracellulaire dans la cellule hôte.
BvrRS=*Brucella* virulence regulator (regulator and sensor); S-LPS=smooth lipopolysaccharides; MHC=molecular histocompatibility complex.

4.2. Pathogénie

Les *Brucella* pénètrent dans leur hôte par les muqueuses et se propagent ensuite à travers tout l'organisme. Elles se retrouvent dans la rate, le système lymphatique et, chez les animaux, dans le tractus génital et les glandes mammaires. Cette propagation par le sang se fait très probablement sous forme intracellulaire, dans les neutrophiles et les macrophages. La bactérémie se prolonge souvent par une invasion de nombreux types de tissus (os, articulations, yeux) (Pizzaro-Cerdà, 1999).

Brucella est un pathogène intracellulaire facultatif ; chez son hôte, elle survit et se multiplie dans des cellules phagocytaires professionnelles et dans des cellules phagocytaires non professionnelles. *Brucella* utilise une stratégie unique consistant à éviter la fusion avec les lysosomes et à modifier le processus de maturation du phagosome pour créer un nouvel environnement intracellulaire dans lequel elle se multiplie (fig. 12) (Pizzaro-Cerdà, 1999).

Au cours de son trafic intracellulaire, *Brucella* est soumise à toute une série de stress environnementaux. De récentes études suggèrent ainsi que la niche réplicative de *Brucella* est appauvrie en nutriments (acides aminés, purine) (fig 12) (Köhler *et al.*, 2002; Roop *et al.*, 2004). Face à de telles conditions, des systèmes de régulation globaux doivent être mis en jeu par *Brucella* afin de mener à bien son cycle infectieux. Ces différentes stratégies de régulation sont investiguées dans notre laboratoire. D'une part, des approches à grande échelle visent à identifier les régulateurs transcriptionnels requis pour l'adaptation de *Brucella* à l'environnement intracellulaire hôte (Haine, V., thèse en cours ; Delory, M., thèse en cours). D'autre part, des études plus ciblées tentent de caractériser les différents acteurs centraux impliqués dans des voies de régulation spécifiques (R. Hallez, thèse en cours; M. Dozot, thèse en cours).

But du Mémoire

BUT DU MÉMOIRE

Dans la section précédente, nous avons insisté sur l'importance de la compréhension des mécanismes de régulation impliqués dans l'adaptation de *B. melitensis* 16M à son environnement intracellulaire hôte. Le travail effectué au cours de ce mémoire s'inscrit dans dans cette optique.

Différents gènes encodant les acteurs d'un système de régulation global du métabolisme nutritionnel bactérien ont été identifiés chez *B. melitensis* 16M. Ce système, appelé PTS (pour phosphotransferase system), intervient d'une part dans le transport et la phosphorylation de substrats carbonés et d'autre part dans la régulation des voies associées au métabolisme de ces nutriments. L'objectif de ce mémoire est d'entamer la caractérisation du système PTS chez *B. melitensis* 16M.

Pour ce faire, trois approches ont été menées. Premièrement, une analyse *in silico* des loci PTS a été effectuée afin d'identifier les acteurs PTS présents chez *B. melitensis* 16M et d'établir un modèle de ce système. Ensuite, des tests d'interaction entre les différents partenaires identifiés ont été réalisés dans le but de mettre en évidence les relations existant entre les acteurs protéiques PTS. Enfin, la construction de mutants délétés pour les ORF PTS a été entamée afin d'étudier l'implication de ces gènes dans la virulence de *B. melitensis* 16M.

Matériel et Méthodes

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. MATÉRIEL

1.1. Souches et Plasmides

Souches bactériennes	Caractéristiques	Références ou sources
E. coli		
DH10B	(*F⁻ mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), ϕ80dlacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, endA1 , araD139, Δ(ara,leu)7697, galU, galK, λ⁻, rspL, nupG*) (*Sm^R*)	GibcoBRL (Invitrogen)
S-17	*λ* pir [*recA thi pro hsd*R⁻ M⁺ RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7 lysogenized with *λ* pir phage]	(Miller and Mekalanos, 1988)
DB3.1	F- *gyr*A462 *end*A-D(*sr*1-*rec*A) *mcr*B *mrr hsd*20(*r*B-,*m*B-) *sup*E44 *ara*14 *gal*K2 *lac*Y1 *pro*A2 *rps*L l- *leu mtl*1	Invitrogen
B. melitensis		
*Bm*16M biovar 1	Cette souche a été prélevée sur le terrain en 1955. Des mutants spontanés résistants à l'acide nalidixique ont été séléctionnés au laboratoire.	MacMillan (Central Veterinary Laboratory, UK)

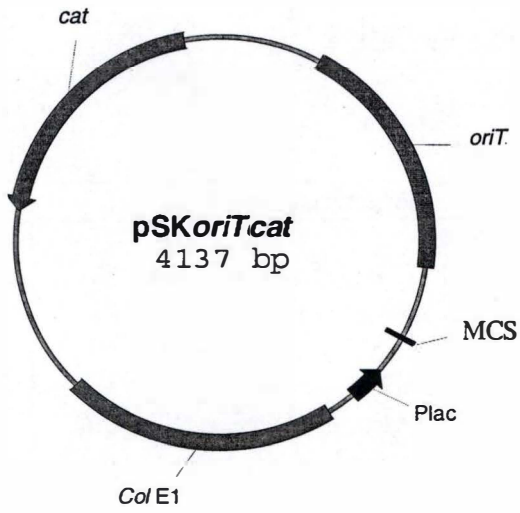


Fig. 13. pSK*oriTcat*, plasmide mobilisable et non réplicatif chez *Brucella*.
cat=chloramphenicol acetyltransferase; *oriT*=origine de transfert conjugatif; MCS=site multiple de clonage; Plac=promoteur de l'opéron *lac* ; *Col* EI=origine de réplication.

Souches de levures	Caractéristiques	Références ou sources
Saccharomyces cerevisiae		
MAV103	*(Mata) : LEU2-3, 112 TRP-901 HIS3Δ200 ade2-1gal4Δ gal80Δ SPAL10 ::URA3 GAL1 ::lacZGAL1 ::HIS3-@LYS2 can1^R cyh2^R*	(Walhout and Vidal, 2001)
MAV203	*(Matα) : LEU2-3, 112 TRP-901 HIS3Δ200 ade2-1gal4Δ gal80Δ SPAL10 ::URA3 GAL1 ::lacZGAL1 ::HIS3-@LYS2 can1^R cyh2^R*	(Walhout and Vidal, 2001)

Plasmides	Caractéristiques	Références ou sources
pGEMTeasy	Vecteur de clonage Amp^R possédant des extrémités T cohésives et permettant le test blanc/bleu[5].	Promega
pSK*ori*T-*cat* (fig. 13)	Vecteur dérivé du pBluescript SK (-) et dans lequel a été clonée une origine de transfert conjugatif *oriT* (pSK*ori*T, A. Tibor thèse 1999). Il porte la cassette de résistance au chloramphénicol disruptant le gène *bla* qui encode la résistance à l'ampicilline.	Danèse, thèse 2002
pUC4-*aphA4*	Vecteur dérivé du pUC4K (A. Oka *et al.*, 1981; Vieira and Messing, 1982), dans lequel le gène *aph* encodant la résistance à la kanamycine	Dozot, thèse en cours

5 Test blanc/bleu

Les éléments génétiques portés par la souche DH10B (Δlac) ne lui permettent pas d'avoir une activité ß-galactosidase normale. Une complémentation intragénique avec un plasmide apportant LacZ' (fragment non opérationnel du gène de régulation de l'opéron lactose) et un fragment du gène lacZ (partie N-terminale de la ß-galactosidase) peut néanmoins conférer à la bactérie une ß-galactosidase fonctionnelle, mise en évidence par son action sur X-gal (20µg/ml), substrat chromogène analogue du lactose dont le clivage produit un composé bleu. L'addition d'IPTG (0.1 mM) dans le milieu de culture permet l'induction de l'expression de la βGal. Le test blanc-bleu permet de détecter les bactéries présentant un plasmide recombinant car la disruption de lacZ' par l'insert empêche la complémentation. La colonie bactérienne apparaît donc blanche.

	a été substituée par la cassette de mutagenèse apolaire *aphA4*.	
pDONR201	Vecteur conçu pour le clonage en système Gateway de fragments d'ADN d'intérêt.	Invitrogen
pVV212	Vecteur dérivé du pGBT9 (Bartel *et al.*, 1993) dans lequel a été insérée une cassette de clonage Gateway™ (Invitrogen).	(Van Mullem *et al.*, 2003)
pVV213	Vecteur dérivé du pACTII (Fromont *et al.*,1997) dans lequel a été insérée une cassette de clonage Gateway™ (Invitrogen).	(Van Mullem *et al.*, 2003)

1.2. Milieux de culture

1.2.1. Milieux de culture Bactériens

1.2.1.1. **Milieu Luria Bertani (LB)** : Invitrogen

1.2.1.2. **Milieu 2YT**

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

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

1.2.2. MILIEUX DE CULTURE LEVURIENS

1.2.2.1. Milieu YPD liquide

- Glucose 20g/l
- Bacto Peptone 2% 50g/l
- Yeast Extract 1% 25g/l

Porter à volume avec de l'eau distillée, puis autoclaver.

1.2.2.2. Milieu minimum

a) Milieu SD (concentré 100X)

- Yeast Nitrogen Base w/o amino acid 6,75g/l
- Glucose 20g/l

Pour la préparation d'un milieu minimum solide, ajouter également :

- Agar 20g/l

Porter à volume avec de l'eau distillée, puis autoclaver.

b) Milieu CASA

- Yeast Nitrogen Base w/o amino acid 6,75g/l
- Glucose 20g/l

Pour la préparation d'un milieu minimum solide, ajouter également :

- Agar 20g/l
- Casamino Acid 1g/l

Porter à volume avec de l'eau distillée, puis autoclaver.

1.2.2.3. Milieu synthétique

Le milieu synthétique est réalisé en ajoutant dans le milieu minimum les acides aminés et bases azotées à raison de 1 ml de solution stock pour 100 ml de milieu.

Acides aminés et bases azotées 100 X:

- Adénine sulfate 2 g/l
- Uracile 2 g/l
- L-Tryptophane 2 g/l
- L-Histidine-HCl 2 g/l
- L-Leucine 3 g/l
- L-Lysine-HCl 3 g/l

1.2.3. ANTIBIOTIQUES, X-GAL ET IPTG

Noms	Abrév.	Solution de dissolution	Concentration stock (1000X)
- Acide nalidixique	Nal	NaOH 0,2N	25 mg/ml
- Ampicilline	Amp	H_2O	100 mg/ml
- Streptomycine	Sm	H_2O	30 mg/ml
- Chloramphénicol	Cm	Ethanol 100%	20 mg/ml
- Kanamycine	Kan	H_2O	50 mg/ml
- Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside	IPTG	Ethanol 70%	100 mM
- 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-βD-galactopyranoside	X-gal	Diméthylformamide	2 mg/ml

Stériliser au moyen d'un filtre de 0,22 µm (Millipore) avant d'aliquoter. Diluer 1000 fois lors de l'utilisation dans un milieu.

1.3. Tampons

Tampon K-PO4 pH 7,0 (100ml) :
- K2HPO4 1M 61,5 ml
- KH2PO4 1M 38,5 ml

Tampon TAE (50 X):
- Tris-HCl, pH 8,0 40 mM
- EDTA 50 mM
- Acide acétique glacial 57,1 ml/l de TAE 50 X

Tampon TE:
- Tris-HCl pH 8,0 10 mM
- EDTA 1 mM

Tampon de transformation TB (Transformation Buffer) :
- Pipes (Piperazine anhydre) 10 mM
- $MnCl_2$ 55 mM
- $CaCl_2$ 15 mM
- KCl 250 mM

Ajuster à pH 6.7 avec du KOH 5N avant d'ajouter le $MnCl_2$.

Tampon PBS 20x:
- Na_2HPO_4 22,98 g/l
- KCl 4 g/l
- NaCl 160g /l
- KH_2PO_4 4 g/l

TENa:

- Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
- EDTA	50 mM
- NaCl	0.1 M

PBS Triton-X 100 (500ml) :

- PBS 10 X	50 ml
- Triton-X 100	0.5 g
- eau distillée	450 ml

Tampon S1 (conserver à 4 °C):

- RNAse A	100 µg/ ml
- Tris-HCl pH 8,0	50 mM
- EDTA	10 mM

Tampon S2:

- NaOH	200 mM
- SDS	1 %

Tampon S3 (conserver à 4°C):

- Acétate de potassium pH 5.5	3.0 M

1.4. solutions

Solution d'acétate de lithium (LiAc) 10 X

- LiAc	10,2 g

- Porter à un volume de 100 ml avec de l'eau distillée, puis autoclaver.

Polyéthylène glycol (PEG) 50 %

- PEG 4000	50 g

Porter à un volume de 100 ml avec de l'eau distillée, puis stériliser par filtration sur un filtre 0,45 µm (Millipore).

LiAc/TE 1 X

- LiAc 10 X	$1/10^{ème}$ de volume
- TE 10 X	$1/10^{ème}$ de volume
- H_2O	$8/10^{ème}$ de volume

Mélange LiAc/TE/PEG 4000

- LiAc 10 X	$1/10^{ème}$ de volume
- TE 10 X	$1/10^{ème}$ de volume
- PEG 50 %	$8/10^{ème}$ de volume

Solution de 3-Amino-1,2,4-Triazole (3AT) 2M

- 3AT	42,04 g

Porter à un volume de 250 ml avec de l'eau distillée, stériliser par filtration avec un filtre 0,22 µm (Millipore). Conserver à 4°C.

Solution de dénaturation (Southern blot) :

- NaCl	1 M
- NaOH	0.5 M

Solution de neutralisation (Southern blot) :

- NaCl	1.5 M
- Tris-HCl pH 7.2	0.5 M
- EDTA	1 mM

SSC 20X :

- NaCl	3 M
- Citrate de sodium	0.3 M

Solution de préhybridation (Southern blot) :

- Denhardt 50 X	5 ml
- SSC 20 X	12.5 ml
- SDS 10 %	0.5 ml
- ADN de thymus de veau 100 µg / ml	3.3 ml
- H_2O	28.7ml

2. MÉTHODES

2.1. Techniques relatives à l'utilisation de bactéries

2.1.1. TECHNIQUES CLASSIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

2.1.1.1. Réaction de ligation

La réaction est réalisée pendant 2 heures à température ambiante (sur la paillasse), dans un volume ne dépassant pas 20 µl. Le mélange de réaction contient:

- Vecteur et insert dans un rapport moléculaire 1/1 pour un clonage directionnel et 1/3 pour un clonage non directionnel,

- 4 µl de Tampon 5X T4 DNA Ligase (Invitrogen),
- 1 µl de T4 DNA Ligase (Invitrogen),
- De l'eau jusqu'à un volume final de 20µl.

2.1.1.2. Transformation bactérienne

La transformation de bactéries compétentes consiste à faire entrer de l'ADN exogène (dans ce cas, un plasmide) dans une bactérie. Nous utilisons ici la transformation chimique pour transformer les souches *E. coli* DH10B et *S17*-1. Pour ce type de transformation, la paroi et la membrane bactériennes sont rendues perméables à l'ADN : la bactérie est alors dite compétente.

Des bactéries à Gram - *E. coli* en début de phase exponentielle de croissance sont rendues artificiellement compétentes par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium ($CaCl_2$). 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 ensuite soumises à un choc thermique qui permet au complexe de rentrer dans la cellule. Un temps d'incubation en milieu riche non sélectif permet aux bactéries de régénérer une paroi normale et aux gènes de résistance introduits de s'exprimer. Les transformants sont ensuite isolés sur milieu sélectif.

Mode opératoire

- Ajouter environ 10 µl de mélange de ligation ou 10 à 100 ng d'ADN à 50 à 150 µl de cellules compétentes,
- Déposer 30 minutes sur glace,
- Réaliser un choc thermique de 45 secondes à 37 °C,
- Ajouter 600 à 900 µl de LB liquide,
- Incuber 30 min à 1 heure à 37 °C,
- Etaler sur boîtes de milieu sélectif et incuber une nuit à 37 °C.

2.1.1.3. Minipréparation d'ADN plasmidique

Le protocole suivi est celui du kit Nucleospin® (Marcherey-Nagel). Il permet de purifier environ 20 µg d'ADN plasmidique.

2.1.1.4. Restriction d'ADN

Le clivage de l'ADN bicaténaire en des sites précis se fait au moyen d'endonucléases de restriction qui reconnaissent de courtes séquences nucléotidiques souvent palindromiques.

Mode opératoire

- x µl d'ADN à restreindre en suspension dans de l'eau distillée
- Ajouter 1/10ème de tampon de restriction 10x associé à l'enzyme
- l'enzyme de restriction doit constituer au maximum 1/10ème du volume final. Il convient d'utiliser entre 2 et 10 unités d'enzyme par µg d'ADN (1 unité correspondant à la quantité d'enzyme nécessaire pour restreindre complètement 1µg d'ADN du phage λ en 1 heure à 37°C dans un volume de 25 µl)
- Amener au volume final avec de l'eau distillée stérile
- Incuber le mélange au minimum 1 heure 30 (pour l'ADN plasmidique) ou une nuit (pour l'ADN génomique) à la température optimale pour l'enzyme (souvent 37°C).

2.1.1.5. Amplification par PCR

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

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

Le Tm (température d'hybridation) se calcule de la façon suivante : Tm= 4(G+C) + 2(A+T) (4°C sont comptabilisés pour les bases G et C et 2°C pour les bases A et T).

Mode opératoire

Mélange de réaction réalisé dans un microtube:

- ADN (1-10 ng)	1 µl
- Tampon d'ADN polymérase 10X + $MgCl_2$	5 µl
- dNTP (5 mM chacun)	2 µl
- Primer 1	0.1-0.6 µM
- Primer 2	0.1-0.6 µM
- Polymérase (2 U/µl)	0.5-1µl

- Porter à 50 µl avec de l'eau distillée stérile.

- Programmer l'appareil comme suit :
- Dénaturation de 2 minutes à 95°c
- Environ 25 cycles d'amplification divisés en 3 étapes:
  * 30 sec. à 95 °C pour la dénaturation
  * 30 sec. à 52-65 °C pour l'hybridation
  * 30 sec. à 72°C pour un amplicon d'environ 0,5kb
- Elongation finale de 6 minutes à 72°C

Amplicons	Couples de primers	Séquences
Régions "amont"		
PEI^{ntr}	FP ptsEI	5'-CCATCACCACGTCGGAAA-3'
	RP ptsEI	5'-AATTCCCCCGGGGAGATCTCCGTTGTCAGCTCACGCATT-3'
$PEIIA^{m}$	FP mEIIA	5'-GAGCGCTGGATATTTGAA-3'
	RP mEIIA	5'-ATTCCCCCGGGGAGATCTCCATTTGTCAAAAGTAGAGGACAA -3'
$PEIIA^{ntr}$	FP ntrEIIA	5'-GACCCGGCTTCGCCGTTA -3'
	RP ntrEIIA	5'-AATTCCCCCGGGGAGATCTCCGCTGAATCAGATCGCTAA -3'
PNPr	FP npr	5'-GCACGCGACGGGAGCTTT -3'
	RP npr	5'-AATTCCCCCGGGGAGATCTCCGTCACACTCGCATGCATA -3'
PHprK/P	FP nprK	5'- CGAAGTGCGGCGCAACAA-3'
	RP nprK	5'-AATTCCCCCGGGGAGATCTCCCGCGCCATAGAAGCTTTT -3'
Régions "aval"		
TEI^{ntr}	FT ptsEI	5'-GGAGATCTCCCCGGGGGAATTGCGCATTCCTTGCGCGAA -3'
	RT ptsEI	5'-GCACCGCGATGCGCTTTT -3'
$TEIIA^{m}$	FT mEIIA	5'-GGAGATCTCCCCGGGGGAATTCAGGTCCTGACAGGAAAA -3'
	RT mEIIA	5'-ACGCCTGCGTGAGGGAAA -3'
$TEIIA^{ntr}$	FT ntrEIIA	5'-GGAGATCTCCCCGGGGGAATTGCGCAGGCCCTCTATTCA -3'
	RT ntrEIIA	5'-GGACAATGAAGCTCTGAA -3'
TNPr	FT npr	5'-GGAGATCTCCCCGGGGGAATTGACAGGTTCGGCGAGGAA -3'
	RT npr	5'-CCAATCGGCCAGGCTAAT -3'
THprK/P	FT nprK	5'-GGAGATCTCCCCGGGGGAATTCGCGCCATAGAAGCTTTT -3'
	RT nprK	5'-TCACGCCCCTGCCGCTAT -3'

Tableau 1. Oligonucléotides utilisés au cours de ce mémoire.

