



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Elaboration de tests de sécrétion pour les effecteurs impliqués dans le trafic intracellulaire de *Brucella melitensis* 16M

Codutti, Vanessa

*Award date:*  
2007

[Link to publication](#)

#### General rights

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

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

#### Take down policy

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



---

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

**Faculté des Sciences**

**ELABORATION DE TESTS DE SECRETION POUR LES EFFECTEURS  
IMPLIQUES DANS LE TRAFIC INTRACELLULAIRE DE  
*BRUCELLA MELITENSIS* 16M**

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

Vanessa CODUTTI

Juin 2007

**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>

## **Elaboration de tests de sécrétion pour les effecteurs impliqués dans le trafic intracellulaire de *Brucella melitensis* 16M**

CODUTTI Vanessa

### Résumé

Les bactéries du genre *Brucella* sont des pathogènes intracellulaires facultatifs responsables de la brucellose, une zoonose largement répandue chez les mammifères, y compris l'homme qui est un hôte accidentel. Une fois internalisées par une cellule hôte eucaryote, ces bactéries ont la capacité de détourner le trafic intracellulaire des vésicules d'endocytose. En effet, le phagosome contenant la bactérie interagit avec les endosomes précoces mais ne fusionne pas par la suite avec le lysosome, organite cellulaire où a lieu la dégradation des nutriments et des pathogènes. Le détournement du trafic aboutit à l'établissement d'une niche de réplication dérivée des membranes du réticulum endoplasmique.

En vue d'identifier des protéines bactériennes sécrétées qui seraient impliquées dans ce détournement du trafic vésiculaire induit par *Brucella*, la construction de protéines de fusion a été mise en œuvre au cours de ce mémoire. Chaque effecteur putatif est fusionné à une étiquette qui devrait permettre de tester la sécrétion de cette protéine. L'étiquette CyaA' a été choisie pour ce travail. CyaA' est une adénylate cyclase capable de convertir l'ATP en AMP cyclique en présence de calmoduline eucaryote. L'activité est donc détectable uniquement si l'effecteur est transloqué dans une cellule hôte. Le but de ces protéines de fusion est de mettre en évidence parmi les effecteurs putatifs de *Brucella* ceux qui sont sécrétés au cours d'une infection. Au cours de ce travail, nous avons construit les séquences codantes de fusion, nous avons transféré les plasmides porteurs de ces fusions chez *Brucella melitensis* 16M et nous avons effectué des tests d'activité adénylate cyclase.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2007

Promoteur : X. De Bolle

## Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble du laboratoire de l'Unité de Recherche en Biologie Moléculaire pour nous avoir si bien intégré et aidé durant ces quelques mois. Les sourires et les petits mots des uns et des autres ont rendu ce mémoire plus agréable.

Merci à messieurs Letesson et De Bolle de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire où j'ai pu découvrir les joies et les difficultés de la biologie moléculaire. Un remerciement tout particulier à monsieur De Bolle pour sa gentillesse et le temps consacré à la correction de ce mémoire. Merci également aux membres du jury pour le temps qu'ils passeront à lire ce manuscrit.

Je n'ai pas révolutionné la science comme dirait Gégé mais j'ai beaucoup appris grâce à toi Didier. Merci de m'avoir encadrée et transmis une partie de tes connaissances et de ton savoir-faire. Merci surtout d'avoir eu la patience dont tu as fait preuve pour m'expliquer certaines choses. Alex ce fut un plaisir de partager un bout de ma paillasse et quelques discussions avec toi. "Mettons-les au travail tout ces jeunes qui se prélassent au soleil". Gégé je te fais confiance pour révolutionner le monde scientifique et merci pour ta sympathie.

Merci à vous mes "collègues" mémorant car ce mémoire n'aurait pas eu la même saveur sans vous. Merci pour votre soutien et tout les bons moments partagés. Miraaaaaaabel...je t'ai eu. Sans toi, je ne pense pas que j'aurais découvert autant de trucs et astuces sur Word ! Milou, Aurore, Julie, Francis et Fanélie rien qu'en écrivant vos noms il y a plein de rigolades et de soirées qui me viennent à l'esprit mais celles-ci sont trop longues à énumérer alors je vous dis tout simplement merci pour me laisser de si bons souvenirs. Géraldine merci pour ta générosité et pour avoir été présente à chaque moment bon ou mauvais. Pour ces quatre belles années d'étude merci aussi à Pauline, Stéphanie, Charles (merci pour les cultures et autres petits services), Marie, Jacques, Thibaut, Lionel, Laurent et Sophie.

Ce ne fut pas le printemps tous les jours mais je garderais de très bons souvenirs de ce mémoire et de l'ensemble de mes études à Namur. Merci à mes parents sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Merci aussi à mes grands-parents pour leurs encouragements.

## Liste des abréviations

---

<b>AMP</b>	Adénosine monophosphate
<b>AMPC</b>	Adénosine monophosphate cyclique
<b>Amp<sup>R</sup></b>	Résistance à l'ampicilline
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>C-terminal</b>	Extrémité carboxy (COOH) terminale d'une protéine
<b>Cm<sup>R</sup></b>	Résistance au chloramphénicol
<b>ddNTP</b>	Didésoxyribonucléotide triphosphate
<b>dNTP</b>	Désoxyribonucléotide triphosphate
<b>DO</b>	Densité optique
<b>EDTA</b>	Acide éthylène diamine tétra-acétique
<b>GW</b>	Cassette Gateway
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
<b>kb</b>	Kilobase
<b>LAMP-1</b>	Lysosome associated membrane protein-1
<b>LB</b>	Milieu Luria Bertani
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>N-terminal</b>	Extrémité amino (NH <sub>2</sub> ) terminale d'une protéine
<b>Nal</b>	Acide nalidixique
<b>ORF</b>	Open reading frame (phase ouverte de lecture)
<b>pb</b>	Paires de bases
<b>PBS</b>	Tampon phosphate isotonique
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction (réaction en chaîne de polymérase)
<b>qsp</b>	Quantité suffisante pour
<b>rpm</b>	Rotations par minute
<b>SST4</b>	Système de sécrétion de type IV
<b>TBS</b>	Tampon tris isotonique
<b>Temed</b>	Tétraméthyléthylènediamine
<b>Tlp</b>	<i>TIR-like protein</i>
<b>Tm</b>	Température d'hybridation
<b>U</b>	Unité enzymatique
<b>VCB</b>	Vacuole contenant <i>Brucella</i>
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranoside
<b>5-FOA</b>	Acide 5-Fluoro-orotique

## Table des matières

<i>Introduction</i> .....	1
1. Avant-propos.....	2
2. <i>Brucella</i> spp. ....	2
2.1. Caractéristiques générales.....	2
2.2. Taxonomie .....	2
2.3. La brucellose.....	3
2.3.1. Généralités .....	3
2.3.2. Hôtes infectés.....	3
2.3.3. Symptômes.....	4
2.3.4. Traitement et prophylaxie.....	4
3. Le destin des bactéries intracellulaires dans la cellule.....	4
3.1. Général .....	4
3.2. Le destin de <i>Brucella</i> .....	5
3.2.1. Internalisation .....	5
3.2.2. Survie intracellulaire .....	6
3.2.3. Sortie de la cellule.....	9
3.3. Facteurs de virulence pour les pathogènes intracellulaires.....	9
3.3.1. Général .....	9
3.3.2. Le système de sécrétion de type IV .....	9
3.3.3. Autres facteurs de virulence.....	12
4. Etude de la virulence de <i>Brucella melitensis</i> 16M.....	13
4.1. <i>Brucella melitensis</i> 16M .....	13
4.2. Aspect à l'étude.....	14
4.3. Autres types de rapporteur .....	15
<i>Objectifs</i> .....	17
<i>Résultats</i> .....	19
1. Construction des plasmides de destination .....	20
1.1. Amplification de <i>cyxA</i> ' .....	22
1.2. Clonage en pGEM-T Easy .....	25
1.3. Fusion avec la cassette Gateway.....	29
1.4. Clonage en pBBR1MCS .....	32
2. Réaction de recombinaison LR permettant les fusions <i>cyxA</i> 'ORF.....	34
3. Tests de production des fusions .....	36
3.1. Présence du plasmide de fusion .....	36
3.2. Détection des protéines de fusion .....	39
4. Production <i>in vitro</i> d'AMP cyclique.....	42
<i>Conclusions et perspectives</i> .....	44
<i>Matériel et méthode</i> .....	48
1. Plasmides et souches bactériennes.....	49
1.1. Souches bactériennes .....	49
1.2. Plasmides .....	49
1.3. Culture bactérienne .....	50
1.3.1. Types de milieu.....	50
1.3.2. <i>Escherichia coli</i> .....	51
1.3.3. <i>Brucella melitensis</i> 16M .....	51