Après la PCR, les fragments d'ADN obtenus sont purifiés à l'aide du kit de purification "Rapid PCR purification system" de GibcoBRL (Invitrogen).

Les amorces utilisées au cours de ce travail sont reprises au tableau 1.

2.1.2. Extraction d'ADN genomique de Brucella sp

Mode opératoire

- En utilisant une anse, prélever des bactéries sur milieu solide et les resuspendre dans 567 µl de TENa (en eppendorf).
- Ajouter 30 µl de SDS 10% et 3 µl de protéinase K à 20 mg/ml.
- Homogénéiser en inversant doucement l'eppendorf et incuber à 37°C pendant 1 heure.
- Ajouter 600 µl de phénol saturé en chloroforme et agiter fortement l'eppendorf.
- Centrifuger 20 minutes à 4 °C à 14000 rpm.
- Récupérer la phase aqueuse supérieure sans emporter le voile à l'interface.
- Ajouter 80 µl de $NaClO_4$ 5M et 600 µl de chloroforme, agiter fortement.
- Centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 14000rpm.
- Récupérer la phase aqueuse et ajouter 1 ml d'éthanol 100% (à -20°C).
- Mélanger en inversant l'eppendorf.
- Centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 14000rpm.
- Eliminer le surnageant et ajouter 1 ml d'éthanol 70% (à -20°C).
- Centrifuger 10 minutes à 14000rpm et éliminer le surnageant.
- Sécher sous vide et resuspendre dans 50 à 100 µl d'eau distillée stérile.
- Pour faciliter la resuspension, incuber l'eppendorf à 37°C.

2.1.3. Sequençage de l'ADN

Le principe est une élongation d'ADN à partir d'une amorce oligonucléotidique avec assimilation de didéoxyribonucléotides fluorescents. Chacun de ces nucléotides possède son marquage propre (sa longueur d'onde d'émission), ce qui rend possible la lecture à partir d'une seule réaction PCR par un séquenceur automatique.

La réaction de séquencage est basée sur le principe de Sanger (1977). L'incorporation des didéoxyribonucléotides arrête la réaction de polymérisation ce qui permet d'obtenir un population de brins tronqués dont la taille et le signal fluorescent permettent l'identification de la séquence de l'ADN "template".

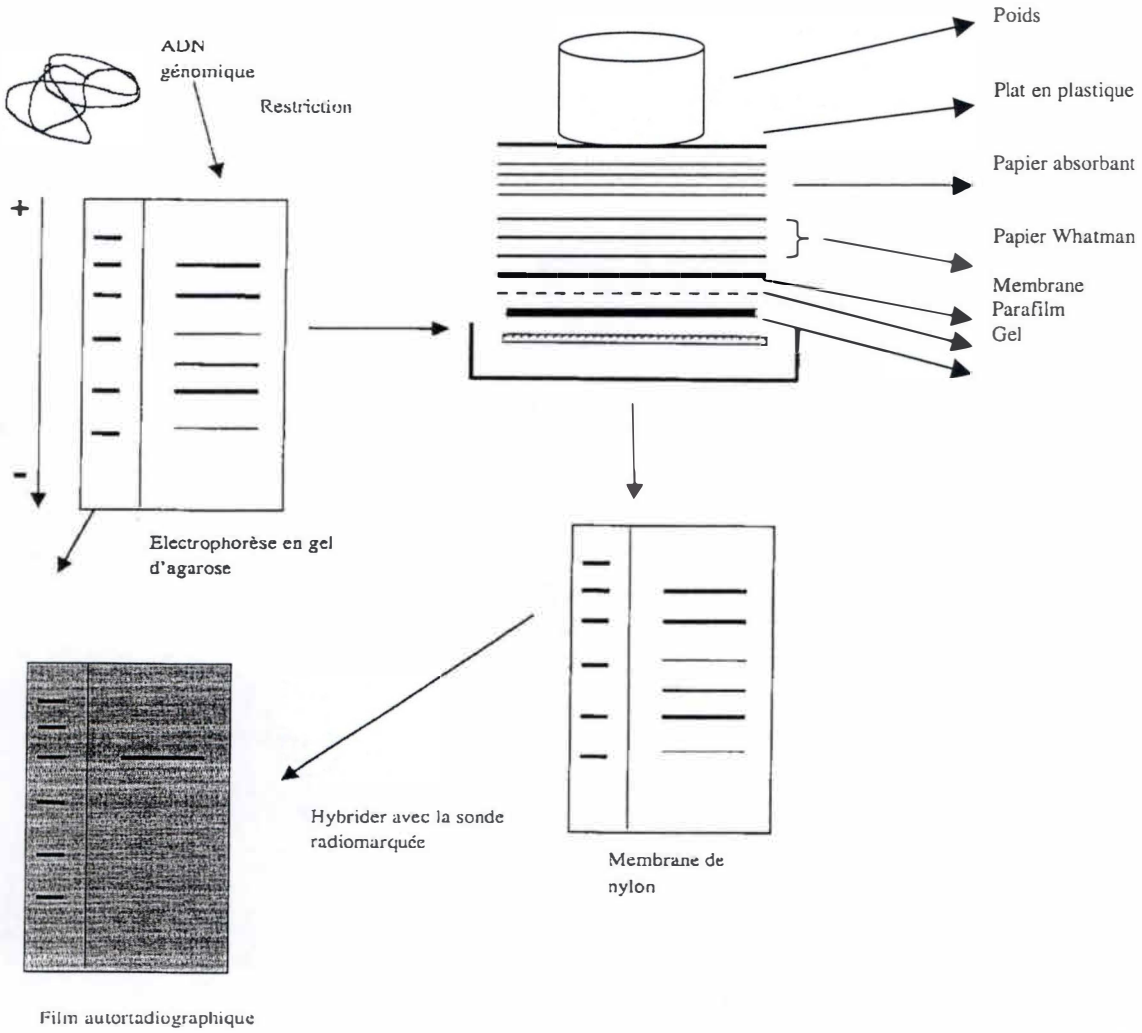


Fig. 14. Schéma de la technique de Southern blot

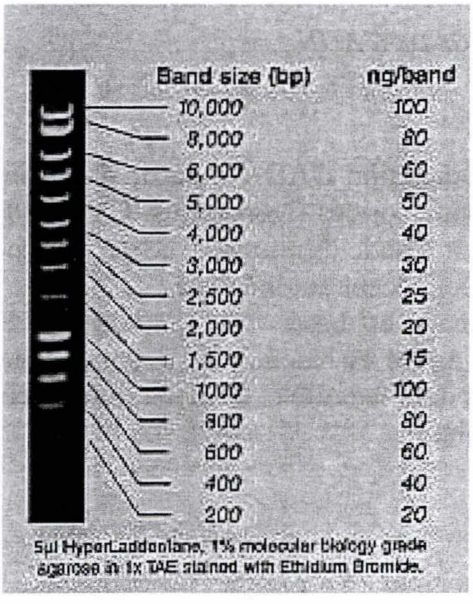


fig.15. Marqueur de taille moléculaire utilisé pour les gels d'agarose : «HyperLadder» (Bioline)

2.1.4. ANALYSE PAR SOUTHERN BLOT

Le Southern blot est une technique d'identification et de localisation de séquences spécifiques d'ADN (fig. 14). Elle tire parti de la propriété qu'a l'ADN de former des structures en duplex stables, cette stabilité étant en relation directe avec la complémentarité des deux brins d'ADN. Le procédé utilise des sondes d'ADN marquées radioactivement qui vont s'hybrider avec les séquences d'intérêt.

La sonde hybridée au fragment d'ADN recherché est décelée par autoradiographie sur une membrane de nylon. La taille du fragment hybridé peut être évaluée grâce à la migration en parallèle d'une échelle de poids moléculaire.

a) Restriction de l'ADN génomique

- Prélever 6 µl d'ADN génomique resuspendu dans de l'eau distillée.
- Ajouter 1 µl d'enzyme concentré (*Hind*III et *Eco*RV)
- Ajouter 1/10^{e} du volume de tampon de restriction 10x associé à l'enzyme.
- Mettre à volume avec de l'eau distillée stérile.
- Incuber une nuit à 37 °C.

b) Electrophorèse en gel d'agarose

La séparation des fragments d'ADN restreints est réalisée dans un gel d'agarose de 0,8%. Le marqueur de taille HyperLadder (Bioline) est utilisé pour évaluer la taille des fragments de restriction (fig. 15).

c) Transfert et immobilisation

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

Mode opératoire

- Après l'électrophorèse, placer le gel d'agarose sous UV pendant 3 à 5 minutes. Les UV clivent l'ADN et facilitent ainsi le transfert.
- Immerger le gel dans la solution de dénaturation pendant 2x 20 minutes, sous faible agitation.
- Immerger le gel dans la solution de neutralisation pendant 2x 20 minutes, sous faible agitation.
- Découper un morceau de membrane de nylon (Porablot *NY* membrane) chargée positivement et de taille un peu supérieure à celle du gel.
- Par un montage de transfert, l'ADN est transféré sur la membrane en présence de SSC 20X une nuit (fig. 14).
- Après le transfert, sécher la membrane entre deux feuilles de papier Whatman 3 MM.
- Incuber la membrane à 80°C pendant 120 minutes et immobiliser l'ADN sur la membrane en l'exposant aux UV pendant 30 secondes.

d) Préhybridation

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

e) Marquage de la sonde et hybridation

Le fragment d'ADN utilisé comme sonde est dénaturé et mis en présence d'oligonucléotides aléatoires. Une synthèse d'ADN est initiée par la polymérase Klenow, en incorporant de l'ATP, du GTP et du TTP froids ainsi que de l'[α-^{32}P]dCTP.

La sonde est réalisée au moyen du kit "Rad prime label system" (Invitrogen). L'[α-^{32}P]dCTP (10 mCi/ ml, 3000 Ci/ mmol) vient de Amersham Pharmacia Biotech.

Mode opératoire

- Porter environ 25 µg d'ADN sonde à un volume final de 21 µl avec de l'eau stérile.
- Faire bouillir pendant 5 minutes, centrifuger brièvement puis conserver sur glace.
- Ajouter 1 µl de dATP, dGTP, dTTP et 20 µl de tampon contenant les "random primers" (solution 2.5x).
- Ajouter 5 µl d'[α-^{32}P]dCTP.
- Ajouter 1 µl de Klenow et centrifuger brièvement.
- Incuber 10 min. à 37 °C.

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

f) Détection et révélation

La membrane est lavée deux fois, 10 minutes, avec une solution de SSC 2X/SDS 0.1 %. La membrane est ensuite placée, sous farde plastique, dans une cassette avec un film autoradiographique (Fuji Medical X-Ray Film). La cassette est maintenue à –80 °C pendant au moins cinq heures. Ensuite, le film autoradiographique est immergé dans une solution de révélation pendant 10-15 secondes. Quand les bandes sont révélées, le film est rinçé dans de l'eau, puis trempé dans une solution de fixation.

2.1.5. CLONAGE GATEWAY™

Ce système se base sur le processus de recombinaison du phage *Lambda* dans le génome d'*E. coli*. La réaction d'intégration (appelée réaction BP) se déroule entre deux séquences d'ADN spécifiques : le site attP situé dans l'ADN du phage et le site attB localisé dans le génome bactérien. Cette réaction d'intégration fait appel à deux enzymes: l'intégrase du phage (produit du gène Int) et une protéine bactérienne IHF (Integration Host Factor) et est

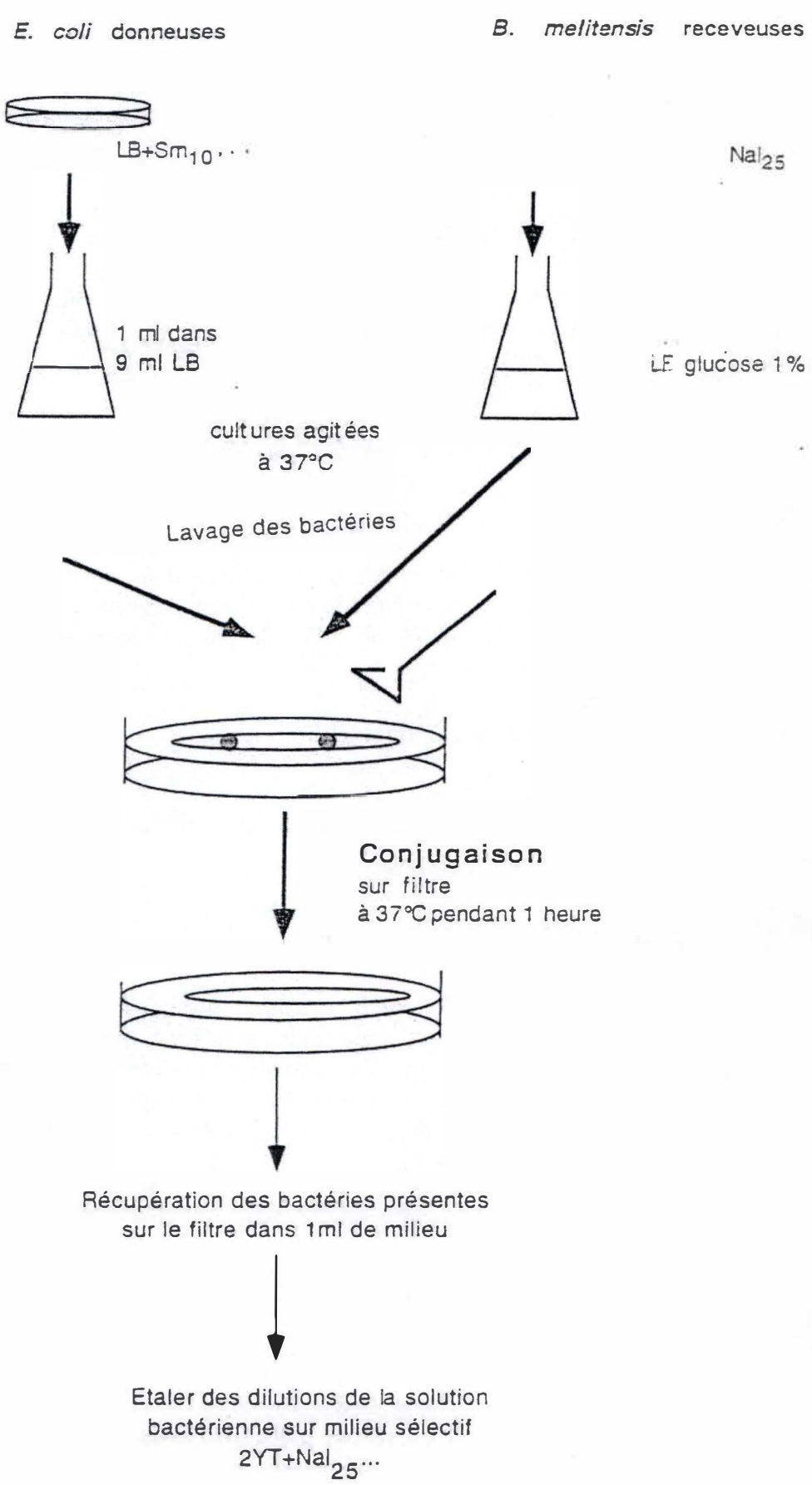


Fig. 16. Protocole du transfert conjugatif de plasmide entre une souche d'*E. coli* donneuse et une souche de *Brucella* receveuse.

réversible. Le phage peut exciser son ADN de celui d'*E. coli* (réaction LR) par recombinaison entre les sites attL et attR. Cette réaction nécessite l'intégrase et la IHF, mais aussi l'excisionase (produit du gène Xis du phage). Ce système a été adapté au clonage en laboratoire. La sélection des clones recombinants se fait généralement par la disruption d'une cassette contenant le gène suicide *ccdB*, toxique pour certaines souches d'*E. coli*.

Réaction BP artificielle	**Réaction LR artificielle**
- 1 µl (150 ng) de pDONR201 restreint par *Nco*I,	- 3 µl de vecteur d'entrée,
- 3 µl de réaction PCR du gène d'intérêt,	- 3 µl de vecteur de destination,
- 2 µl de tampon de dilution BP,	- 2 µl de tampon de dilution LR,
- 2 µl d'enzyme clonase BP,	- 2 µl d'enzyme clonase LR.
- 2 µl d'H_2O distillée.	
- Placer à 25 °C de 2 à 24h, puis stopper la réaction en incubant 10 min. à 37°C avec 2 µl de protéinase K.	- Placer à 25 °C de 2 à 24h.

2.1.6. CONJUGAISON BACTÉRIENNE

La conjugaison (fig. 16) est un transfert de matériel génétique dans lequel la bactérie donneuse transfère un plasmide conjugatif vers une bactérie receveuse. La conjugaison se fait, moyennant un contact entre bactéries, via un pilus sexuel. Le transfert conjugatif commence à un site d'origine de transfert reconnu par la machinerie de transfert sur le plasmide conjugatif.

Le plasmide transféré lors de ce travail est le pSK*oriTcat*. Les contrôles de résistance antibiotique utilisés sont les suivants : les bactéries donneuses (*E. coli*) sont étalées sur un milieu sélectif contenant de l'acide nalidixique et les *Brucella* (NalR) receveuses sont étalées sur un milieu additionné de l'antibiotique auquel résistent les *E. coli* donneuses (dans ce cas-ci, le chloramphénicol et la kanamycine)

Mode opératoire

- Préparer une préculture d'*E. coli S17*-1 ($RP4^+$) donneuses contenant le plasmide à transférer (dans du LB + antibiotique), ainsi qu'une culture de *Brucella* receveuses (dans du 2YT + NaI).
- Après une croissance à 37°c durant une nuit, inoculer une culture de E.coli dans du LB + antibiotique avec 1/10 de la préculture. Laisser pousser à 37°C quelques heures.
- Avant la conjugaison, laver les bactéries pour éliminer les antibiotiques du milieu de cuture en centrifugeant 15 minutes à 4000 rpm, et en resuspendant le culot bactérien dans 1/10 du volume de départ de milieu sans antibiotique.
- Placer un filtre stérile 0,22 µm de 42 mm de diamètre sur une boîte de pétri contenant du 2YT, y déposer 80 µl de culture de *B. melitensis* et 80µl d'*E.coli S17*-1 lavées et resuspendues.
- Mélanger et étaler les bactéries sur la totalité du filtre à l'aide d'une anse.
- Laisser incuber au moins 1 heure à 37°C.
- Récupérer les bactéries sur le filtre dans 1 ml de milieu 2YT.
- Etaler sur un milieu 2YT sélectif.

- Incuber 3-4 jours à 37°C et repiquer les clones obtenus sur milieu 2YT sélectif.

2.2. Techniques relatives à l'utilisation des levures

2.2.1. TEST D'INTERACTION PROTÉIQUE EN DOUBLE-HYBRIDE

La réalisation d'un test double-hybride nécessite la construction d'un plasmide "appât" encodant le produit de la fusion traductionnelle entre le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (BD) et l'ORF d'intérêt Y, ainsi que la construction d'un plasmide "proie" encodant le domaine d'activation de *Gal 4* (AD) fusionnée elle-même à l'ORF d'intérêt X. Ces plasmides sont transformés dans deux souches de levure haploïdes de type conjugatif différent possédant un ou plusieurs gènes rapporteurs sous le contrôle du promoteur cible du BD. Ces deux plasmides doivent être porteurs de marqueurs d'auxotrophie différents pour permettre la sélection des transformants sur un milieu sélectif. La réplique sur velours permet alors le croisement nécessaire à l'obtention de diploïdes possédant les deux vecteurs d'intérêt. La présence des deux plasmides dans une seule souche est sélectionnée chez une levure, grâce à sa capacité à croître sur milieu nécessitant l'expression des marqueurs d'auxotrophie des deux plasmides. En pratique, l'interaction entre les fusions BD-Y et AD-X est mise en évidence par l'expression de deux gènes rapporteurs (*HIS3* et *lacZ*). Une interaction est donc visualisée par la capacité de la souche à pousser sur un milieu sans histidine, ou à produire une réponse positive dans un test de coloration β-Gal.

2.2.2. TRANSFORMATION PAR CHOC THERMIQUE

-Inoculer 50 ml de YPD avec une colonie isolée (*MAV103* ou *MAV203)* obtenue sur milieu solide.
-Incuber une nuit à 30°C sous agitation.
-Diluer la préculture dans 200 ml de YPD pour obtenir une DO comprise entre 0.2-0.3.
-Incuber à 30°C sous agitation afin d'atteindre une DO comprise entre 0.7 et 0.8.
-Effectuer 2 lavages avec 1/10^{e} de volume de culture (20ml) d'eau.
-Effectuer un lavage avec 1/10^{e} de volume (20ml) de TE/LiAc.
-Resuspendre le culot dans du TE/LiAc pour concentrer les cellules 100X (2ml).
Toutes les centrifugations pour les lavages durent 3 minutes à une vitesse de 6000 rpm et à température ambiante.
Pour chaque transformation, dans un tube Eppendorf stérile, déposer :

- 1µg d'ADN (5-10 µl),
- 25µg de "DNA carrier" dénaturé préalablement dans de l'eau à 100°C pendant 5 minutes,
- 50 µl de cellules,

- 300 µl du mélange PEG/TE/LiAc préparé extemporanément.

-Vortexer et incuber 30 à 40 minutes à 30°C, puis 20 minutes à 42°C en agitant toutes les demi-heures.
-Centrifuger 1 minute à 10000 rpm.
-Resuspendre le culot dans 200 µl d'eau stérile.
-Etaler sur milieu sélectif et incuber à 30° pendant environ 3 jours.

2.2.3. TECHNIQUE DE LA RÉPLIQUE SUR VELOURS

Cette technique de dépôt de cellules sur boîte de Pétri permet de répliquer un nombre important de colonies. Le milieu solide (en boîte de Pétri) portant des colonies est amené au contact d'un velours stérile de sorte que des cellules de chaque colonie s'y déposent. Un contact entre ce velours et un autre milieu solide coulé en boîte de Pétri entraîne le dépôt de cellules sur le milieu. L'ordre des colonies reste identique sur les deux boîtes de Pétri.

2.2.4. COLORATION X-GAL EN SURCOUCHE

-Préchauffer un bain-marie à 50°C.
-Préparer 5 ml d'agarose 1% dans de l'eau stérile et porter à ébullition, puis refroidir à 50°C.
-Préchauffer à 50°C dans le bain-marie 5 ml de tampon K-PO_4 pH 7,0 1M.
-Mélanger la solution d'agarose et le tampon K-PO_4, et conserver à 50°C.
-Ajouter 0,1 ml de SDS 10%.
-Ajouter 0,5 ml de NN' diméthylformamide (DMF).
-Ajouter 0,2ml de X-Gal 2% dans du DMF.
-Mélanger et couler une surcouche de 10 ml sur la boîte à colorer.
-Attendre la solidification puis incuber une nuit à 30°C.

Résultats

RESULTATS

1. ANALYSE GÉNOMIQUE DU SYSTÈME PTS CHEZ *B. MELITENSIS* 16M

1.1. Recherche des différents acteurs impliqués dans les systèmes PTS chez *B. melitensis* 16M

Le recensement de tous les mutants de *Brucella* décrits dans la littérature (Delrue *et al.*, 2004) montre l'importance des métabolismes azoté et carboné pour la réplication intracellulaire de *Brucella*. En fait, environ un tiers des gènes mutés répertoriés sont impliqués dans le métabolisme des acides aminés ou des sucres. Certains de ces gènes interviennent dans la régulation de ce métabolisme nutritionnel. C'est ainsi que deux partenaires potentiellement impliqués dans la voie des systèmes PTS ont été identifiés. Il s'agit de l'ORF BMEI0190 annotée "phosphoenolpyruvate phosphotransferase" qui correspond à l'enzyme EI^{ntr} et de l'ORF BMEI 1786 annotée "nitrogen regulatory protein IIA" qui correspond à $EIIA^{ntr}$. L'atténuation de la virulence de ces deux mutants pose la question de l'existence d'un système de transduction du signal PTS fonctionnel chez *B. melitensis* impliqué dans la régulation de la pathogénicité de cette bactérie.

Pour reconstituer le système PTS de *Brucella*, nous avons utilisé le site web KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (http://www.genome.ad.jp/kegg/). Ce site regroupe toutes les connaissances actuelles sur les réseaux d'interactions moléculaires impliqués dans les processus biologiques et permet de relier le produit de chaque gène à une voie métabolique donnée. Nous avons ainsi comparé (Tableau 2) les structures des systèmes PTS de toutes les α-protéobactéries entre elles, mais également avec *E. coli* et *B. subtilis*.

A l'exception de *Caulobacter crescentus* et de *Mesorhizobium loti* qui présentent une perméase de la famille du glucose et du glucitol respectivement, aucune des α-protéobactéries dont les données métaboliques sont disponibles sur le site web KEGG (telles que *Agrobacterium tumefasciens, Brucella suis, B. melitensis, Bradyrhizobium japonicum, Sinorhizobium meliloti)* ne possède d'enzyme EIIB ni de perméase EIIC.

Brucella n'a pas toutes les protéines caractérisant un système PTS complet classique. Ainsi, aucun gène codant pour des perméases ou pour des enzymes EIIB, ni de séquence codant pour l'enzyme EI classique n'ont été identifiés dans le génome de *B. melitensis* 16M. Par contre, le génome de *Brucella* contient un gène encodant une EI^{ntr} (BMEI0190), un autre encodant une protéine annotée Hpr (BMEI2031), deux gènes encodant des enzymes EIIA, l'une de la famille du mannose (BMEI 2032) et l'autre du métabolisme azoté (BMEI 1786), et un dernier gène encodant une kinase de Hpr (BMEI2034).

Les enzymes générales EI et HPr

Organisme	EI	HPr
B. melitensis	BMEI0190	BMEI2031
B. suis	BR1870	BR2095
A. tumefasiens	Atu4173	Atu0030
M. loti	mll5291	Msl5292
	mll3436	msl5090
S. meliloti	SMc02437	SMc02754
B. japonicium	blr0217	blr8148
C. crescentus	CC0849	CC0241

La famille du Glucose

Organisme	EI	HPr	EIIA	EIIB	EIIC
C. crescentus	-	-		CC0449 CC0538	
	CC0448 CC0537				

La famille du Mannose

Organisme	EIIA	EIIB	EIIC
B. melitensis	BMEI2032	-	-
B. suis	BR2094	-	-
A. tumefasiens	Atu0031	-	-
M. loti	mll5091	-	-
S. meliloti	SMc02753	-	-
B. japonicium	blr8147	-	-
C. crescentus	CC0240	-	-

La famille du Fructose

Organisme	EIIA	EIIB	EIIC
B. melitensis	BMEI1786	-	-
B. suis	BR0161	-	-
A. tumefasiens	Atu0330	-	-
M. loti	mll3194	-	-
S. meliloti	SMc01141	-	-
B. japonicium	blr0725	-	-
C. crescentus	CC3596	-	-

La famille du Glucitol

Organisme	EIIA	EIIBC	
M. loti	mll3610	mll3614	mll3613

Tableau 2. Comparaison des structures des systèmes PTS des α-protéobactéries.D'après le site web KEEG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (http://www.genome.ad.jp/kegg/).

L'absence de certains partenaires PTS ne préjuge en rien de la non fonctionnalité du système chez *Brucella*. Nous avons signalé dans l'introduction que certaines bactéries dépourvues de perméases ont conservé des intermédiaires PTS qui joueraient un rôle dans une voie de transduction du signal qui ne serait plus couplée à l'entrée et à la phosphorylation d'un sucre. A notre connaissance, aucune donnée n'est actuellement disponible sur la fonctionnalité, l'architecture et le(s) rôle(s) de tels systèmes PTS incomplets. Même si l'existence de mutants atténués est un indice de la fonctionnalité de ce système, une confirmation supplémentaire pourrait venir de la comparaison bioinformatique des séquences de *Brucella* et de leur locus génomique avec les séquences et locus correspondant de bactéries phylogénétiquement proches ou de bactéries modèles.

1.2. Analyse bioinformatique des séquences de *Brucella* et de leur locus

Dans le but d'évaluer la pertinence des différentes séquences codantes considérées ci-dessus, nous les avons analysées au moyen des sites suivants : la banque de données de *B. melitensis* (http://serine.urbm.fundp.ac.be/~seqbruce/GENOMES/Brucella_melitensis), le site de la rhizobase (http://www.kazusa.or.jp/rhizobase), le site ClustalW (http://ca.expasy.org/cgi-bin/hub) et le site de recherche CDD (Conserved Domain Database) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/Structure/cdd/wrpsb.cgi).

1.2.1. EI^{NTR} (BMEI0190)

Bien que certaines bactéries telles qu'*E. coli* possèdent plusieurs paralogues de l'enzyme EI, *B. melitensis* ainsi que toutes les α-protéobactéries, à l'exception de *C. crescentus* et *M. loti*, n'en présentent qu'un seul, annoté EI^{ntr}. Celui-ci est différent de l'enzyme I classique (1725 nucléotides) car il présente une taille plus importante (2271 nucléotides). Le Blast et la vérification par un alignement multiple démontrent que cette protéine appartient au système PTS impliqué dans le métabolisme azoté (EI^{ntr}). C'est la conservation de plusieurs résidus typiques à deux endroits distincts de leur séquence (autour du site actif contenant l'histidine phosphorylable, mais également dans une région éloignée, de fonction inconnue, en aval de ce site actif) (Rabus *et al.*, 1999) qui permet la distinction entre les enzymes EI^{ntr} et EI classique.

La protéine de *B. melitensis* présente les motifs typiques de EI^{ntr}. En effet, l'analyse des domaines protéiques révèle que l'enzyme EI de *B. melitensis* se distingue de EI classique par la présence d'un domaine senseur supplémentaire « NifA-like[6] » au niveau de son extrémité

[6] Le domaine NifA est un domaine requis pour l'activation de la plupart des opérons *nif* qui sont impliqués directement dans la fixation de l'azote. Il interagit avec le facteur σ54 Martinez-Argudo, I., Little, R., Shearer, N., Johnson, P. & Dixon, R. The NifL-NifA System: a multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals. *J Bacteriol* **186**, 601-10 (2004)..

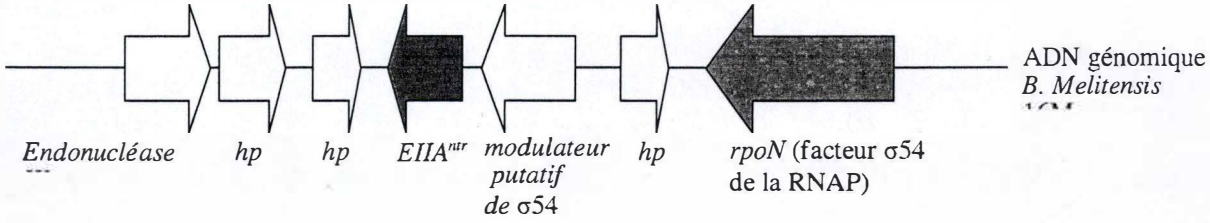


Fig. 17. Organisation génomique du locus *rpoN* chez *B. melitensis* 16M. *hp*: hypothetical protein

Fig. 18. Organisation génomique des ORFs *NPr*, *EIIA*^{m} et *HprK/*.
bvrS/R = *Brucella* virulence regulator sensor/regulator; *PCK* = phosphoénolpyruvate carboxykinase.

amino-terminale. Ce domaine, homologue à la famille des domaines senseurs GAF[7], est typique de EI^{ntr} et, de ce fait, typique du métabolisme azoté. Son rôle serait de détecter un ligand qui contrôle l'activité de transfert d'un groupement phosphate par l'enzyme EI^{ntr}.

1.2.2. $EIIA^{NTR}$ (BMEI1786)

C'est en aval du gène *rpoN*, qui encode le facteur σ54, que l'on retrouve le gène (BMEI1786) homologue au gène *ptsN* chez *E. coli* et qui encode la protéine $EIIA^{ntr}$ (fig. 17). Ce gène apparaît chez toutes les α-protéobactéries mais ne présente cette organisation en aval de *rpoN* que chez *M. loti*, *S. meliloti* et *B. melitensis* (Michiels *et al.*, 1998). La protéine $EIIA^{ntr}$ possède des orthologues chez toutes les α-protéobactéries mais également chez beaucoup d'autres bactéries telles qu'*E. coli* par exemple.

La protéine $EIIA^{ntr}$ de *B. melitensis* 16M présente une forte homologie avec la famille PTS des protéines EIIA spécifiques du mannitol et du fructose ($EIIA^{mtl}$) (Reizer *et al.*, 1992). Le site de phosphorylation de $EIIA^{mtl}$ (His-65) et le site actif $EIIA^{mtl}$ (Arg49) sont extrêmement similaires à leur équivalent chez $EIIA^{ntr}$ (His73 et Arg57) (Rob & Dijkstra, 1998). La différence entre ces deux protéines réside au niveau du second site actif nécessaire à la transmission du groupement phosphate vers les domaines EIIB. Ces sites font intervenir un autre résidu histidine (His-120) localisé à des endroits opposés sur les deux protéines (Rob & Dijkstra, 1998). Cette différence de position de l'histidine empêche $EIIA^{ntr}$ de phosphoryler les composants IIB.

1.2.3. HPR (BMEI2031), $EIIA^{M}$ (BMEI2032) ET HPRK/P (BMEI2034)

Les trois dernières ORF identifiées chez *B. melitensis* 16M présentent la particularité de se situer à proximité l'une de l'autre (fig. 18). Cette organisation génomique est conservée chez toutes les α-protéobactéries (Boel *et al.*, 2003), (Hu and Saier, 2002)). Il semble raisonnable de penser qu'au moins deux de ces ORF (*HPr* et $EIIA^{m}$) s'organisent en une structure opéronique puisque la distance qui les sépare est très faible (6 bases entre *Hpr* et $EIIA^{m}$). De plus, chez toutes les α-protéobactéries, on retrouve en amont de cet opéron deux ORF encodant des protéines non PTS d'un système à deux composants de la famille EnvZ/OmpR (appelé BvrR/BvrS chez *Brucella*). Ce SDC constitué de ChvG (régulateur de réponse) et de ChvI (histidine kinase) chez *A. tumefasciens* est impliqué dans la virulence (l'inactivation de ChvG ou de ChvI empêche la formation des tumeurs chez les plantes infectées) (Charles and Nester, 1993). Chez *B. abortus,* le système BvrR/BvrS est également impliqué dans la virulence : des mutants *bvrS* ou *bvrR* sont atténués en modèle murin et sont

[7] Le domaine GAF a été découvert chez les vertébrés où il joue un rôle dans la photoréception et la transduction du signal lumineux au niveau des bâtonnets de l'oeil. Il a par la suite été découvert chez des plantes ainsi que chez d'autres organismes non-photosynthétiques où il exerce vraisemblablement un rôle de domaine senseur. Il a été nomé G.A.F car des copies en tandem ont été detectées sur la phosphodiestérase spécifique du GMPc, sur l'Adénylate cyclase d'*Anabaena* et sur la protéine FhlA de *E. coli* Aravind, L. & Ponting, C. P. The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci* **22**, 458-9 (1997)..

Fig. 19. Alignement multiple de la séquence des protéines HPr des α-protéobactéries, des protéines Hpr et Npr des autres bactéries à Gram – et de la protéine Hpr des bactéries à Gram +. Le nom des bactéries est indiqué dans la colonne de gauche. On y retrouve en bleu la protéine HPr des bactéries à Gram + (Bha: *Bacillus halodurans*; Bsu: *B. subtilis*; Sau: *Staphylococcus aureus*; Lmo: *lysteria monocytogenes*; Spy: *Streptococcus pyogenes*; Spneu: *Streptococcus pneumoniae*), en rouge, les protéines HPr des α-protéobactéries (Bme: *B. melitensis*; Bsui: *B. suis*; Atum: *A. tumefasiens*; Smeli: *S. meliloti*; Rlot: *M. loti*; Bjap: *B. japonicum*; Ccre: *C. crescentus*), en vert, les protéine HPr des bactéries à Gram – (Ecol: *E. coli*; Sfl: *Shigella flexneri*; Ypes: *Yersinia pestis*; Sty: *Salmonella typhi*; Hinf: *Haemophilus influenzae*; Pmul: *Pasteurella multocida*) et enfin en mauve, les protéines NPr des bactéries à Gram – (Saty: *Salmonella typhimurium*; Shev: *Shwanella violacea* ; Vipa: *Vibrio parahemoleticus*). Au sein de l'alignement multiple, les acides aminés (aa) communs à toutes les bactéries sont en gras, les aa communs aux protéines HPr des α-protéobactéries et au protéines NPr des bactéries à Gram – sont en vert, les aa communs aux protéines HPr des α-protéobactéries et à l'HPr des bactéries à Gram + sont en bleu et enfin, les aa communs aux HPr des α-protéobactéries et aux HPr des autres bactéries à Gram – de ce tableau sont en rouge.

déficients lors de l'invasion cellulaire (Sola-Landa *et al.*, 1998). Le système BvrR/BvrS régule l'expression de plusieurs protéines de la membrane bactérienne et vraisemblablement la structure du lipide A (Moreno and Moriyon, 2002). En outre, plus en amont de cet opéron, un autre gène dont la fonction pourrait être liée aux systèmes PTS a été identifié. Ce gène code pour une phosphoénolpyruvate carboxykinase (*pcK*) qui catalyse de façon réversible la formation du PEP par décarboxylation de l'oxaloacétate, et hydrolyse de l'ATP. L'organisation de toute cette région, particulièrement bien conservée chez les α-protéobactéries, semble traduire un lien entre les systèmes PTS et les homologues BvrR/BvrS (Boel *et al.*, 2003).

La description des partenaires impliqués dans ce locus génomique est présentée ci-dessous.

On retrouve, localisée le plus en amont, l'ORF encodant la protéine Hpr. Cette protéine possède de nombreux orthologues tant chez les α-protéobactéries comme par exemple *A. tumefasciens* (E=5^{e}-31) et *S. meliloti* (E= 3^{e}-31) que chez des bactéries phylogénétiquement plus distantes.

Rabus et Saier (1999) ont défini sur base de la conservation de motifs consensus, les différences existant entre la protéine Npr et son homologue HPr. Sur cette base, nous avons comparé par alignement multiple la séquence des protéines HPr de toutes les α-protéobactéries avec celle des protéines Hpr et Npr des autres bactéries à Gram -, mais également avec la séquence de la protéine Hpr des bactéries à Gram + (fig. 19). Les résultats de cet alignement multiple suggèrent qu'il existe une erreur d'annotation de la protéine Hpr dans le génome de *Brucella* ainsi que chez toutes les autres α-protéobactéries. En effet, des acides aminés caractéristiques des protéines Npr (NKxGxHAR...K) et non des protéines Hpr ((Rabus *et al.*, 1999)) sont retrouvés autour du résidu histidine phosphorylable conservé. De plus, une seconde région, située aux alentours de la sérine phosphorylable conservée (S(V/I)xL(L/M)ML), est également typique de Npr et clairement distincte de Hpr (SLFKLQTL). En outre, l'extrémité carboxy-terminale de cette protéine est plus longue que pour les homologues HPr et possède un motif FxE caractéristique des protéines Npr. Enfin et comme indiqué par Boël et Deutscher (2003), le consensus formé par les résidus localisés autour de la sérine conservée ressemble davantage au consensus retrouvé chez les homologues Hpr des bactéries à Gram + qu'à celui des homologues Hpr des bactéries à Gram-. Rappelons que la phosphorylation du résidu sérine de Hpr par la HprK/P est un événement caractéristique de la RCC chez les bactéries à Gram +. Cette fonction pourrait être assurée par la kinase HprK/P encodée en aval de *Hpr* (voir ci-dessous).

Toutes ces données suggèrent que la protéine Hpr présente dans le génome de *Brucella* ainsi que chez toutes les autres α-protéobactéries a été mal annotée et constitue un excellent candidat Npr. Par conséquent, dans la suite de ce manuscrit, le nom Npr sera utilisé en lieu et en place de Hpr pour l'ORF BMEI2031.

L'ORF (BMEI2032) encodant la protéine $EIIA^{m}$ est la seconde séquence codante caractérisant le locus. Cette enzyme EIIA appartient à la famille du mannose. Dans le contexte classique, cette famille présente la particularité d'impliquer trois protéines : EIIAB, EIIC et EIID. Dans la plupart des génomes où l'on retrouve des membres appartenant à cette famille, il existe un gène unique encodant une protéine présentant les deux domaines fusionnés EIIAB. Par contre, chez *B. melitensis*, on ne retrouve qu'une protéine formée seulement du domaine IIA. Malgré cette différence, la conservation de cette protéine $EIIA^{m}$ chez toutes les α-protéobactéries ainsi que la conservation du locus génomique nous laisse penser qu'elle assure une fonction bien que celle-ci soit actuellement inconnue.