2. Techniques utilisées .....	51
2.1. Polymerase chain reaction .....	51
2.2. Extraction d'ADN plasmidique à partir d'un gel d'agarose .....	52
2.3. Purification de fragments PCR .....	52
2.4. Clonage d'un gène à partir d'une banque génomique .....	53
2.4.1. Ligation .....	53
2.4.2. Transformation bactérienne .....	54
2.4.3. Sélection et test blanc/bleu.....	54
2.5. Minipréparation d'ADN plasmidique .....	54
2.6. Restriction diagnostique et migration sur gel d'agarose 1% .....	55
2.7. Réaction LR et transformation.....	56
2.8. Conjugaison .....	56
2.9. Coloration au bleu de Coomassie .....	57
2.10. Western blot .....	57
2.10.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide .....	57
2.10.2. Transfert sur membrane de nitrocellulose.....	58
2.10.3. Détection immunologique.....	58
2.10.4. Révélation ECL.....	59
2.11. Détection d'AMP cyclique .....	60
<i>Bibliographie</i> .....	61

# *Introduction*

## 1. Avant-propos

Les bactéries sont des organismes vivants unicellulaires microscopiques qui se reproduisent par scission binaire et dont le noyau n'est pas délimité par une membrane. Ce sont des procaryotes par opposition aux eucaryotes dont le noyau est entouré d'une double membrane. La plupart des bactéries mesurent entre 0,5 et 100  $\mu\text{m}$  et sont présentes sous différentes formes : en bâtonnet, sphérique ou encore spirille. Elles ont été retrouvées dans tous les milieux : l'air, les sols, l'eau, la glace, les sources d'eau chaude et elles revêtent une importance capitale pour l'équilibre du monde vivant du fait qu'elles participent à d'innombrables processus biologiques. L'étude des bactéries et de leur mode de vie constitue la bactériologie. Environ 1600 espèces de bactéries sont connues, parmi lesquelles on distingue deux grands groupes : les archéobactéries qui regroupent entre autres les organismes vivant dans des milieux extrêmes et les eubactéries qui regroupent toutes les autres formes. Ces dernières rassemblent des bactéries non pathogènes mais aussi des bactéries pathogènes provoquant certaines graves maladies comme le choléra (*Vibrio cholerae*) ou le tétanos (*Clostridium tetani*). Ici, nous nous intéresserons plus particulièrement aux bactéries du genre *Brucella* responsables de la brucellose aussi bien chez les animaux que chez l'homme.

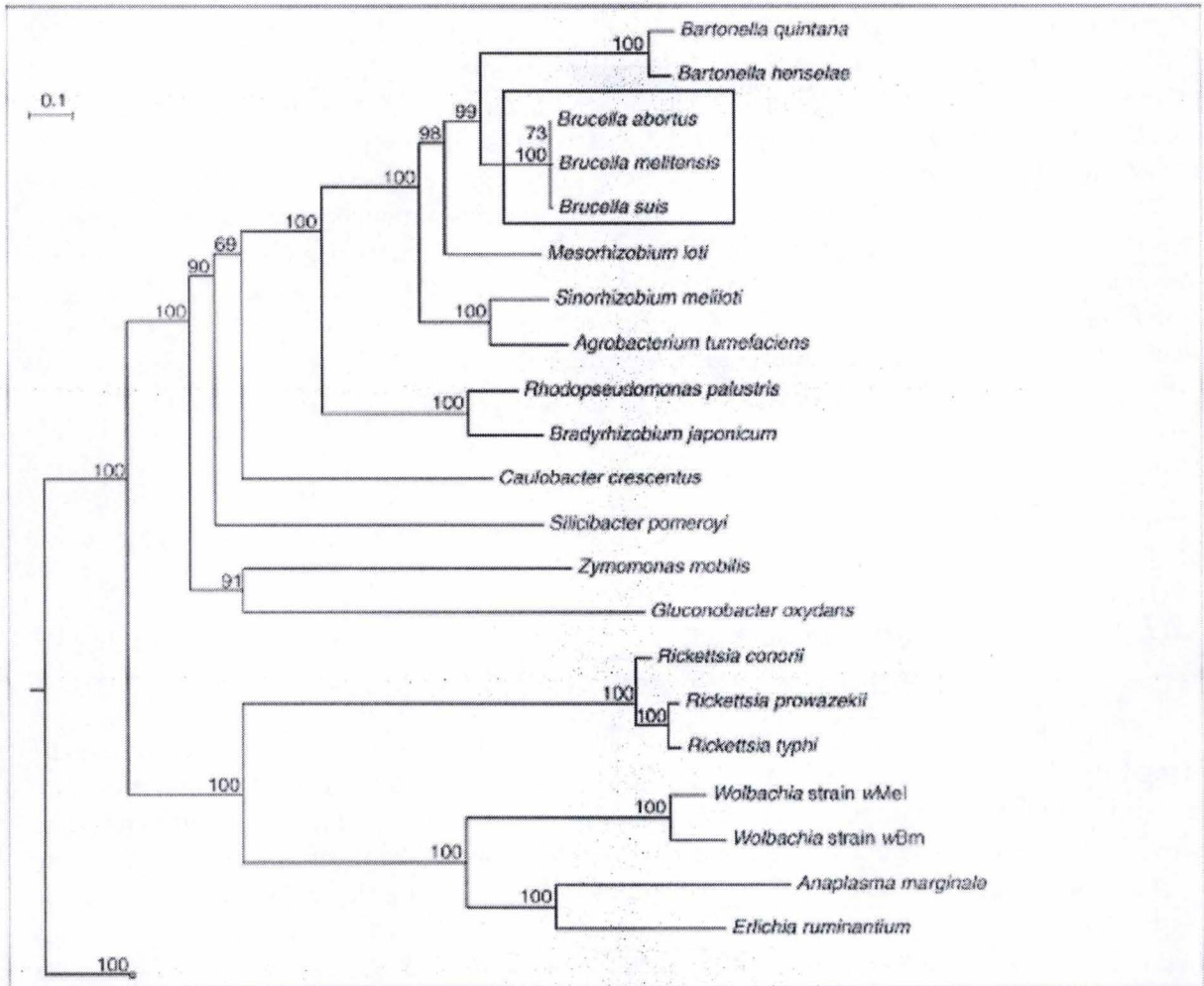
## 2. *Brucella* spp.

### 2.1. Caractéristiques générales

Les bactéries du genre *Brucella* sont de petits coccobacilles à Gram négatif mesurant 0,6 à 1,5  $\mu\text{m}$  de long et 0,5 à 0,7  $\mu\text{m}$  de diamètre, non capsulés et non sporulés. Elles possèdent une enveloppe cellulaire constituée d'une membrane plasmique ou membrane interne et d'une membrane externe séparées par un espace périplasmique composé d'une couche de peptidoglycan. Ces bactéries parasitent le système réticulo-histiocytaire (ensemble de cellules disséminées en réseau dans l'organisme et particulièrement le foie, les ganglions lymphatiques et la rate). Ces cellules ont diverses fonctions dont la fabrication des éléments du sang comme les monocytes et la destruction des corps étrangers. Ce sont des bactéries aérobies partielles, catalase et uréase positives. Leur température optimale de croissance en laboratoire est de 34°C-35°C. Leur génome est constitué de deux réplicons circulaires avec un contenu en G+C de 58-59 %. La plupart des espèces comprennent deux chromosomes et ne possèdent pas de plasmide (Maurin, 2005).