La dernière ORF impliquée dans le système PTS et recensée dans le locus est celle encodant la protéine HprK/P. Alors que chez les bactéries à Gram + cette protéine présente une taille d'environ 310 acides aminés (309 chez *B. subtilis*) et est constituée de trois

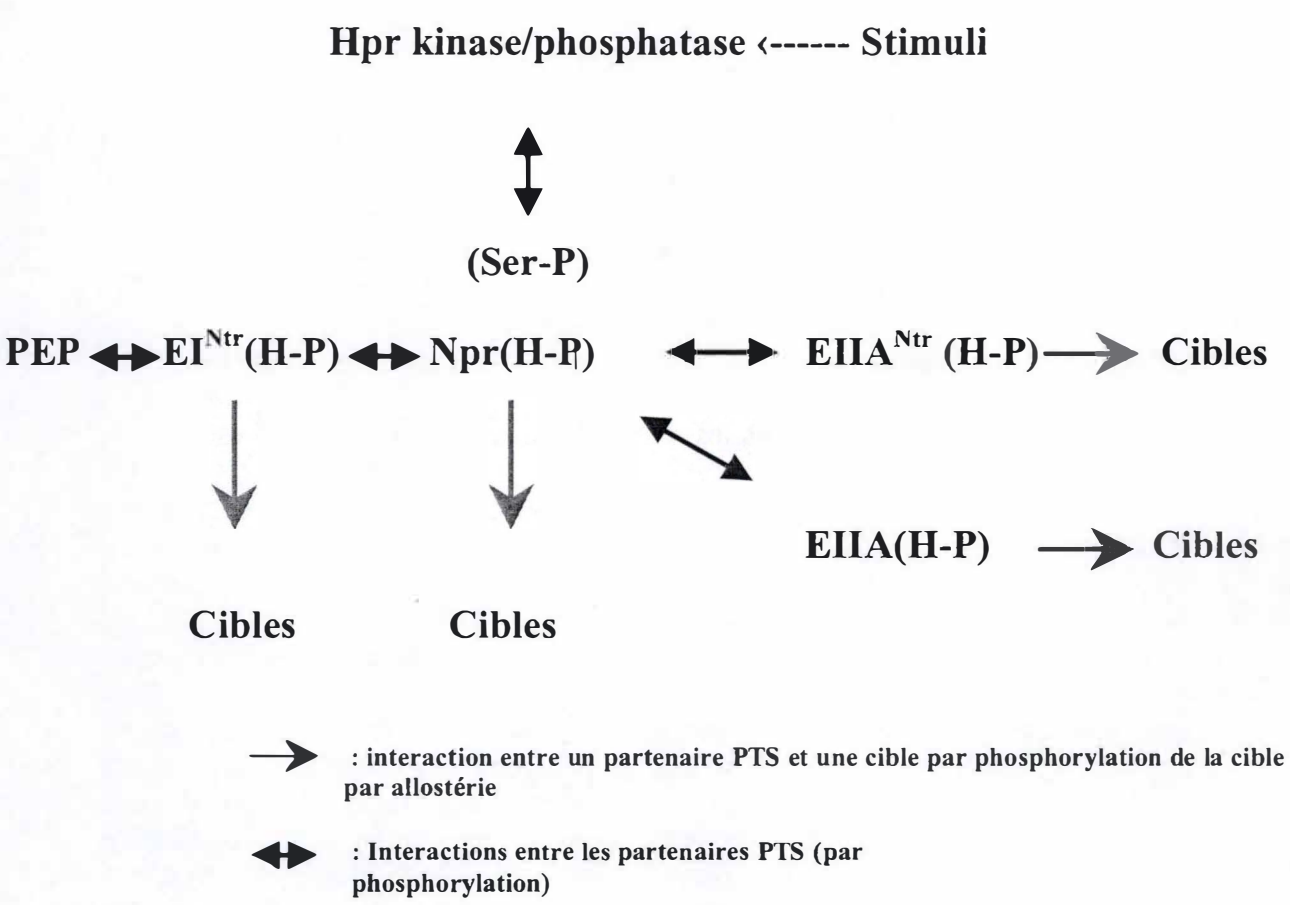


Fig. 20. Modèle prédictif du système PTS chez *B. melitensis*

domaines, chez les α-protéobactéries la protéine est constituée de 160 résidus et est dépourvue d'un domaine amino-ternimal d'environ 130 acides aminés présent chez les bactéries à Gram + et dont la fonction est inconnue. Il a été montré que la seule présence des deux autres domaines (le domaine d'interaction avec l'ATP ainsi que le domaine d'interaction avec la protéine Hpr), situés au niveau de l'extrémité carboxy-terminale, est suffisante pour permettre la fonction de la protéine c'est-à-dire phosphoryler ou déphosphoryler HPr sur le résidu sérine.

1.3. Construction d'un modèle prédictif

B. melitensis contient donc plusieurs éléments spécifiques des systèmes PTS dont l'association n'est pas suffisante pour qu'ils interviennent dans le transport de sources carbonées par phosphorylation. L'absence des perméases intervenant normalement dans ces systèmes en est la principale cause. Néanmoins, la conservation de tous les éléments PTS identifiés chez *B. melitensis* dans le génome de toutes les α-protéobactéries ainsi que chez bon nombre d'autres bactéries suggère que le système PTS est fonctionnel chez *Brucella*, mais fonctionne différemment. L'existence de mutants PTS atténués en modèles cellulaires renforce cette dernière hypothèse.

En conciliant la présence des deux protéines spécifiques du système PTS impliquées dans le métabolisme azoté, EI^{ntr} et $EIIA^{ntr}$ chez *B. melitensis*, avec l'observation que nous avons évoquée concernant l'erreur d'annotation du gène encodant une protéine dite Hpr (que nous considérons comme étant une protéine Npr), nous proposons, en appui avec la littérature, l'existence d'un relais de phosphate entre PEP, EI^{ntr}, Npr et $EIIA^{ntr}$ (fig.20).

Le système ainsi évoqué apparaît plus versatile puisque Npr pourrait non seulement exister sous forme His-P, Ser-P et Ser-His-P grâce à l'activité de EI^{ntr} et de HprK/P mais pourrait également présenter d'autres cibles que $EIIA^{ntr}$, telles que $EIIA^{m}$ par exemple.

Pour évaluer la crédibilité de notre modèle, il est nécessaire de le valider. Cela signifie concrètement qu'il faut mettre en évidence les différentes interactions prédites, effectuer des tests de phosphorylation *in vitro* pour confirmer l'existence de la chaîne de phosphorylation et enfin construire les différents mutants pour étudier leur phénotype.

Dans le cadre du mémoire, les tests de phosphorylation *in vitro* n'ont pas été réalisés en raison du temps imparti. Les tests d'interactions protéiques ont pu être effectués, et la construction des mutants a, quant à elle, pu être entamée.

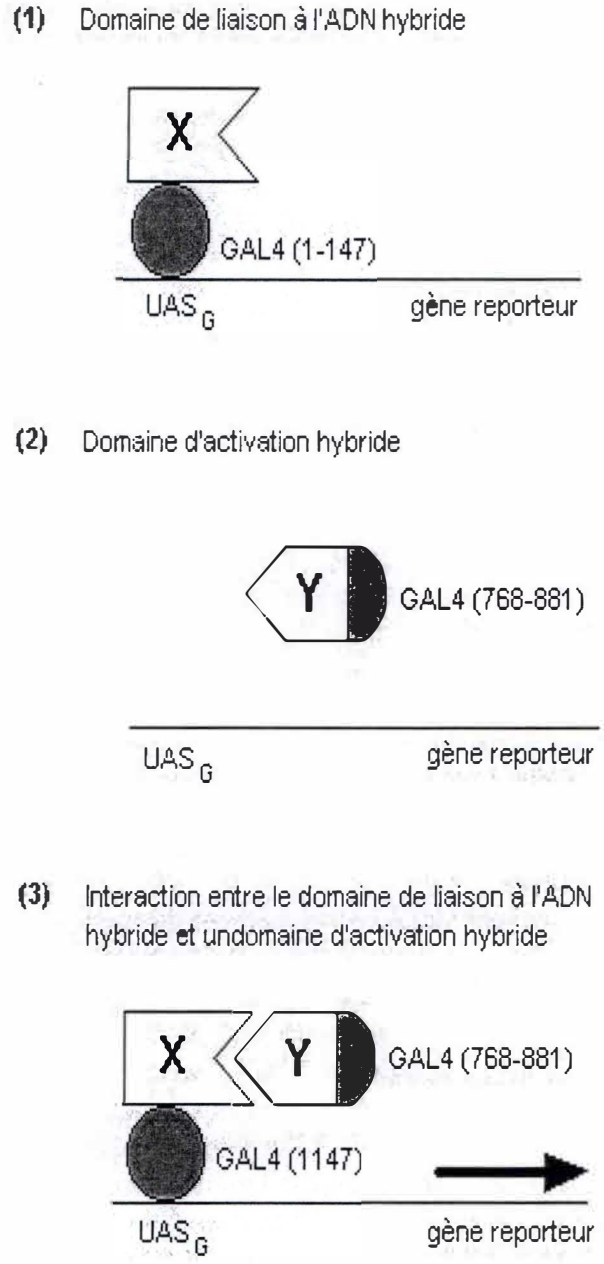


Fig. 21 (d'après http://www.biochimie.univ-montp2.fr/licence/interact_adn/facteur_trscrpt/gal4/introgal4.htm).
Stratégie de détection des interactions entre protéines par le système double-hybride.
Les plasmides codant pour deux protéines hybrides, une représentant le domaine de GAL4 liant l'ADN fusionné à la protéine X **(1)** et l'autre représentant le domaine de GAL4, activateur de la transcription, fusionné à la protéine Y **(2)**, sont construits et introduits à l'intérieur de la levure. L'interaction entre les deux protéines X et Y conduit à la reconstitution d'une protéine GAL4 fonctionnelle **(3)** et donc à l'activation de la transcription du gène rapporteur contenant un site de liaison à GAL4.
La protéine associée au domaine de liaison à l'ADN est appelée "appât". La protéine associée au domaine activateur de la transcription est appelée "proie".

2. TEST D'INTERACTION EN DOUBLE-HYBRIDE

Afin d'éprouver notre modèle, nous avons testé expérimentalement toutes les interactions possibles entre nos différents acteurs en utilisant le test double-hybride chez la levure *Saccharomyces cerevisae*.

Nous commencerons par un bref descriptif du principe et des étapes de la technique utilisée, puis nous présenterons les résultats obtenus.

2.1. Principe

Le système double-hybride utilise la mise en évidence de l'expression d'un gène rapporteur comme révélatrice d'une interaction entre deux protéines. Cette méthode fait appel à des transactivateurs, tels que Gal4[8]. Un transactivateur est un facteur trans capable de moduler la transcription d'un gène en se liant à un élément cis de l'ADN appelé UAS (upstream activator sequence) situé en amont du promoteur de ce gène. Il est constitué d'un domaine d'activation ou AD (activating domain) recrutant la machinerie de transcription et d'un domaine de liaison à l'ADN ou BD (binding domain). La séparation physique de ces deux domaines entraîne la perte de fonction du transactivateur dans la mesure où le domaine AD n'est pas capable de se lier à l'ADN et que le domaine BD ne peut, à lui seul, activer la transcription (Walhout and Vidal, 2001).

En liant par génie génétique chacun de ces domaines à des protéines X et Y, il est possible de reconstituer un facteur de transcription fonctionnel si les deux protéines candidates X et Y sont effectivement capables d'interagir l'une avec l'autre. L'expression de gènes rapporteurs placé sous le contrôle du facteur Gal4 signalera l'interaction de deux protéines hybrides par reconstitution du transactivateur (fig. 21).

[8] Gal4 est le transactivateur de l'ORF Gal1 qui encode la β-galactosidase.

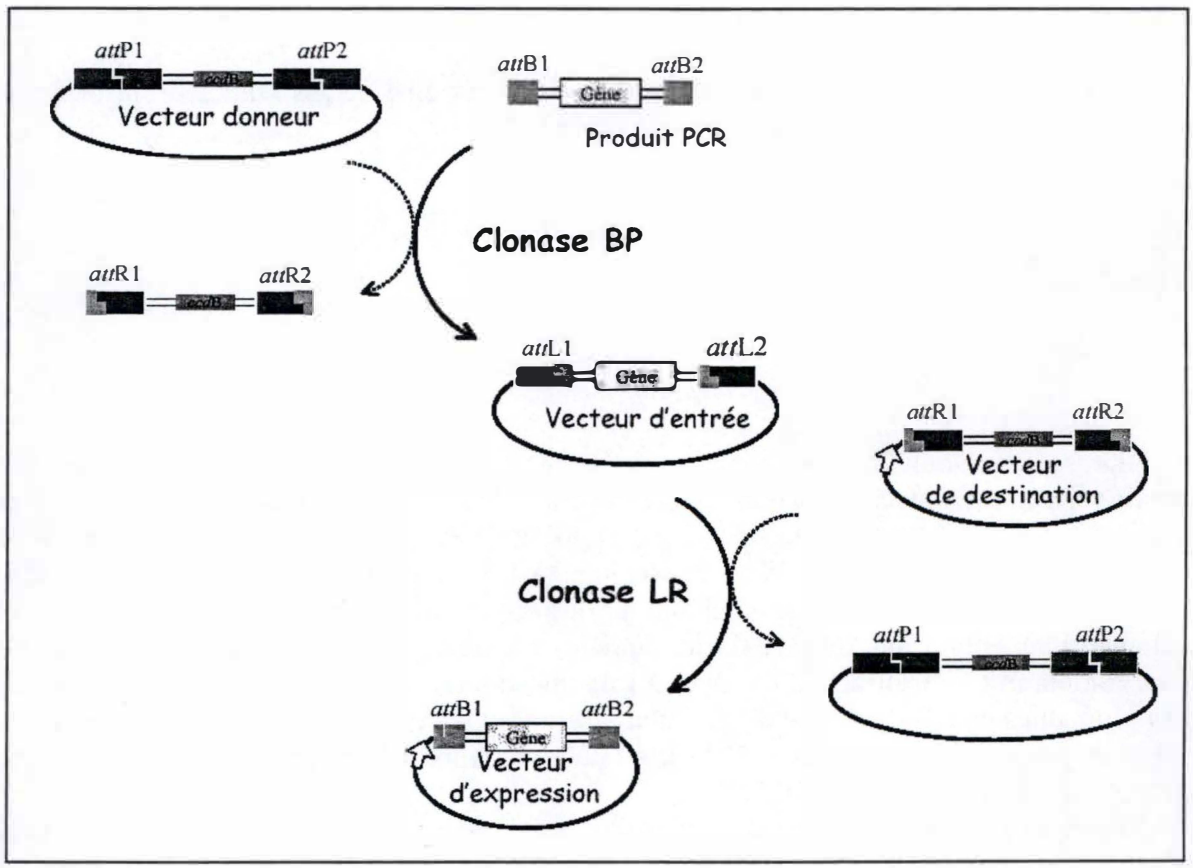


Fig. 22. Principe schématisé du clonage Gateway™.

2.2. Première étape : choix des ORF et clonage Gateway

La réalisation du test double-hybride nécessite la construction d'un plasmide "appât" encodant le produit de la fusion traductionnelle entre le domaine BD de Gal4 et la protéine d'intérêt Y ainsi que la construction d'un plasmide "proie" encodant le produit de la fusion traductionnelle entre l' AD de Gal4 et la protéine d'intérêt X.

Nous avons entrepris de cloner les 5 ORF impliquées dans les systèmes PTS chez *B. melitensis* et les 2 ORF du système à deux composants BvrR/BvrS dans des vecteurs multicopies contenant soit la séquence AD (pVV213), soit la séquence BD (pVV212) du transactivateur Gal4. Pour ce faire, le système Gateway™ de clonage par recombinaison a été utilisé.

Ce système dérive du mécanisme par lequel le phage λ intègre et excise son génome dans et de celui d'*E. coli* (cfr matériel et méthodes). Il nécessite trois étapes (fig. 22). La première est une amplification par PCR permettant de flanquer l'ORF d'intérêt de séquences attB1 et attB2. La seconde est une réaction BP consistant à cloner l'ORF dans un vecteur donneur par recombinaison entre les sites attP1 et attP2 de ce vecteur respectivement avec les sites attB1 et attB2 bordant l'ORF (les sites référés 1 et 2 sont des variants mutés, mais fonctionnels, des sites naturels B et P d'*E. coli* et du phage *λ*). Cette recombinaison génère un vecteur d'entrée contenant une ORF flanquée des sites désignés attL1 et attL2. Lors de la dernière étape, la réaction LR, l'ORF contenue dans le vecteur d'entrée est clonée dans une série de vecteurs receveurs (vecteurs double-hybride, etc...) par recombinaison entre les sites attL (vecteur d'entrée) et attR (vecteur receveur).

Le laboratoire dispose de l'ORFéome complet de *B. melitensis* 16M correspondant aux ORF prédites de tout son génome amplifiées par PCR et clonées dans un vecteur donneur (pDONR201) du système Gateway™, générant ainsi un vecteur d'entrée pour chaque ORF (Dricot A., *in press*). Des bactéries de la souche DH10B d'*E. coli* contenant le plasmide pDONR201-ORF ont été dégelées de l'ORFéome et étalées sur une boîte de LB-agar contenant de la kanamycine. Après 24h d'incubation à 37°C, toutes les colonies ont été raclées et resuspendues dans 1 ml de LB-glycérol. De cette façon nous avons décidé de travailler en pool et non en colonie isolée et ce jusqu'à la fin de l'expérience. Une minipréparation d'ADN plasmidique a ensuite été réalisée sur 300µl de ce volume. Les plasmides ainsi isolés ont été vérifiés et validés par restriction diagnostique (données non montrées).

Nous avons réalisé une réaction LR entre les vecteurs d'entrée contenant les 7 ORF (pDONR-ORF:*EI*^{ntr}, *EIIA*^{ntr}, *EIIA*^{m}, *NPr*, *HprK/P*, *bvrR/S*) d'intérêt et les deux vecteurs receveurs adaptés au double-hybride (pVV212 pour une fusion avec le BD et pVV213 pour une fusion avec l'AD). Des bactéries DH10B ont été transformées avec le produit de ces 14 réactions LR. Les transformants ont été sélectionnés en présence d'ampicilline et une extraction d'ADN plasmidique a été effectuée sur plusieurs candidats. Chaque minipréparation a été soumise à une restriction diagnostique qui a permis de vérifier la présence de l'insert (résultat non montré).

Nous disposons donc de 14 constructions : 7 ORF clonées dans le vecteur pVV212, et les 7 mêmes ORF clonées dans le vecteur pVV213.

2.3. Réalisation de la matrice d'interaction protéine-protéine

Nous avons établi une matrice de 64 interactions où chaque BD-X a été testé contre chaque AD-X et contre AD seul et chaque AD-X a été testé contre chaque BD-X et contre BD seul (où X correspond aux 7 ORF) (fig. 23). Cette matrice contient des contrôles négatifs (test avec BD seul et AD seul) et des contrôles positifs. En effet, l'interaction entre BvrR et BvrS a déjà été mise en évidence au laboratoire par le double-hybride (R. Hallez, communication personnelle).

La souche de levure haploïde Mav103 (Mat a) a été transformée avec les plasmides pVV213-ORF (AD-X) et les transformants ont été sélectionnés sur un milieu sans leucine (marqueur *LEU2* porté par le pVV213). La souche haploïde Mav203 (Mat α) a été transformée avec les plasmides pVV212-ORF (BD-Y) et les transformants ont été sélectionnés sur un milieu sans tryptophane (marqueur *TRP* porté par le pVV212).

En vue de réunir les plasmides dérivés du pVV212 et du pVV213 dans une même souche pour réaliser les tests d'interaction, un croisement entre les deux souches de levure haploïdes a été réalisé par la technique de la réplique sur velours (cfr matériel et méthode). Ainsi, chaque souche portant une fusion BD-X (8 souches) a été croisée par réplique sur velours avec chaque souche encodant une fusion AD-X (8 souches). Les diploïdes ont été sélectionnés sur un milieu sans leucine ni tryptophane. A ce stade, 64 souches diploïdes ont été obtenues.

Deux gènes rapporteurs ont été utilisés dans le cadre de ce test : *HIS3* et *lacZ*. Les diploïdes ont donc été répliqués sur deux types de milieu : (i) un milieu sans leucine ni tryptophane ni histidine et contenant du 3AT (50 mM et 100mM). Le gène rapporteur *HIS3* encode une imidazole glycérol phosphate déhydratase impliquée dans la voie de biosynthèse de l'histidine dont l'expression permet la croissance de la levure en l'absence d'histidine. Néanmoins, la levure présente un niveau basal de transcription de *HIS3* susceptible d'entraîner une légère croissance en absence d'histidine, ce qui constitue un bruit de fond gênant dans l'interprétation des résultats. Pour contourner ce problème, l'utilisation du 3AT est indispensable. En effet, le 3AT est un inhibiteur du produit enzymatique encodé par *HIS3* qui restaure l'auxotrophie pour l'histidine (Durfee *et al.*, 1993) et (ii) un milieu de coloration sans leucine ni tryptophane où le test blanc/bleu a été réalisé en surcouche (*cfr* matériel et méthodes). Le gène rapporteur *lacZ* encode la β-galactosidase dont l'activité est mise en évidence par un test coloré blanc/bleu sur colonie (en surcouche) après réplique et croissance des diploïdes sur un milieu sans leucine ni tryptophane.

I

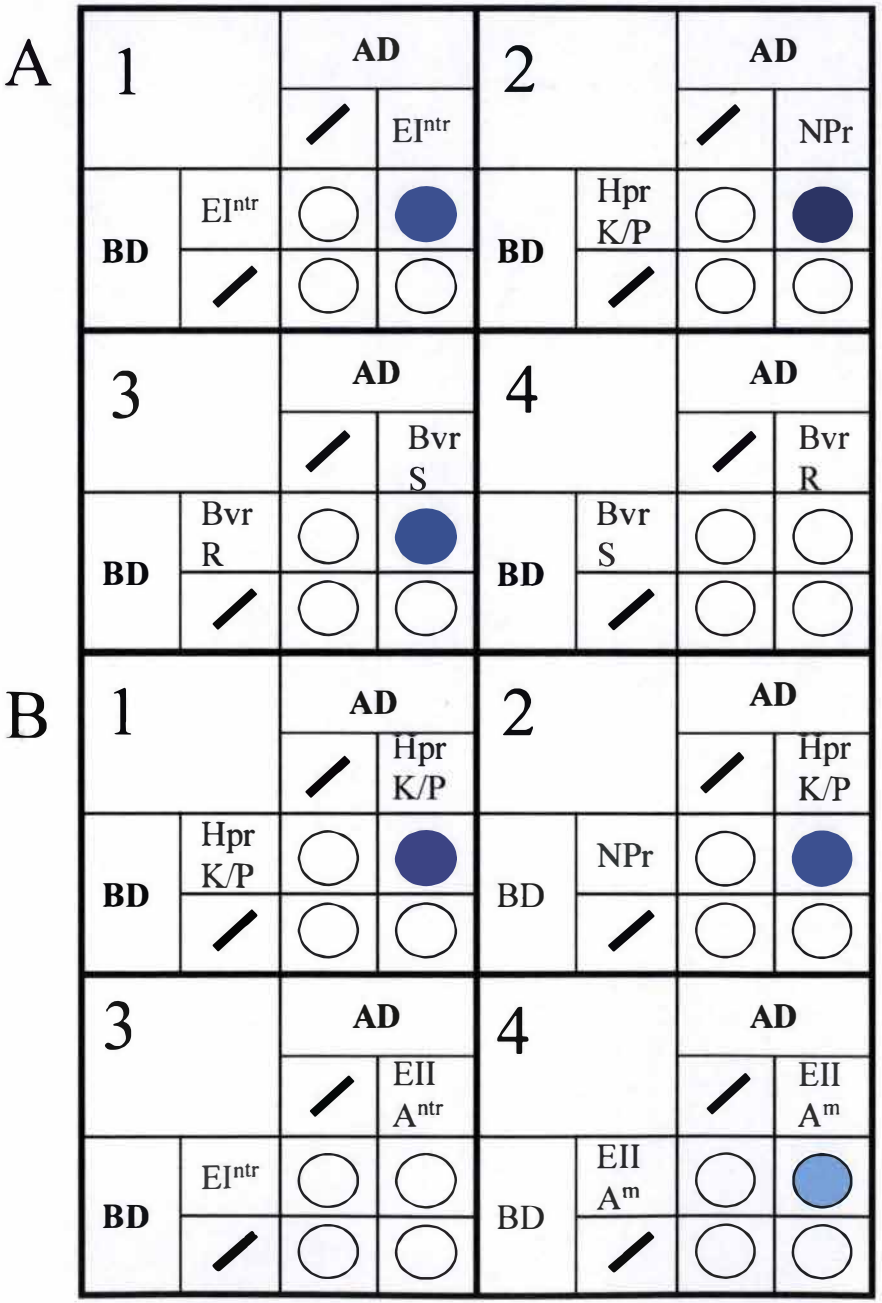
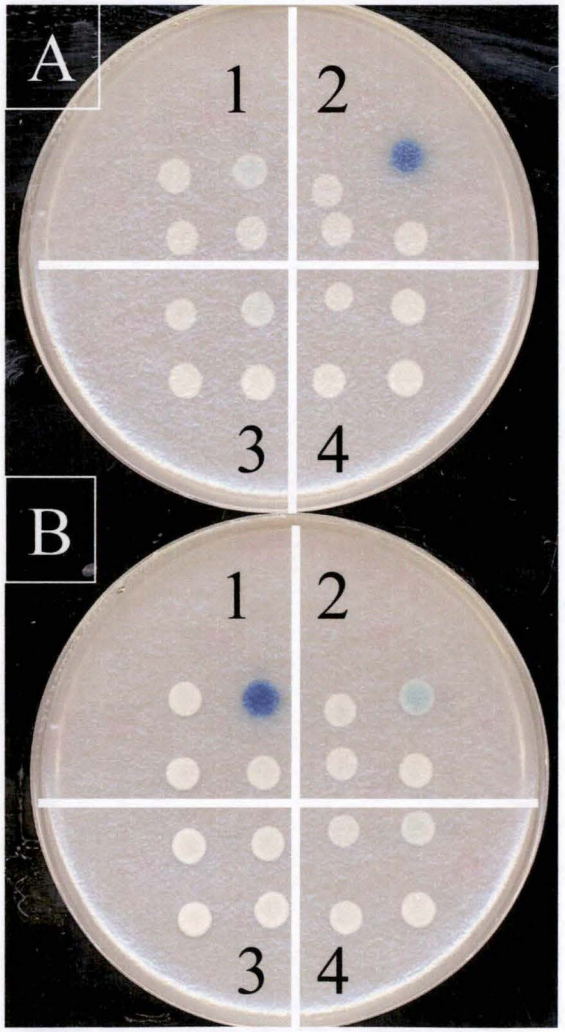


Fig. 24.
Photographies numériques réalisées dans le cadre du test en double-hybride. I) Test de coloration en présence de X-gal. II) Test de croissance sur milieu sans histidine et contenant du 3AT.



Intensité du signal importante

Intensité du signal moyenne

Intensité du signal faible

II

A

		AD	
1		/	EI^{ntr}
BD	EI^{ntr}	○	○
	/	○	○

		AD	
2		/	NPr
BD	Hpr K/P	○	●
	/	○	○

		AD	
3		/	Bvr S
BD	Bvr R	○	●
	/	○	○

		AD	
4		/	Bvr R
BD	Bvr S	○	●
	/	○	○

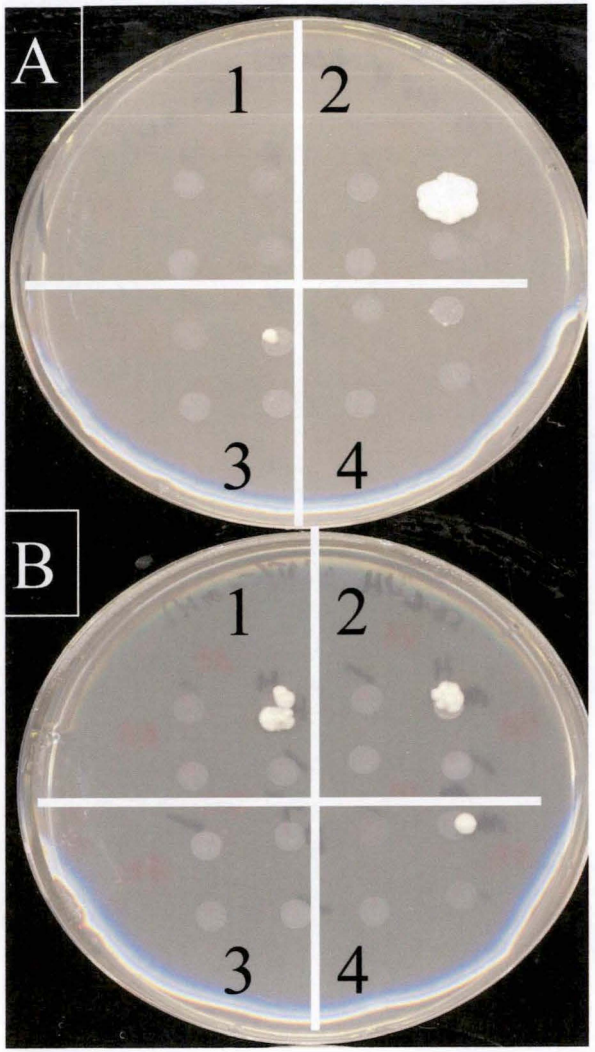
B

		AD	
1		/	Hpr K/P
BD	Hpr K/P	○	●
	/	○	○

		AD	
2		/	Hpr K/P
BD	NPr	○	●
	/	○	○

		AD	
3		/	EII A^{ntr}
BD	EI^{ntr}	○	○
	/	○	○

		AD	
4		/	EII A^{m}
BD	EII A^{m}	○	●
	/	○	○



● Intensité du signal importante

● Intensité du signal moyenne

● Intensité du signal faible

2.4. Analyse des résultats

Parmi les 64 interactions testées, nous en avons révélées 7 différentes, impliquant 6 des 7 ORF d'intérêt. Les photographies numériques de la figure 24 reprennent ces résultats en image. Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence d'interaction impliquant une fusion avec la protéine $EIIA^{ntr}$ (fig. 23).

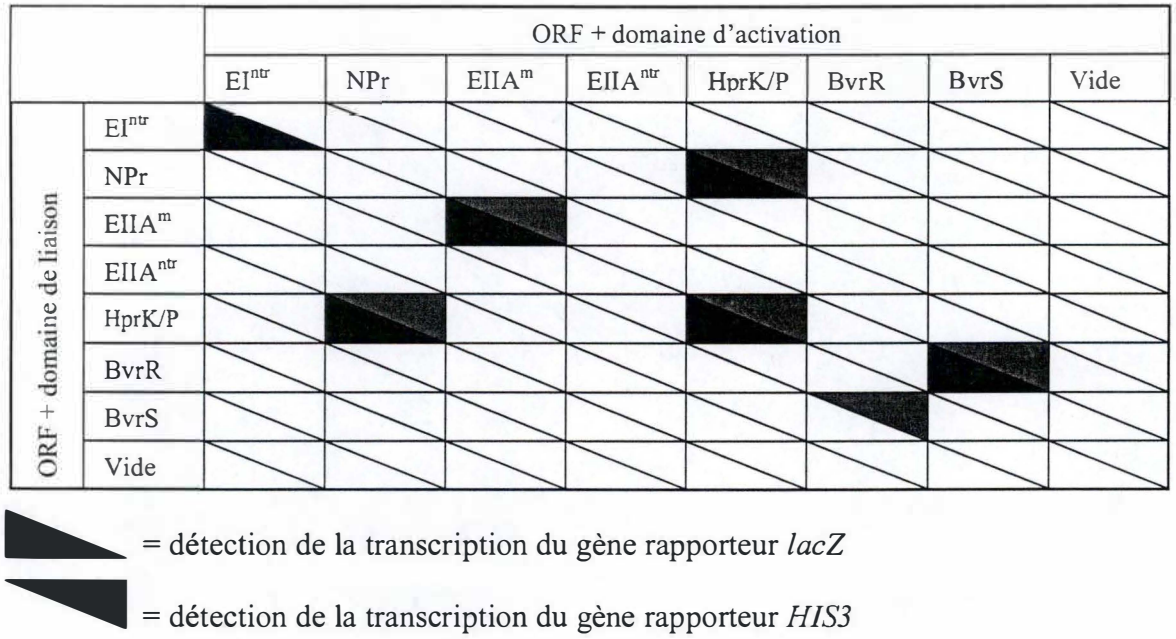


Fig. 23. Matrice d'interaction obtenue grâce au test en double-hybride effectué au cours de ce travail

L'analyse de ces résultats nous apporte les observations suivantes :

- Aucun contrôle négatif (plasmides vides) n'est impliqué dans une quelconque interaction. Cela nous indique qu'aucune de nos ORF n'est capable de substituer la fonction du domaine d'activation ou de liaison à l'ADN du transactivateur. De plus, aucune de nos ORF ne transactive un gène rapporteur quel que soit son partenaire. Cette information signifie que les interactions recensées dans ce tableau sont vraisemblablement spécifiques. En outre, le contrôle positif représenté par l'interaction entre BvrR et BvrS s'est révélée correcte. On peut donc conclure que, d'un point de vue technique, l'expérience s'est bien déroulée.

- Seuls deux couples d'interactants ont allumé un seul des deux gènes rapporteurs. Il s'agit de l'enzyme EI^{ntr} avec elle-même et de BvrR fusionné à l'AD avec BvrS fusionné au BD. Toutes les autres interactions ont déclenché la transcription des deux gènes rapporteurs. L'expression des deux gènes rapporteurs par le même couple de protéines est un indice de la grande affinité qui existe entre ces deux partenaires.

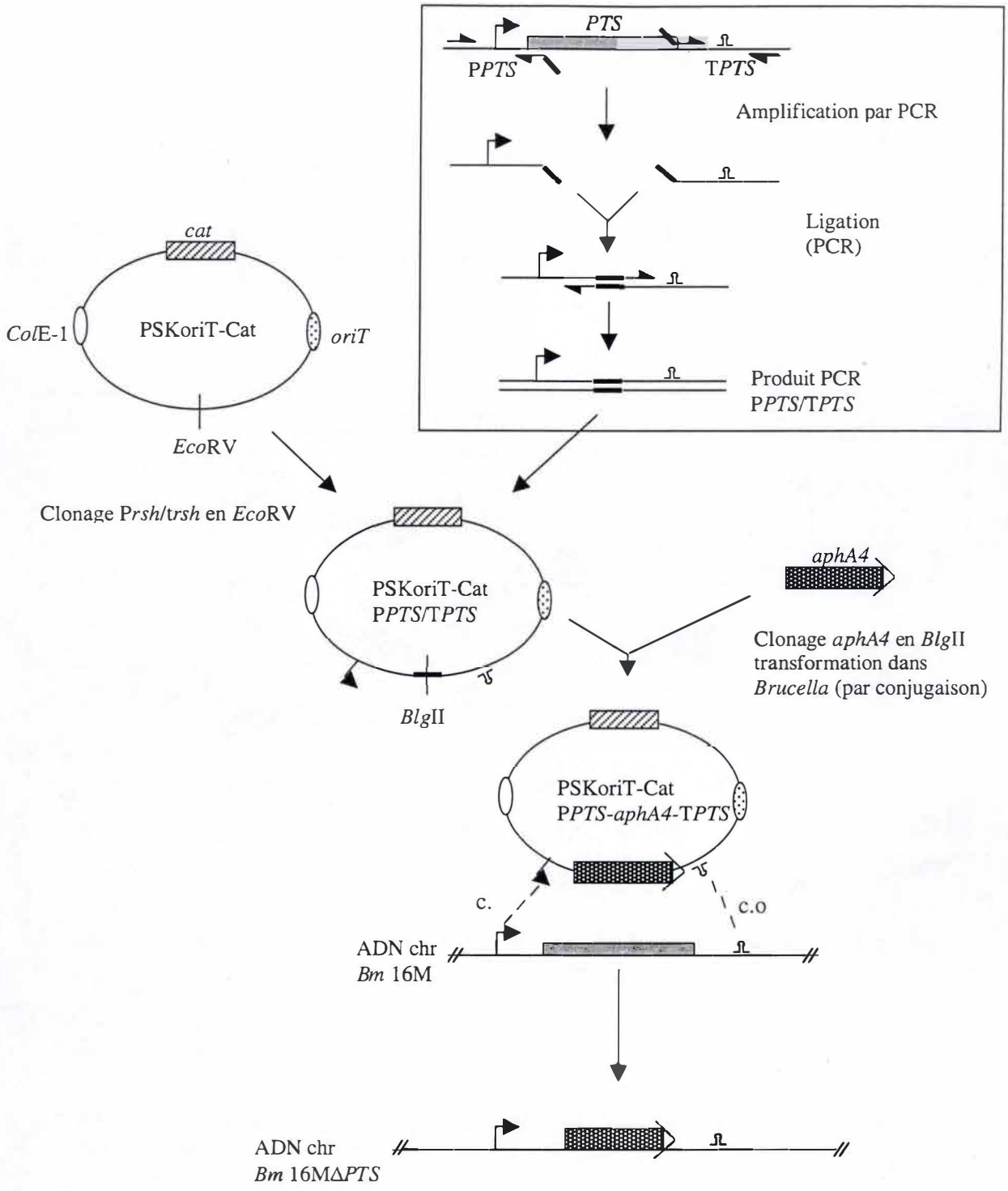


Fig. 25. Principe du remplacement allélique.

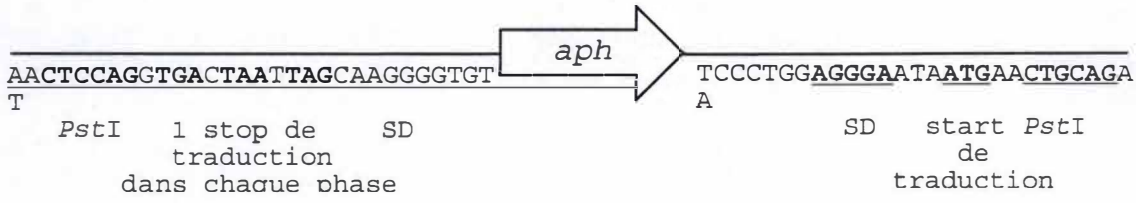


Fig 26. Structure de la cassette de délétion non polaire *aphA4* (Dozot M., thèse en cours). Cette cassette comporte la séquence codante du gène de résistance à la kanamycine *aph* précédée de trois stops de traduction (un dans chaque phase de lecture) et suivie d'un consensus RBS (ribosome binding site) et d'un start de traduction.

- Trois couples d'homomultimères ont été mis en évidence: EI^{ntr}-EI^{ntr}, $EIIA^{m}$-$EIIA^{m}$ et HprK/P-HprK/P.

- L'interaction qui lie BvrR fusionné à l'AD et BvrS fusionné au BD a été détectée par la croissance d'un très petit nombre de colonies. Bien que l'interprétation de ce résultat soit difficile, la raison peut être liée au fait que l'on travaille en pools de levure et non en colonies isolées, ou que cette interaction résulte d'une liaison très faible.

- Enfin, une interaction entre les protéines Npr et HprK/P a pu être mise en évidence avec les deux systèmes rapporteurs, et ce dans les deux sens. Ceci suggère une forte interaction entre les deux protéines partenaires. Par ailleurs, en gardant à l'esprit que HprK/P est une kinase typique des bactéries à Gram +, ce résultat appuie l'hypothèse selon laquelle HprK/P pourrait phosphoryler NPr.