### 2.2. Taxonomie

Les bactéries du genre *Brucella* sont des pathogènes intracellulaires facultatifs provoquant la brucellose ou fièvre ondulante. Elles appartiennent au groupe alpha des *Proteobacteria* (subdivision alpha-2) et à la famille des *Rhizobiaceae*. Les bactéries les plus proches sur le plan phylogénétique sont notamment celles appartenant au genre *Bartonella*, mais aussi des symbiontes de plantes comme *Sinorhizobium* et *Agrobacterium* (Fig. 1). Sur le



**Figure 1 :** Reconstruction d'un arbre phylogénétique pour les  $\alpha$ -protéobactéries dont la séquence génomique complète est connue. Les bootstrap values sont indiquées à chaque regroupement ou nœud. L'encadré indique la position des bactéries du genre *Brucella* dans l'arbre phylogénétique. D'après Sällström et Anderson, 2005.

plan taxonomique, le genre *Brucella* a été anciennement divisé en six espèces : *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* et *B. neotomae*. Chaque espèce montre une préférence pour des hôtes spécifiques : *B. melitensis* infecte les chèvres et les moutons, *B. abortus* provoque l'avortement chez les chats, *B. suis* infecte les porcs et *B. canis*, *B. ovis* et *B. neotomae* sont pathogènes pour les chiens, les moutons et les rats du désert respectivement. Ces espèces sont divisées en biovars ou biotypes en fonction notamment de cette spécificité pour l'hôte animal naturel (Maurin, 2005). Sur base d'études fondées sur le concept d'hybridation ADN-ADN, il s'avère en fait que le genre *Brucella* serait monospécifique. Les espèces anciennement décrites appartiendraient à une espèce unique, *Brucella melitensis* déclinée en biovars : *B. melitensis* biovar *melitensis*, *B. melitensis* biovar *abortus*, *B. melitensis* biovar *suis*, etc. Cependant, la communauté scientifique est partagée à ce sujet et les questions se posent notamment quant à savoir quelle définition donner au mot espèce et si cette définition correspond à une réalité biologique (Moreno et al., 2002).

## 2.3. La brucellose

### 2.3.1. Généralités

La brucellose est une maladie infectieuse causant l'avortement et l'infertilité chez les animaux domestiques et sauvages et la fièvre de Malte ou fièvre ondulante chez les humains. C'est une maladie essentiellement animale (zoonose) où l'homme est un hôte accidentel. Bien que la propagation de la maladie soit contrôlée dans les pays développés, elle demeure endémique dans le bassin méditerranéen, au Moyen-Orient, en Asie de l'Ouest, en Afrique et en Amérique latine (Maurin, 2005). La brucellose est transmise par voie cutanéomuqueuse ou encore par voie digestive. Elle se transmet aux humains via la consommation de lait et de produits laitiers non pasteurisés ou par interaction directe avec un animal infecté. Par contact, les bactéries du genre *Brucella* pénètrent la peau ou les muqueuses et entrent dans les ganglions lymphatiques, qui deviennent hémorragiques et donnent lieu à une bactériémie facilitant la dissémination à travers le corps. Les bactéries *Brucella* sont responsables chez l'homme d'une maladie sévère, chronique et invalidante, bien que rarement fatale. La nature chronique de la brucellose est probablement multifactorielle, incluant notamment la capacité de *Brucella* d'échapper à la détection du système immunitaire et son adaptation à survivre intracellulairement. Les espèces *Brucella melitensis*, *B. abortus* et *B. suis* sont impliquées dans les brucelloses humaines.

### 2.3.2. Hôtes infectés

Les bactéries du genre *Brucella* sont des pathogènes de mammifères sauvages et domestiques. Elles sont principalement intracellulaires et colonisent à la fois les cellules phagocytaires et non phagocytaires (Pizarro-Cerda et al., 2000). Le premier type de cellules, spécialement les macrophages, constituent un véhicule efficace pour la dispersion des bactéries dans différents tissus. Dans la plupart des tissus, les macrophages constituent la première ligne de défense du système immunitaire inné contre les microorganismes envahisseurs. Ils possèdent une large gamme de fonctions microbicides phagocytaires et inductibles. Malgré cela, de nombreux pathogènes ont développé des moyens sophistiqués pour manipuler ces mécanismes de défense afin de survivre et se multiplier à l'intérieur de ces

cellules (Celli, 2006). Dans le second type de cellules, les trophoblastes de l'utérus gravide des animaux constituent la principale niche de réplication des souches de *Brucella* virulentes, tout en étant un site de dissémination pour infecter le fœtus (Anderson and Cheville, 1986).