3. CONSTRUCTION DE MUTANTS DANS LES ORF *PTS* DE *B. MELITENSIS* 16M

Afin de construire des souches de *B. melitensis* délétées pour chacune des ORF impliquées dans les systèmes PTS, nous avons utilisé la technique du remplacement allélique, qui consiste à remplacer la séquence codante de ces différentes ORF par une ORF conférant la résistance à un antibiotique (ici, la kanamycine) (fig. 25). Dans un premier temps, un vecteur comprenant une version délétée du gène d'intérêt a été construit : les régions "amont" et "aval" (environ 500 pb) du gène d'intérêt ont été amplifiées pas PCR et clonées dans le pSK*ori*T-*cat*, plasmide non réplicatif et mobilisable chez *Brucella*. La cassette de délétion apolaire *aphA4*[9] (fig. 26) a ensuite été clonée dans ce même vecteur entre les fragments "amont" et "aval" du gène d'intérêt. Ce vecteur de délétion a ensuite été transféré par conjugaison vers une souche de *B. melitensis* 16M. Les transconjugants de *Brucella* ayant subi un événement de double recombinaison ont été selectionnés pour leur résistance à la kanamycine et leur sensibilité au chloramphénicol[10] (fig. 27). Enfin, le génotype des clones candidats délétants (KanR, CmS) a été analysé par PCR et Southern blot pour confirmer le remplacement allélique de l'ORF d'intérêt.

---

[9] La cassette *aphA4* confère la résistance à la kanamycine. Cette cassette présente la particularité d'éviter les effets polaires du remplacement allélique sur la transcription et la traduction des ORF situées en opéron avec le gène cible (pour rappel, on considère que les ORF *Npr*, *EIIA*^{m} sont en opérons).

[10] Un seul événement de recombinaison homologue (dans la partie en "amont" ou en "aval" de l'ORF) conduit à l'intégration du plasmide dans le génome (fig. 27 B). Ces clones recombinants dits "intégrants" sont résistants à la Km et au Cm et possèdent une copie délétée ainsi qu'une copie sauvage du gène. Ils ne nous intéressent donc pas.

A)

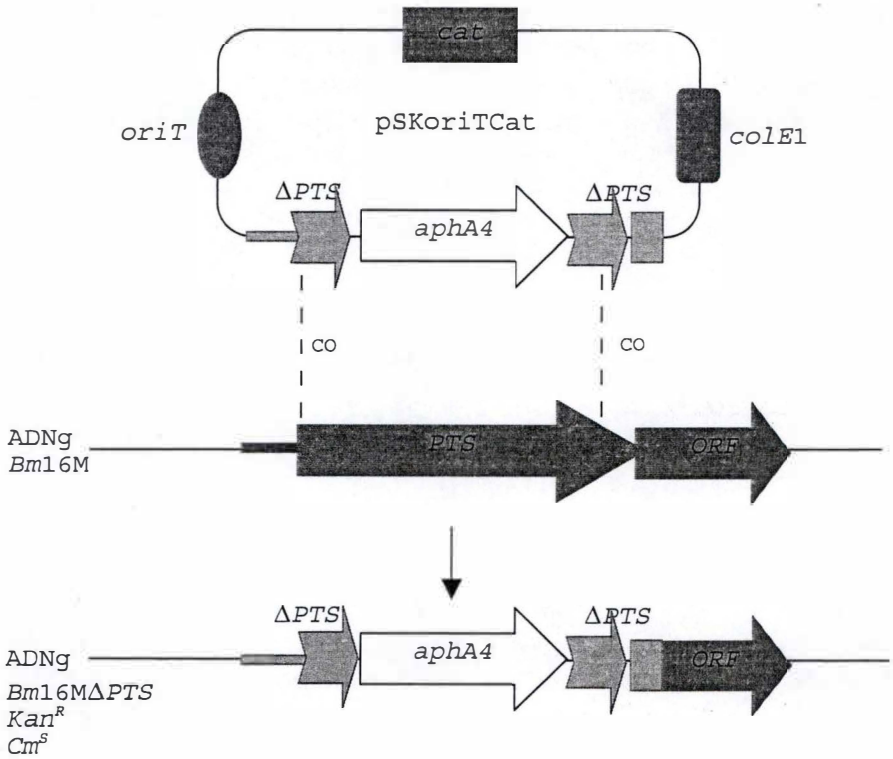
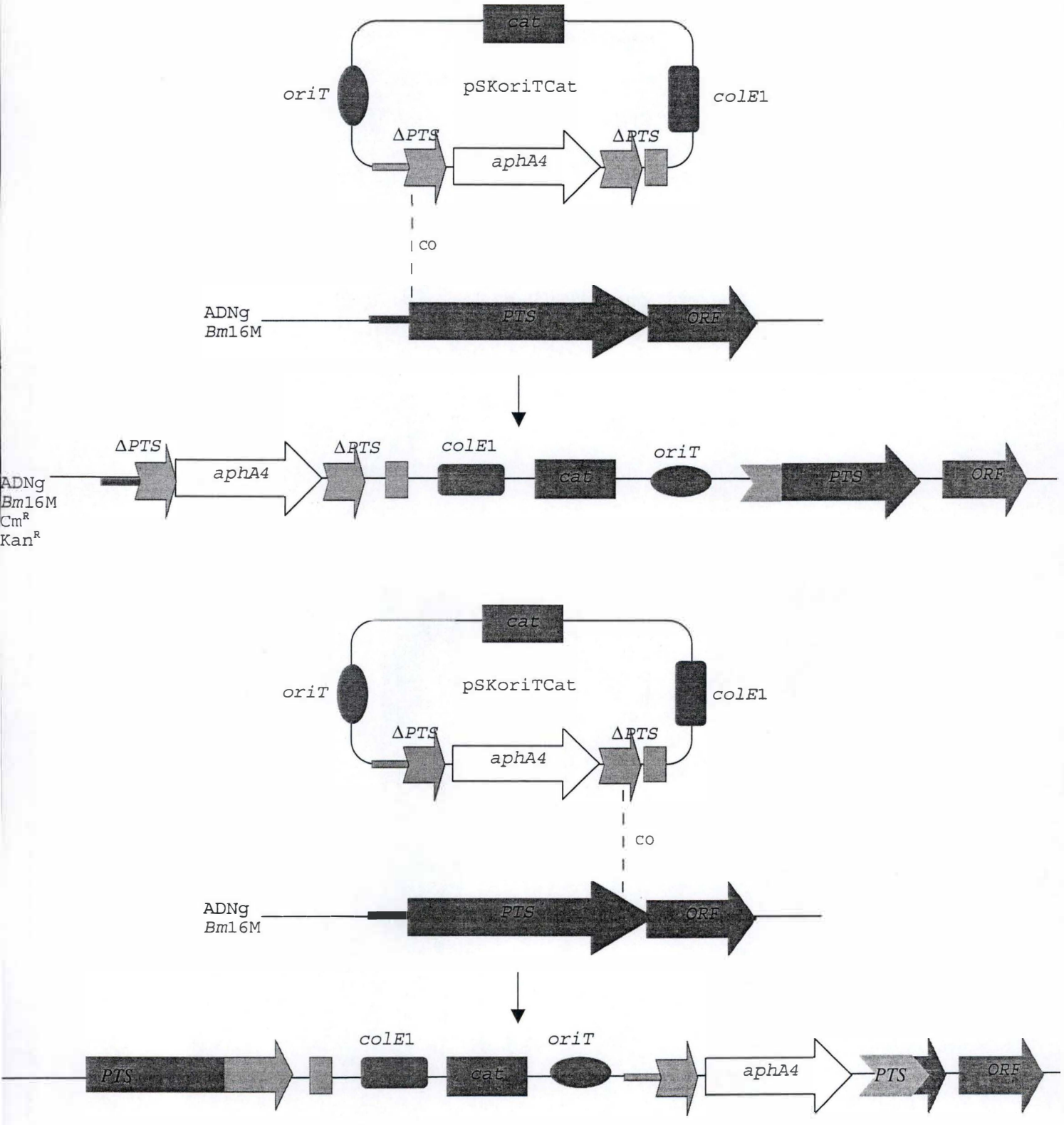


Fig. 27 A et B.
A) génotype d'un transconjugant de *Brucella* ayant subi un événement de double recombinaison
B) génotype d'un transconjugant de *Brucella* ayant subi un événement de simple recombinaison
cat = chloramphenicol acetyl transferase (gène encodant la résistance au chloramphénicol); *oriT* = origine de transfert conjugatif; *colEI* = origine de réplication; *aphA4* = aminoglycoside-phosphotransferase (cassette de déletion apolaire).

B)


cat
oriT
pSKoriTCat
colE1
ΔPTS
aphA4
ΔPTS
co
ADNg
Bm16M
PTS
ORF
ΔPTS
aphA4
ΔPTS
colE1
cat
oriT
PTS
ORF
ADNg
Bm16M
Cm^R
Kan^R
cat
oriT
pSKoriTCat
colE1
ΔPTS
aphA4
ΔPTS
co
ADNg
Bm16M
PTS
ORF
colE1
oriT
PTS
cat
aphA4
PTS
ORF

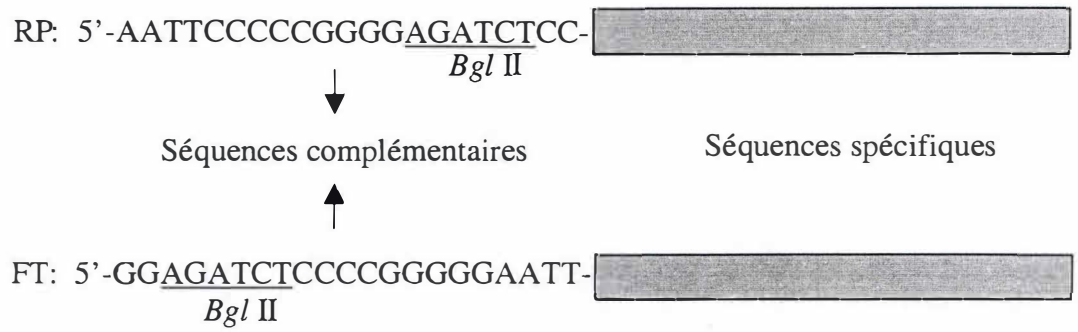


Fig. 28. Schéma des aménagements effectués sur les amorces RP et FT pour la construction des délétants PTS
RP=reverse promotor; FT=forward terminator; *Bgl* II=site de restriction *Bgl* II.

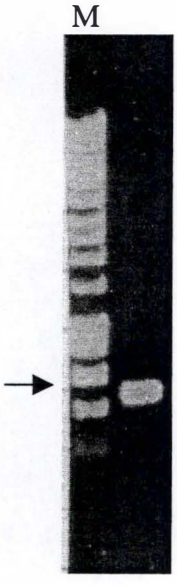


Fig. 29. Electrophorèse en gel d'agarose montrant le produit PCR correspondant à l'amplification de la région "amont" de l'ORF *NPr*. M = marqueur de taille moléculaire (hyper ladder).

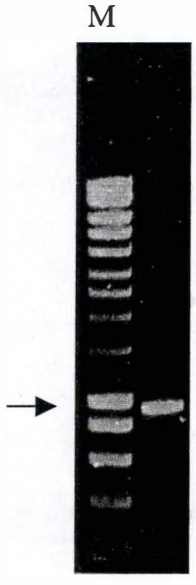


Fig. 30. Electrophorèse en gel d'agarose montrant le produit PCR correspondant à la fusion des régions "amont" et "aval" de l'ORF *NPr*. M = marqueur de taille moléculaire.

3.1. Construction des vecteurs de délétion

3.1.1. Amplification par PCR des parties amont et aval des gènes d'intérêt

a) Définition des amorces

Les amorces nucléotidiques ont été définies de manière à amplifier deux fragments correspondant respectivement aux parties "amont" et "aval" de nos gènes d'intérêt. Quatre amorces ont donc été utilisées, deux pour la partie amont (que nous avons appelé FP pour "forward promotor" et RP pour "reverse promotor") ainsi que deux pour la partie aval (que nous avons appelés FT pour "forward terminator" et RT pour " reverse terminator").

Quelques aménagements ont été réalisés sur les amorces (fig. 28) : (i) des bouts complémentaires ont été ajoutés aux amorces RP et FT pour permettre, par la suite, de fusionner les parties amont et aval de nos gènes d'intérêt amplifiées par PCR; (ii) un site de restriction *Bgl*II a été ajouté à ces séquences complémentaires pour permettre l'insertion ultérieure de la cassette *aphA4* entre les parties "amont" et "aval" amplifiées de nos gènes d'intérêt.

b) Amplification par PCR

Le "Expand High Fidelity PCR System" de la firme Roche a été utilisé pour amplifier les dix fragments d'intérêt à partir d'une préparation d'ADN génomique de la souche sauvage *B. melitensis* 16M Nal^R. Il s'agit d'un mélange d'enzymes contenant la Taq DNA Polymérase ainsi qu'une autre polymérase à activité "proofreading". Les produits PCR obtenus ont été purifiés et analysés par électrophorèse en gel d'agarose 1%. Pour chaque gène PTS, les fragments PCR correspondant aux parties "amont" et "aval" ont été obtenus à la taille attendue (environ 500 pb) (fig. 29).

La fusion des parties "amont" et "aval" spécifiques à chaque gène PTS a également été réalisée par amplification PCR. Les produits PCR ont de nouveau été analysés et purifiés sur gel d'agarose 1%. Les produits PCR d'une taille d'environ 1 kb ont été récupérés directement sur le gel par excision du fragment au scalpel, pour ensuite être purifiés (fig. 30). Ainsi, les produits PCR, dans lesquels les régions "amont" et "aval" du gène d'intérêt ont été fusionnées, ont été obtenus pour chacun des cinq gènes PTS de *B. melitensis* 16M.

3.1.2. Clonage des fragments PCR dans le pSKoriT-cat

Clonage intermédiaire dans le pGEMTeasy

Les cinq fragments PCR purifiés (que nous désignerons par la suite *ΔPTS*) ont chacun été insérés dans le pGEMTeasy. Le mélange de ligation a ensuite été transformé dans des *E.*

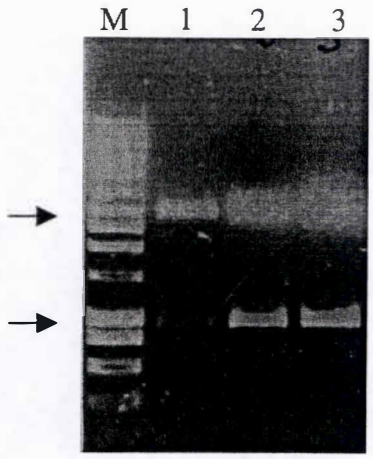


Fig. 31. Electrophorèse en gel d'agarose montrant les restrictions diagnostiques du vecteur pGEMTeasyΔ*NPr* de trois candidats avec l'enzyme *Eco* RI. Les profils attendus et obtenus sont une bande à 3 Kb et une bande à 930 pb. M = marqueur de taille moléculaire.

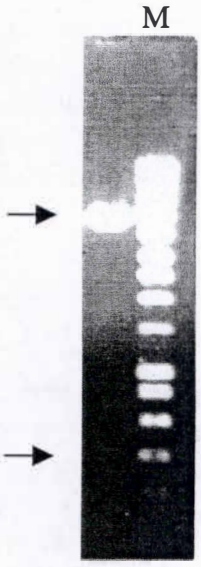


Fig. 32. Electrophorèse en gel d'agarose montrant les restrictions diagnostiques du plasmide pSK*ori*TCat Δ*NPr* avec l'enzyme *Eco* RV. Les profils attendus et obtenus sont une bande à 4,7 Kb et une bande à 400 pb. M = marqueur de taille moléculaire.

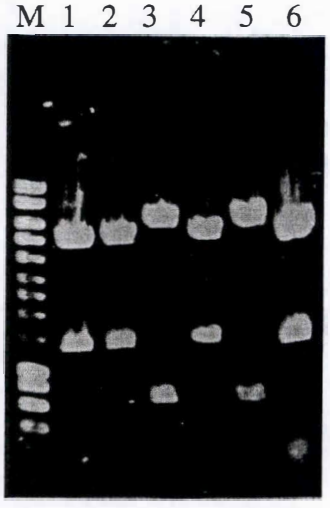


Fig. 33. Electrophorèse en gel d'agarose montrant les restrictions diagnostiques de la construction pSK*ori*TCat Δ*NPr*::*aphA4* de six candidats avec l'enzyme *Xho* I. Les profils attendus et obtenus pour les candidats 3 et 5 sont une bande à 5,4 Kb et une bande à 600 pb. Les candidats 1, 2, 4, 6 montrent les profils suivants: une bande à 4,7 Kb et une bande à 1,3 Kb, c'est-à-dire le cas où la cassette *aphA4* est clonée en sens opposé aux parties "amont" et "aval" du gène d'intérêt. M = marqueur de taille moléculaire.

coli DH10B $CaCl_2$ compétentes. Les bactéries ainsi transformées ont été étalées sur milieu sélectif (LB agar + ampicilline) additionné d'IPTG et de X-gal (test blanc/bleu). Les colonies blanches (transformées avec un plasmide dont le gène *lacZ'* a été disrupté par un insert) ont été sélectionnées pour réaliser des minipréparations d'ADN plasmidique. Les constructions ainsi obtenues ont été vérifiées par restriction diagnostique. Pour chacune de nos constructions, plusieurs candidats ont montré les profils de restriction attendus (fig. 31). Les constructions ainsi obtenues ont été validées par séquençage avec des oligonucléotides universels (pGEM-T amont/aval).

L'insert *ΔPTS* de chacune des cinq constructions a été ressorti du pGEMTeasy par restriction *Not*I et purifié sur gel pour être ensuite cloné en *Not* I dans le pSK*ori*T-*cat* (vecteur mobilisable et non-réplicatif chez *Brucella*). Le mélange de ligation a été transformé dans des *E. coli* DH10B $CaCl_2$ compétentes, qui ont ensuite été étalées sur milieu sélectif (LB-Cm) additionné de X-gal et d'IPTG (test blanc/bleu). Des colonies blanches ont été remises en culture afin d'en extraire l'ADN plasmidique par minipréparation. La présence et la nature de l'insert ont été vérifiées par restrictions diagnostiques (fig. 32).

Pour chacune des cinq constructions, un clone présentant les profils de restriction attendus a été sélectionné et restreint par *Bgl* II. Ce site *Bgl* II, présent dans chaque insert, sépare les séquences "amont" des séquences "aval". La cassette *aphA4* récupérée du plasmide pUC4-*aphA4* (M. Dozot, thèse en cours) par restriction *Bam* HI a été clonée au site *Bgl* II (les sites de restriction *Bam* HI et *Bgl* II sont compatibles). Après ligation, transformation et étalement en présence de kanamycine, des minipréparations d'ADN plasmidique ont été effectuées sur les colonies d'intérêt et vérifiées par restriction diagnostique. Pour chaque construction, les profils attendus ont été obtenus (fig. 33). Par ailleurs, un séquençage de la jonction située en aval de la cassette *aphA4* a permis de s'assurer que cette cassette était bien en phase avec la partie "aval" du gène d'intérêt.

A ce stade, nous disposons donc de cinq vecteurs permettant la délétion des ORF d'intérêt.

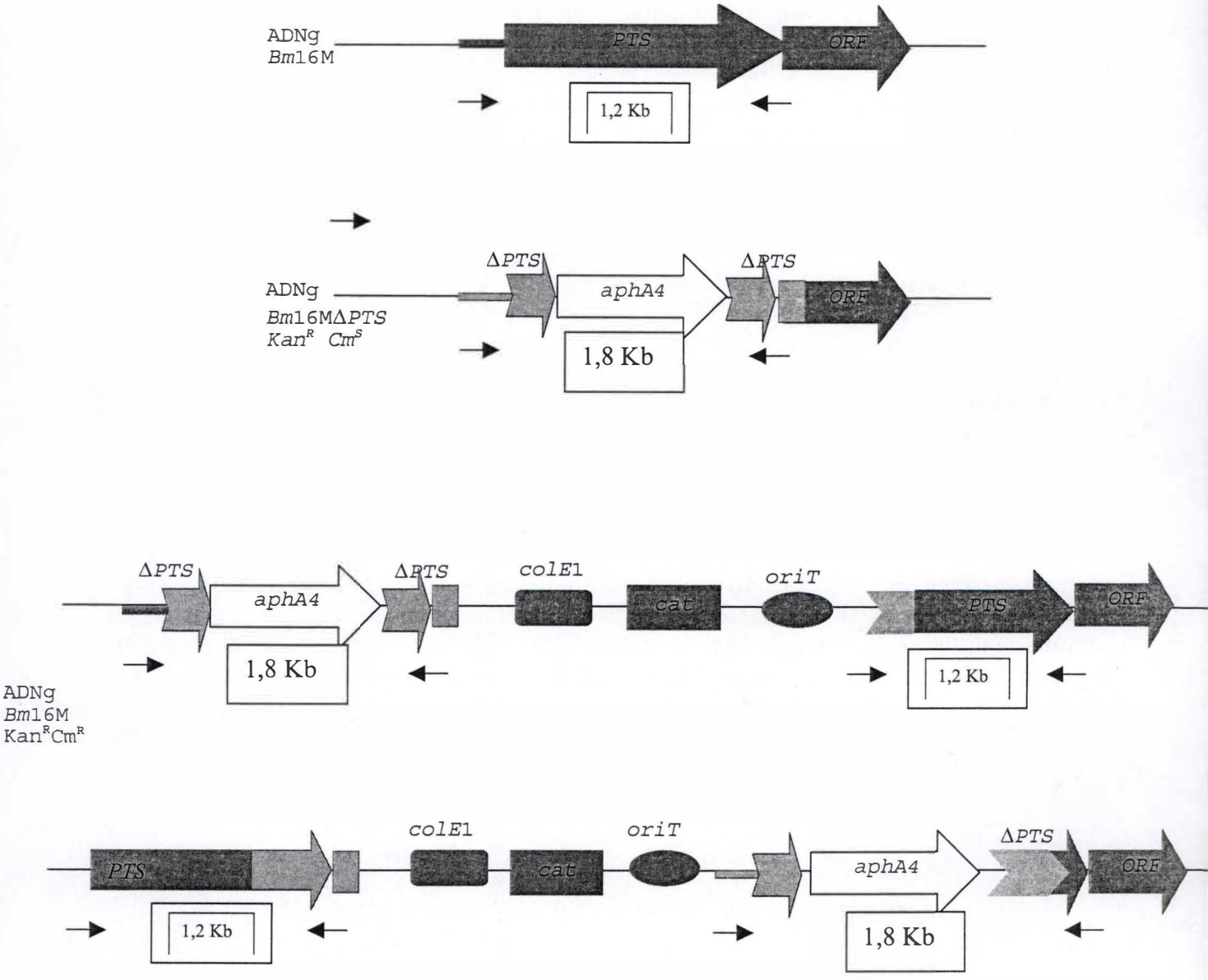
3.2. Construction des mutants PTS chez *B. melitensis* 16M

3.2.1. Conjugaison et sélection de clones candidats délétants

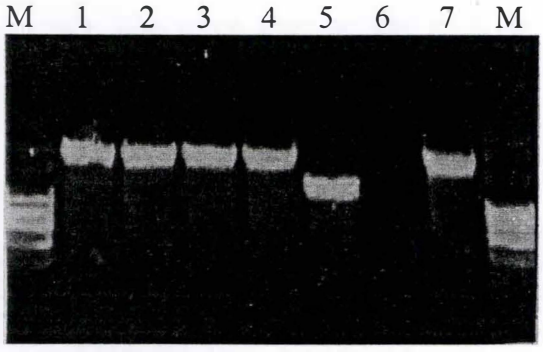
Les constructions (pSKoriT*cat-ΔPTS*::*aphA4*) ont été introduites par transformation dans la souche *S17-1* d'*E. coli*, et transférées par conjugaison dans la souche sauvage de *B. melitensis* 16M (Nal^R). Les clones recombinants de *B. melitensis* issus de la conjugaison ont été sélectionnés sur 2YT en présence d'acide nalidixique (Nal) et de kanamycine (Kan). Ces clones Nal^R et Kan^R ont ensuite été repiqués sur milieu 2YT Nal additionné de chloramphénicol (Cm) afin de différencier les candidats délétants (CmS) (fig. 27 A) des intégrants (CmR) (fig. 27 B).

A l'issue de l'ensemble des conjugaisons réalisées au cours de ce mémoire, 1 clone *ΔHprK/P*, 6 clones npr et 16 clones *ΔEIIA*^{m} résistants à la kanamycine ont été obtenus. Parmi ceux-ci, 4 clones npr et 3 clones *ΔEIIA*^{m} se sont révélés sensibles au Cm. L'ADN génomique

A)



B)



Fig; 34. PCR diagnostique effectuée sur l'ADN génomique de souches de *B. melitensis* délétées pour l'ORF *NPr*. (A) Schéma des différents profils sauvage, délétant et intégrant. Les amorces utilisées s'hybrident sur les régions "amont" et "aval" de *NPr*. Les flèches rouges représentent les amorces utilisées pour la PCR, et la taille des amplicons est reprise entre chaque flèche. (B) Electrophorèse en gel d'agarose montrant les fragments PCR obtenus: pistes 1 à 4 = candidats délétants pour *NPr*; piste 5 = souche sauvage (C-); piste 6 = contrôle sans ADN (C-), piste 7 = pSKoriT*catΔNPr*::*aphA4* (C+). M=marqueur de taille.

des candidats *ΔNPr* a été extrait afin d'analyser leur génotype par PCR et Southern blot. Le génotype des candidats *ΔEIIA*^{m} est en cours d'analyse.

3.2.2. *VALIDATION DES MUTANTS PAR PCR*

Une PCR diagnostique a été effectuée sur l'ADN génomique de candidats *Δnpr* en utilisant des amorces s'hybridant de part et d'autre de l'ORF à déléter. Nos résultats indiquent que les 4 clones candidats ont un profil PCR de délétant (fig. 34).

3.2.3. *VALIDATION DES MUTANTS PAR SOUTHERN BLOT*

L'ADN génomique des quatre candidats du mutant *Δnpr* a été restreint par *Hind*III et *Eco*RI. Les fragments de restriction ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose 1%, transférés sur membrane et hybridés avec une sonde radioactive (α-^{32}P) correspondant à la région "amont" de *npr*. Le résultat du Southern blot confirme le résultat de la PCR diagnostique montrant que les 4 clones candidats sont des délétants *npr* (fig. 35).

A ce stade, nous disposons donc de délétants de l'ORF *npr,* de candidats délétants *EIIA*^{m} ainsi que des constructions plasmidiques permettant de déléter les ORF *EI*^{ntr}, *HprK/P*, *EIIA*^{m} et *EIIA*^{ntr}.

4. RÉCAPITULATIF DES RÉSULTATS OBTENUS

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés aux protéines spécifiques des systèmes PTS chez *B. melitensis* 16M pour tester l'existence d'un système PTS fonctionnel chez cette bactérie. A cette fin, trois approches ont été menées. D'abord, une analyse des loci *PTS* et de leurs homologues a été réalisée. Ensuite, une matrice d'interactions double-hybride a été effectuée avec les cinq protéines PTS et les protéines du système à deux composants BvrR/BvrS. Enfin, des constructions permettant l'obtention de délétants ont été fabriquées pour chacune des cinq ORF *PTS* en vue de leur analyse phénotypique ultérieure.

L'analyse génomique nous a révélé que *B. melitensis* 16M ne possède pas de système PTS complet classique. En effet, on ne retrouve pas d'enzyme EIIB ni de perméase EIIC. Par contre, cinq ORF ont été identifiées comme étant spécifiques du système PTS (*EI*^{ntr}, *EIIA*^{m},

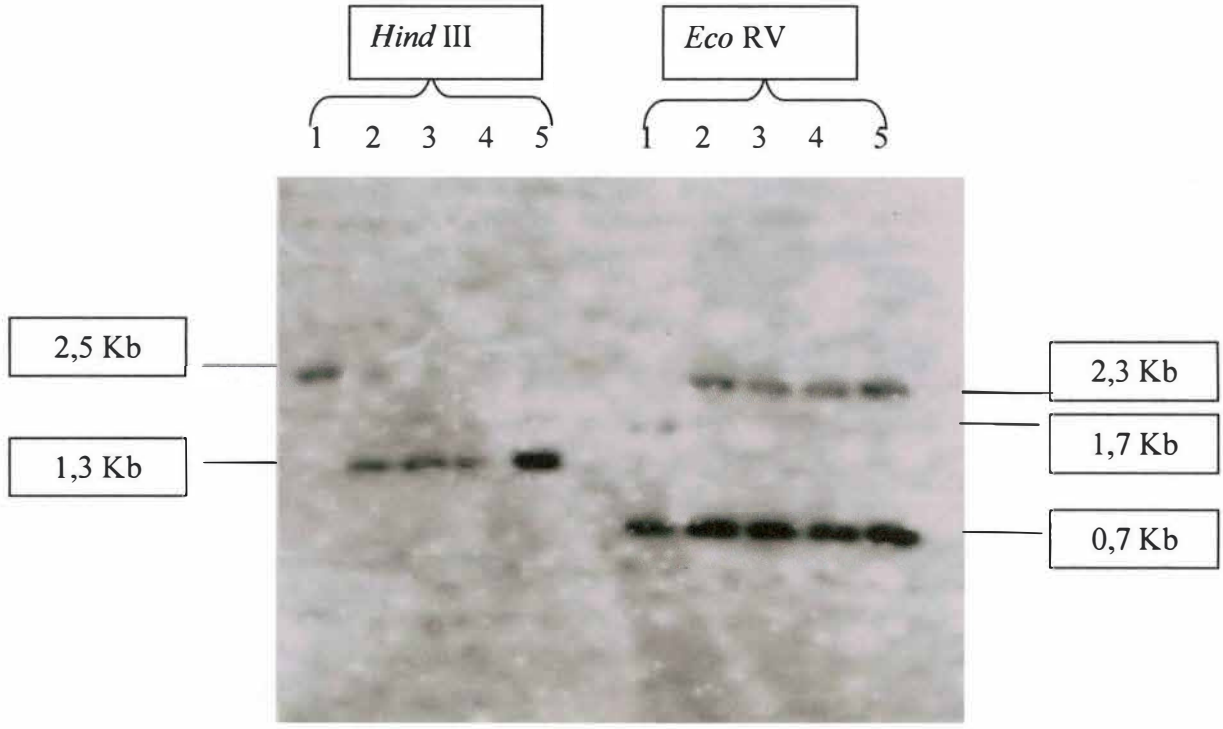


Fig. 35. Southern blot effectué sur les candidats Δ*NPr* avec comme sonde le produit PCR de la région "amont" de *NPr*. L'ADN génomique des candidats mutants 2, 3, 4, et 5 a été restreint par les enzymes *Hind* III et *Eco* RV. La bande attendue avec *Hind* III est à 1,3 Kb et les bandes attendues avec *Eco* RV sont à 2,3 Kb et 0,7 Kb. Les pistes 1 correspondent à la restriction de l'ADN génomique de la souche sauvage *B. melitensis* 16M avec les enzymes *Hind* III et *Eco* RV, utilisée comme contrôle négatif. La bande attendue pour *Hind* III est à 2,5 Kb et celles attendues pour *Eco* RV sont à 1,7 Kb et 0,7 Kb. M = marqueur de taille moléculaire.

HprK/P, Hpr, EIIA^{ntr}). L'analyse de l'ORF *Hpr* montre qu'elle est vraisemblablement mal annotée puisque l'étude de ses homologues en fait un excellent candidat *Npr*. De plus, autour de la sérine conservée de la protéine encodée par cette ORF se retrouve un consensus aminé probablement reconnu par HprK/P. Ces données nous ont permis de postuler un modèle où l'on retrouve la voie complète du système PTS spécifique du métabolisme azoté (PEP, EI^{ntr}, Npr, EIIA^{ntr}) complétée par une bifurcation entre la protéine Npr et les protéine HprK/P et EIIA^{m}.

Grâce au test double-hybride, deux types d'interactions ont été révélés. Les interactions liant deux partenaires différents et celles formant des homomultimères. Deux couples de partenaires ont été identifiés : la protéine HprK/P avec Npr et les deux membres du système à deux composants BvrR et BvrS. Seule l'interaction entre HprK/P et Npr s'est révélée significative quel que soit le partenaire lié au domaine de liaison à l'ADN. Trois protéines forment des homomultimères: EI^{ntr}, EIIA^{m} et HprK/P.

En ce qui concerne les cinq mutants de délétion, un seul, le délétant *NPr* a pu être obtenu et vérifié. Par ailleurs, des candidats mutants de *B. melitensis* délétés pour l'ORF *EIIA*^{m} ont pu être repiqués sur milieu sélectif et doivent encore être validés par PCR et Southern blot. Pour les trois autres ORF, nous disposons des vecteurs permettant la construction de délétants.

Discussion et Perspectives

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. DISCUSSION

L'analyse bioinformatique réalisée au cours de la première partie de ce travail nous a permis de postuler l'existence d'une voie de transduction du signal PTS fonctionnelle chez *B. melitensis* 16M. Néanmoins, l'absence de plusieurs constituants spécifiques des systèmes PTS chez *Brucella*, ainsi que chez la plupart des α-protéobactéries, nous oblige à penser que ce système n'intervient pas directement dans les fonctions classiques de transport et de phosphorylation des sucres comme c'est le cas, par exemple, chez *E. coli* ou *B. subtilis*. Nous pensons néanmoins que ce système chez *B. melitensis* est directement impliqué dans le métabolisme central. Actuellement, rien n'a encore été décrit à ce sujet chez les α-protéobactéries mais plusieurs éléments nous permettent d'appuyer notre hypothèse. La conservation, chez toutes les α-protéobactéries, des cinq partenaires PTS identifiés chez *Brucella* ainsi que leur organisation génomique est un premier élément nous permettant de postuler que ces protéines conservent une fonction chez *Brucella*. L'existence de deux mutants pour des ORF du système PTS atténués en modèles cellulaires et le lien qui en résulte entre la virulence de *Brucella* et le système PTS sont une seconde indication. Chez *Legionella pneumophila* la mutation pour l'ORF *EI*^{ntr}, présente également chez *Brucella,* est caractérisée par une diminution de sa capacité réplicative au sein des macrophages de cobaye (Higa and Edelstein, 2001). Ce travail est en ce sens tout à fait innovant car, d'une part, il présente un nouveau système de transduction du signal chez le genre *Brucella* et, d'autre part, il propose un modèle tout à fait particulier puisqu'il n'a encore été décrit chez aucun genre bactérien.

Nous proposons que le système PTS de *Brucella* résulte d'un chimérisme entre ce que l'on retrouve chez le bactéries à Gram – et les bactéries à Gram +. Pour rappel, les bactéries à Gram – et + se distinguent par plusieurs particularités de leur système PTS respectif. Par exemple, la voie impliquant le métabolisme azoté est tout à fait typique des bactéries à Gram –, tandis que la kinase HprK/P est le médiateur central de la RCC chez les bactéries à Gram +. Ces deux exemples n'ont pas été choisis au hasard puisqu'ils décrivent précisément ce que l'on retrouve chez *B. melitensis*, c'est-à-dire trois protéines spécifiques du métabolisme azoté (EI^{ntr}, Npr et EIIA^{ntr}) ainsi qu'une kinase HprK/P.

La ligne conductrice de ce travail a donc été de contribuer concrètement au renforcement du modèle que nous avons proposé. Les résultats obtenus répondent à cette attente. En effet, le test double-hybride a confirmé l'existence d'une interaction hautement significative entre la kinase HprK/P et la protéine Npr. Pour rappel, chez les bactéries à Gram + telles que *B. subtilis*, la kinase HprK/P phosphoryle la sérine 46 de la protéine Hpr pour que cette dernière puisse notamment interagir avec le régulateur transcriptionnel global CcpA dans le cadre de la RCC (Deutscher *et al.*, 1995). Cette réaction est typique des bactéries à Gram +. Lors de nos tests, l'interaction entre HprK/P et Npr a allumé les deux

gènes rapporteurs quel que soit le partenaire fusionné au domaine d'activation et ce avec une intensité très importante. Cette observation a pu être reproduite. Ces partenaires semblent donc s'associer spécifiquement avec une forte affinité. Ce résultat corrobore ainsi une activité de HprK/P chez la bactérie à Gram – du genre *Brucella*. Cependant, selon Boël & Deutscher (2003) *Brucella*, comme beaucoup d'autres bactéries à Gram – incluant notamment des α-, β-, γ- et λ-protéobactéries, est dépourvue de la protéine CcpA. Néanmoins, une recherche par homologie indique qu'un homologue potentiel de la protéine CcpA semble exister chez *B. melitensis* Si la considération de Boël et Deutscher s'avère correcte, cela indiquerait, *a priori*, que HprK/P chez *Brucella* n'est pas impliquée dans la RCC. Rappelons que, chez les bactéries à Gram –, la voie d'activation de la RCC au niveau transcriptionnel implique le médiateur Crp. Le maintien de l'état phosphorylé de l'enzyme $EIIA^{glc}$ d'*E. coli* induit l'activation de l'adénylate cyclase qui produit alors de l'AMPc. Cet AMPc se lie au médiateur Crp et active la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme des sources carbonées secondaires si elles sont présentes. Deux grandes voies d'activation de la RCC existent donc chez les bactéries : la voie d'activation médiée par la protéine CcpA qui est typique des bactérie à Gram + à faible contenu en GC et la voie d'activation impliquant le médiateur Crp que l'on ne retrouve que chez des bactéries à Gram -. Bien que *Brucella* soit une bactérie à Gram -, son génome ne présente ni l'ORF encodant la protéine $EIIA^{glc}$, ni le médiateur Crp ni même l'adénylate cyclase. Il semble donc que chez *Brucella*, la voie d'activation de la RCC impliquant le médiateur Crp ne soit pas fonctionnelle. Néanmoins, la présence d'un homologue très similaire à la protéine CcpA a pu être mise en évidence dans le génome de *Brucella*, ce qui nous permet de penser qu'il est probable que la régulation de la RCC, chez cette bactérie, passe par la voie impliquant la protéine CcpA. De plus, d'autres membres de la famille LacI/GalR, à laquelle appartient CcpA, sont également présents dans le génome de *Brucella*. Nous posons l'hypothèse qu'un des membres de la famille LacI/GalR présent chez *Brucella* pourrait substituer la protéine CcpA dans le cadre de la RCC. Dans tous les cas, une fois phosphorylée par HprK/P, Npr doit présenter des interactants. Nous avons ainsi mis en évidence une voie PTS "perpendiculaire" opérante chez *B.melitensis* et pour laquelle nous envisageons un rôle dans la RCC, même si nous ignorons quels sont les constituants protéiques et/ou les inducteurs localisés en amont et en aval de cette voie.

L'analyse des domaines de la protéine HprK/P s'est révélée instructive. Chez *Brucella*, comme chez toute les α-protéobactéries, cette enzyme bifonctionnelle est tronquée dans la quasi totalité de sa partie amino-terminale et ne correspond donc qu'à la partie carboxy-terminale de la protéine complète retrouvée chez les autres bactéries . Actuellement, la fonction et l'importance de ce domaine N-terminal restent obscures (Fieulaine *et al.*, 2001), bien que certains pensent qu'il soit impliqué dans la multimérisation de la protéine (Warner and Lolkema, 2003). Cette dernière hypothèse s'est révélée fausse puisque nous avons montré que HprK/P homomultimérisait chez *B. melitensis* malgré l'absence de ce domaine N-terminal. Par contre, il est permis de penser que ce domaine contienne le site de liaison au fructose-1,6-biphosphate (FBP). Rappelons que l'activité kinase de HprK/P chez *B. subtilis* est stimulée par ce métabolite. A ce jour, le site de liaison de cet inducteur avec HprK/P n'est pas encore caractérisé mais une étude cristallographique de la partie C-terminale de HprK/P rapporte qu'aucun site de liaison au FBP n'y apparaît (Fieulaine *et al.*, 2001). Notons qu'il est curieux de constater que la phosphofructokinase, enzyme de la glycolyse qui catalyse la phosphorylation du fructose-1-phosphate en FBP) est manquante chez la plupart des α-protéobactéries auxquelles il manque ce domaine N-terminal. L'absence de cette enzyme implique que la voie glycolytique de ces bactéries est incomplète. Ces observations suggèrent que d'autres signaux métaboliques constituent les stimuli activant la protéine HprK/P du système PTS de *Brucella*.

La matrice du double-hybride n'a pas mis en évidence d'interaction entre les autres partenaires spécifiques du système PTS identifiés chez *Brucella* mais cela n'est pas une preuve que ces interactions n'existent pas. Le test du double-hybride présente en effet certaines limitations. Il ne détecte pas facilement, par exemple, d'interaction nécessitant une modification post-traductionnelle, telle qu'une phosphorylation, sur l'un des deux partenaires impliqués. Comme le système PTS est avant tout une chaîne de transfert de groupement phosphate, nous pensons qu'il est probable que les différentes protéines qui le constituent n'interagissent entre elles que sous leur forme phosphorylée. Cette hypothèse expliquerait pourquoi nous n'avons pas mis en évidence d'interaction entre les protéines PTS EI^{ntr}, Npr, $EIIA^{m}$ et $EIIA^{ntr}$.

L'un des buts de ce travail était de coupler l'existence d'un lien entre le système PTS et la virulence de *Brucella*. Le SDC BvrR/BvrS est impliqué dans la modulation du métabolisme nécessaire pour permettre à la bactérie de transiter entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire (Guzman-Verri *et al.*, 2002). Ce système régule notamment l'expression des protéines Omp déterminant les propriétés physicochimiques de la membrane externe (Moriyon and Lopez-Goni, 1998). Les fonctions de ce système en font un acteur essentiel de la virulence de *Brucella*. Il a en effet été démontré que des mutants BvrR/BvrS étaient avirulents en souris, montraient une capacité invasive réduite en milieu cellulaire et étaient incapables d'empêcher la fusion avec les lysosomes et de se répliquer dans les cellules (Sola-Landa *et al.*, 1998). Dans le génome de *Brucella*, les ORF encodant les protéines de ce SDC sont localisées à proximité de celles encodant les protéines PTS $EIIA^{m}$, Npr et HprK/P. Cette observation suggère que ces protéines interagissent entre elles (Hu and Saier, 2002). Il a récemment été proposé (Boel *et al.*, 2003) que Hpr-ser-P transférait son groupement phosphate sur $EIIA^{m}$ pour que celle-ci puisse contrôler ChvG/ChvI, l'homologue du SDC BvrR/BvrS chez *A. tumefasiens*. En incorporant BvrR/BvrS dans notre matrice d'interaction double-hybride, nous avons testé si ces deux protéines interagissaient effectivement avec une ou plusieurs de nos protéines PTS. Bien que le résultat soit négatif, rien ne nous indique, de nouveau, que cette interaction n'existe pas.

Les mutants délétés pour les ORF *PTS* construits au cours de ce travail devaient permettre d'étudier le phénotype de *B. melitensis* en modèles cellulaires pour évaluer l'impact de ces mutations sur sa virulence. Les cinq constructions ont été obtenues avec succès et vérifiées par séquençage. Ainsi, cinq plasmides contenant les séquences "amont" et "aval" des ORF *PTS* d'intérêt fusionnées à la cassette de résistance *aphA4* sont prêts à être transférés par conjugaison chez *B. melitensis* 16M pour déléter les gènes correspondants. Bien que cette dernière étape figurait parmi les objectifs de ce travail, elle n'a pu être réalisée. En effet, le transfert conjugatif de nos constructions dans *B. melitensis* s'est avéré être une étape limitante de la manipulation. Le fait que ce transfert conjugatif ait échoué pour les constructions EI^{ntr}, $EIIA^{ntr}$ et HprK/P pose l'hypothèse que ces gènes sont peut-être essentiels chez *Brucella*. Cependant, l'existence de deux mutants disruptés pour les ORF EI^{ntr} et $EIIA^{ntr}$ (Delrue *et al.*, 2004) rend caduque cette proposition. Bien que nous suspectons que le problème soit d'ordre technique, les raisons de la très faible efficience de cette réaction sont encore inconnues.

2. PERSPECTIVES

Dans un premier temps, la construction des mutants pour les ORF *PTS* EI^{ntr}, $EIIA^{m}$, $EIIA^{ntr}$ et *HprK/P* de *B. melitensis* devra être terminée afin de tester l'effet de telles mutations sur la virulence et le métabolisme de *Brucella.* D'une part, nous réaliserons des cinétiques d'infection en modèles cellulaires et murin. Dans le cas d'une atténuation de nos mutants, une complémentation par expression d'une copie sauvage du gène muté sera effectuée afin de restaurer le phénotype de virulence sauvage. D'autre part, nous caractériserons davantage nos mutants par divers tests de croissance *in vitro* (croissance sur différentes sources de carbone, d'azote,...).

Ensuite, dans le but de confirmer les résultats obtenus lors des tests d'interaction entre les différents partenaires PTS, des expériences de co-immunoprécipitation devront être réalisées. En outre, il serait intéressant d'identifier d'autres partenaires du système PTS. Dans cette optique, plusieurs approches peuvent être utilisées. Un crible en double-hybride visant à identifier des régulateurs transcriptionnels interagissant avec nos protéines d'intérêt pourrait être réalisé puisque nous disposons au laboratoire de l'ORFéome complet de *B. melitensis* 16M (Dricot, A.; *in press*). Cette expérience permettrait notamment d'identifier le ou les régulateur(s) de la RCC chez *Brucella* ainsi que d'autres régulateurs impliqués dans d'autres réseaux métaboliques. Une deuxième approche à grande échelle consisterait à utiliser une banque de domaines protéiques de *Brucella* dans un crible double-hybride contre nos protéines d'intérêt. Cette dernière méthode nous permettrait d'identifier davantage de partenaires du système PTS.

Enfin, une autre manière de valider notre modèle PTS chez *Brucella* consisterait à réaliser des tests de phosphorylation *in vitro* entre les différents partenaires PTS. Cette méthode nous permettrait de confirmer la chaîne de phosphorylation prédite entre nos différents partenaires protéiques. Par ailleurs, des interactions identifiées entre les protéines centrales du PTS et des protéines identifiées lors de cribles décrits plus haut pourraient également être affinées par l'utilisation des tests de phosphorylation *in vitro*.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

Aravind, L. & Ponting, C. P. The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci* 22, 458-9 (1997).

Bakal, C. J. & Davies, J. E. No longer an exclusive club: eukaryotic signalling domains in bacteria. *Trends Cell Biol* 10, 32-8 (2000).

Boel, G., Mijakovic, I., Maze, A., Poncet, S., Taha, M. K., Larribe, M., Darbon, E., Khemiri, A., Galinier, A. & Deutscher, J. Transcription regulators potentially controlled by HPr kinase/phosphorylase in Gram-negative bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 5, 206-15 (2003).

Boschiroli, M. L., Foulongne, V. & O'Callaghan, D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* 4, 58-64 (2001).

Bruckner, R. & Titgemeyer, F. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol Lett* 209, 141-8 (2002).

Busby, S. & Ebright, R. H. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* 293, 199-213 (1999).

Calera, J. A., Zhao, X. J. & Calderone, R. Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the SSK1 response regulator gene in Candida albicans. *Infect Immun* 68, 518-25 (2000).

Charles, T. C. & Nester, E. W. A chromosomally encoded two-component sensory transduction system is required for virulence of Agrobacterium tumefaciens. *J Bacteriol* 175, 6614-25 (1993).

Chopade, B. A., Shankar, S., Sundin, G. W., Mukhopadhyay, S. & Chakrabarty, A. M. Characterization of membrane-associated Pseudomonas aeruginosa Ras-like protein Pra, a GTP-binding protein that forms complexes with truncated nucleoside diphosphate kinase and pyruvate kinase to modulate GTP synthesis. *J Bacteriol* 179, 2181-8 (1997).

Cornilescu, G., Lee, B. R., Cornilescu, C. C., Wang, G., Peterkofsky, A. & Clore, G. M. Solution structure of the phosphoryl transfer complex between the cytoplasmic A domain of the mannitol transporter IIMannitol and HPr of the Escherichia coli phosphotransferase system. *J Biol Chem* 277, 42289-98 (2002).

Delrue, R. M., Lestrate, P., Tibor, A., Letesson, J. J. & De Bolle, X. Brucella pathogenesis, genes identified from random large-scale screens. *FEMS Microbiol Lett* 231, 1-12 (2004).

Deutscher, J. & Saier, M. H., Jr. ATP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation of a seryl residue in HPr, a phosphate carrier protein of the phosphotransferase system in Streptococcus pyogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 6790-4 (1983).

Deutscher, J., Pevec, B., Beyreuther, K., Kiltz, H. H. & Hengstenberg, W. Streptococcal phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system: amino acid sequence and site of ATP-dependent phosphorylation of HPr. *Biochemistry* 25, 6543-51 (1986).

Deutscher, J., Kuster, E., Bergstedt, U., Charrier, V. & Hillen, W. Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 15, 1049-53 (1995).

Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H. & Elledge, S. J. The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* 7, 555-69 (1993).

Erni, B., Zanolari, B. & Kocher, H. P. The mannose permease of Escherichia coli consists of three different proteins. Amino acid sequence and function in sugar transport, sugar phosphorylation, and penetration of phage lambda DNA. *J Biol Chem* 262, 5238-47 (1987).

Fieulaine, S., Morera, S., Poncet, S., Monedero, V., Gueguen-Chaignon, V., Galinier, A., Janin, J., Deutscher, J. & Nessler, S. X-ray structure of HPr kinase: a bacterial protein kinase with a P-loop nucleotide-binding domain. *Embo J* 20, 3917-27 (2001).

Fraser, C. M., Norris, S. J., Weinstock, G. M., White, O., Sutton, G. G., Dodson, R., Gwinn, M., Hickey, E. K., Clayton, R., Ketchum, K. A., Sodergren, E., Hardham, J. M., McLeod, M. P., Salzberg, S., Peterson, J., Khalak, H., Richardson, D., Howell, J. K., Chidambaram, M., Utterback, T., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Cotton, M. D., Venter, J. C. & et al. Complete genome sequence of Treponema pallidum, the syphilis spirochete. *Science* 281, 375-88 (1998).

Guzman-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Parra, A., Cloeckaert, A., Garin, J., Gorvel, J. P., Moriyon, I., Moreno, E. & Lopez-Goni, I. The two-component system BvrR/BvrS essential for Brucella abortus virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12375-80 (2002).

Hanlon, W. A., Inouye, M. & Inouye, S. Pkn9, a Ser/Thr protein kinase involved in the development of Myxococcus xanthus. *Mol Microbiol* 23, 459-71 (1997).

Hartzell, P. & Kaiser, D. Function of MglA, a 22-kilodalton protein essential for gliding in Myxococcus xanthus. *J Bacteriol* 173, 7615-24 (1991).

Henkin, T. M. The role of CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in Bacillus subtilis. *FEMS Microbiol Lett* 135, 9-15 (1996).

Higa, F. & Edelstein, P. H. Potential virulence role of the Legionella pneumophila ptsP ortholog. *Infect Immun* 69, 4782-9 (2001).

Hoch, J. A. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* 3, 165-70 (2000).

Hu, K. Y. & Saier, M. H., Jr. Phylogeny of phosphoryl transfer proteins of the phosphoenolpyruvate-dependent sugar-transporting phosphotransferase system. *Res Microbiol* 153, 405-15 (2002).

Hunter, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80, 225-36 (1995).

Jia, Z., Quail, J. W., Delbaere, L. T. & Waygood, E. B. Structural comparison of the histidine-containing phosphocarrier protein HPr. *Biochem Cell Biol* 72, 202-17 (1994).

Jin, S., Ishimoto, K. & Lory, S. Nucleotide sequence of the rpoN gene and characterization of two downstream open reading frames in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* 176, 1316-22 (1994).

Kalbitzer, H. R., Hengstenberg, W., Rosch, P., Muss, P., Bernsmann, P., Engelmann, R., Dorschug, M. & Deutscher, J. HPr proteins of different microorganisms studied by hydrogen-1 high-resolution nuclear magnetic resonance: similarities of structures and mechanisms. *Biochemistry* 21, 2879-85 (1982).

Kennelly, P. J. & Potts, M. Life among the primitives: protein O-phosphatases in prokaryotes. *Front Biosci* 4, D372-85 (1999).

Kukuruzinska, M. A., Harrington, W. F. & Roseman, S. Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Studies on the molecular weight and association of enzyme I. *J Biol Chem* 257, 14470-6 (1982).

Lengeler, J., Auburger, A. M., Mayer, R. & Pecher, A. The phosphoenolpyruvate-dependent carbohydrate: phosphotransferase system enzymes II as chemoreceptors in chemotaxis of Escherichia coli K 12. *Mol Gen Genet* 183, 163-70 (1981).

Lengeler, J. W. & Vogler, A. P. Molecular mechanisms of bacterial chemotaxis towards PTS-carbohydrates. *FEMS Microbiol Rev* 5, 81-92 (1989).

Lengeler, J. W., Titgemeyer, F., Vogler, A. P. & Wohrl, B. M. Structures and homologies of carbohydrate: phosphotransferase system (PTS) proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 326, 489-504 (1990).

Lux, R., Jahreis, K., Bettenbrock, K., Parkinson, J. S. & Lengeler, J. W. Coupling the phosphotransferase system and the methyl-accepting chemotaxis protein-dependent chemotaxis signaling pathways of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11583-7 (1995).

Martinez-Argudo, I., Little, R., Shearer, N., Johnson, P. & Dixon, R. The NifL-NifA System: a multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals. *J Bacteriol* 186, 601-10 (2004).

Martin-Verstraete, I., Debarbouille, M., Klier, A. & Rapoport, G. Levanase operon of Bacillus subtilis includes a fructose-specific phosphotransferase system regulating the expression of the operon. *J Mol Biol* 214, 657-71 (1990).

Martin-Verstraete, I., Charrier, V., Stulke, J., Galinier, A., Erni, B., Rapoport, G. & Deutscher, J. Antagonistic effects of dual PTS-catalysed phosphorylation on the Bacillus subtilis transcriptional activator LevR. *Mol Microbiol* 28, 293-303 (1998).

Michiels, J., Van Soom, T., D'Hooghe, I., Dombrecht, B., Benhassine, T., de Wilde, P. & Vanderleyden, J. The Rhizobium etli rpoN locus: DNA sequence analysis and phenotypical characterization of rpoN, ptsN, and ptsA mutants. *J Bacteriol* 180, 1729-40 (1998).

Miller, V. L. & Mekalanos, J. J. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in Vibrio cholerae requires toxR. *J Bacteriol* 170, 2575-83 (1988).

Mizuno, T. Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of Escherichia coli. *DNA Res* 4, 161-8 (1997).

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

Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M. & Mayer, H. Brucella abortus 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J Bacteriol* 172, 3569-76 (1990).

Moriyon, I. & Lopez-Goni, I. Structure and properties of the outer membranes of Brucella abortus and Brucella melitensis. *Int Microbiol* 1, 19-26 (1998).

Munoz-Dorado, J., Inouye, S. & Inouye, M. A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of M. xanthus, a gram-negative bacterium. *Cell* 67, 995-1006 (1991).

Niwano, M. & Taylor, B. L. Novel sensory adaptation mechanism in bacterial chemotaxis to oxygen and phosphotransferase substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 11-5 (1982).

O'Callaghan, D. & MacMillan, A. Brucella. *Animal and Ectoparasitic infections.* A. Press. 94 (2001)

Parkinson, J. S. & Kofoid, E. C. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet* 26, 71-112 (1992).

Perraud, A. L., Weiss, V. & Gross, R. Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol* 7, 115-20 (1999).

Pizzaro-Cerdà, J. E. & Moreno, E. Brucella abortus invasion and survival within professional and nonprofessional phagocytes. *Advances in cell and molecular biology of membranes and organelles* J. P. Inc. 6: 201-232 (1999).

Pocalyko, D. J., Carroll, L. J., Martin, B. M., Babbitt, P. C. & Dunaway-Mariano, D. Analysis of sequence homologies in plant and bacterial pyruvate phosphate dikinase, enzyme I of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system and other PEP-utilizing enzymes. Identification of potential catalytic and regulatory motifs. *Biochemistry* 29, 10757-65 (1990).

Postma, P. W., Lengeler, J. W. & Jacobson, G. R. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* 57, 543-94 (1993).

Powell, B. S., Court, D. L., Inada, T., Nakamura, Y., Michotey, V., Cui, X., Reizer, A., Saier, M. H., Jr. & Reizer, J. Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the rpoN operon of Escherichia coli. Enzyme IIANtr affects growth on organic nitrogen and the conditional lethality of an erats mutant. *J Biol Chem* 270, 4822-39 (1995).

Rabus, R., Reizer, J., Paulsen, I. & Saier, M. H., Jr. Enzyme I(Ntr) from Escherichia coli. A novel enzyme of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system exhibiting strict specificity for its phosphoryl acceptor, NPr. *J Biol Chem* 274, 26185-91 (1999).

Reizer, A., Pao, G. M. & Saier, M. H., Jr. Evolutionary relationships among the permease proteins of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. Construction of phylogenetic trees and possible relatedness to proteins of eukaryotic mitochondria. *J Mol Evol* 33, 179-93 (1991).

Saier, M. H., Jr. & Reizer, J. The bacterial phosphotransferase system: new frontiers 30 years later. *Mol Microbiol* 13, 755-64 (1994).

Saier, M. H., Jr., Yamada, M., Erni, B., Suda, K., Lengeler, J., Ebner, R., Argos, P., Rak, B., Schnetz, K., Lee, C. A. & et al. Sugar permeases of the bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: sequence comparisons. *Faseb J* 2, 199-208 (1988).

Segura, D. & Espin, G. Mutational inactivation of a gene homologous to Escherichia coli ptsP affects poly-beta-hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in Azotobacter vinelandii. *J Bacteriol* 180, 4790-8 (1998).

Shankar, S., Kapatral, V. & Chakrabarty, A. M. Mammalian heterotrimeric G-protein-like proteins in mycobacteria: implications for cell signalling and survival in eukaryotic host cells. *Mol Microbiol* 26, 607-18 (1997).

Shi, L., Potts, M. & Kennelly, P. J. The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait. *FEMS Microbiol Rev* 22, 229-53 (1998).

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

Sonenshein, A. L. Control of sporulation initiation in Bacillus subtilis. *Curr Opin Microbiol* 3, 561-6 (2000).

Strauch, M. A., Perego, M., Burbulys, D. & Hoch, J. A. The transition state transcription regulator AbrB of Bacillus subtilis is autoregulated during vegetative growth. *Mol Microbiol* 3, 1203-9 (1989).

Stulke, J., Arnaud, M., Rapoport, G. & Martin-Verstraete, I. PRD--a protein domain involved in PTS-dependent induction and carbon catabolite repression of catabolic operons in bacteria. *Mol Microbiol* 28, 865-74 (1998).

Tchieu, J. H., Norris, V., Edwards, J. S. & Saier, M. H., Jr. The complete phosphotranferase system in Escherichia coli. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3, 329-46 (2001).

Umeyama, T. & Horinouchi, S. Autophosphorylation of a bacterial serine/threonine kinase, AfsK, is inhibited by KbpA, an AfsK-binding protein. *J Bacteriol* 183, 5506-12 (2001).

Umeyama, T., Lee, P. C. & Horinouchi, S. Protein serine/threonine kinases in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in Streptomyces. *Appl Microbiol Biotechnol* 59, 419-25 (2002).

Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. Two-component systems in plant signal transduction. *Trends Plant Sci* 5, 67-74 (2000).

van den Bogaard, P. T., Kleerebezem, M., Kuipers, O. P. & de Vos, W. M. Control of lactose transport, beta-galactosidase activity, and glycolysis by CcpA in Streptococcus thermophilus: evidence for carbon catabolite repression by a non-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system sugar. *J Bacteriol* 182, 5982-9 (2000).

van Montfort, R. L. & Dijkstra, B. W. The functional importance of structural differences between the mannitol-specific IIAmannitol and the regulatory IIAnitrogen. *Protein Sci* 7, 2210-6 (1998).

Van Mullem, V., Wery, M., De Bolle, X. & Vandenhaute, J. Construction of a set of Saccharomyces cerevisiae vectors designed for recombinational cloning. *Yeast* 20, 739-46 (2003).

Walhout, A. J. & Vidal, M. High-throughput yeast two-hybrid assays for large-scale protein interaction mapping. *Methods* 24, 297-306 (2001).

Wang, Z. X. & Wu, J. W. Autophosphorylation kinetics of protein kinases. *Biochem J* 368, 947-52 (2002).

Warner, J. B. & Lolkema, J. S. CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 475-90 (2003).

Welch, M., Chinardet, N., Mourey, L., Birck, C. & Samama, J. P. Structure of the CheY-binding domain of histidine kinase CheA in complex with CheY. *Nat Struct Biol* 5, 25-9 (1998).

West, A. H. & Stock, A. M. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* 26, 369-76 (2001).

Young, E. J. An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis* 21, 283-9; quiz 290 (1995).

Zhang, C. C., Friry, A. & Peng, L. Molecular and genetic analysis of two closely linked genes that encode, respectively, a protein phosphatase 1/2A/2B homolog and a protein kinase homolog in the cyanobacterium Anabaena sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* 180, 2616-22 (1998).

16 JUIN 2004

SECRETARIAT BIOLOGIE
F.U.N.D.P.
Rue de Bruxelles, 59
B 5000 NAMUR (Belgique)
Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20