### 2.3.3. Symptômes

Une infection à *Brucella* chez l'homme implique de nombreux tissus et organes et les symptômes ne sont pas spécifiques (car communs à d'autres maladies). La brucellose se manifeste le plus souvent sous forme d'un tableau pseudo grippal : fièvre, sueurs, anorexie, asthénie (fatigue intense et durable), céphalées, myalgies (douleurs musculaires) et arthralgies (douleurs articulaires) (Maurin, 2005). D'autres symptômes peuvent apparaître tels que démence et arthrites. On distingue trois phases lors d'une contamination. La phase de primo-invasion aiguë (brucellose aiguë septicémique), il s'agit de fièvre ondulante associée à des myalgies et arthralgies accompagnées de sensations de malaise, la phase secondaire (brucellose subaiguë focalisée) avec constitution de foyers isolés ou multiples, la phase tertiaire (brucellose chronique ou état d'hypersensibilité).

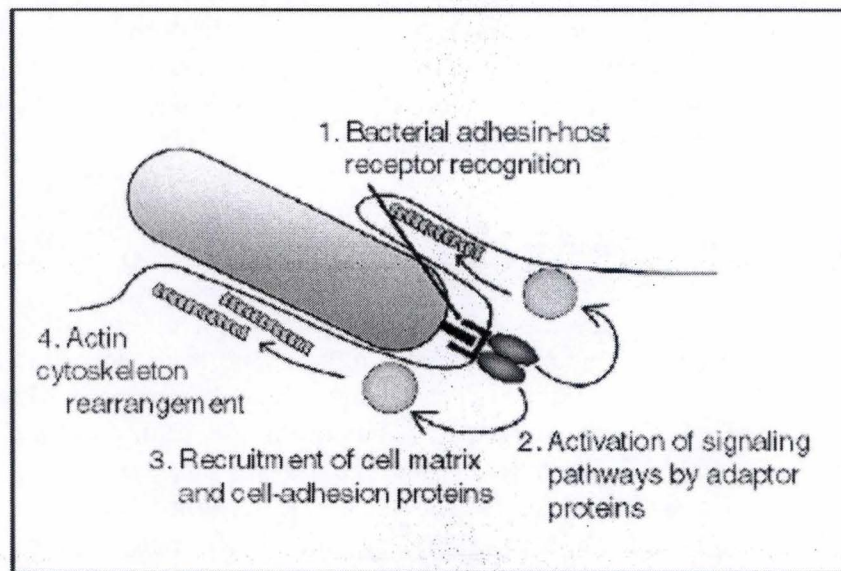
### 2.3.4. Traitement et prophylaxie

Il n'existe pas chez l'homme de vaccin anti-*Brucella* efficace et qui soit bien toléré, de plus l'utilisation de vaccins animaux peut induire une brucellose liée à la souche vaccinale (Spink et al., 1962). L'association d'antibiotiques reste le meilleur traitement en cas de brucellose. L'expérience clinique a permis l'élaboration de protocoles thérapeutiques actuellement préconisés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) : le premier protocole correspondait à l'association de la tétracycline à la streptomycine, ensuite, l'OMS a proposé comme alternative l'association de la doxycycline à la rifampicine. Plus récemment, l'association d'un fluoroquinolone à la rifampicine s'est avérée aussi efficace que la doxycycline et la rifampicine. La meilleure prophylaxie de la brucellose humaine correspond au contrôle de l'infection chez les animaux d'élevage, principalement bovins, ovins et caprins. Le contrôle repose à la fois sur un aspect médical (vaccination) et sur un aspect sanitaire (dépistage et abattage des animaux infectés) (Maurin, 2005).

## 3. Le destin des bactéries intracellulaires dans la cellule

### 3.1. Général

Une fois internalisées par une cellule hôte certaines bactéries intracellulaires détournent le trafic vésiculaire à leur avantage. En effet, des bactéries comme *Salmonella*, *Mycobacterium*, *Legionella* et *Brucella* inhibent la fusion du phagosome les contenant avec le lysosome assurant ainsi leur survie dans les phagocytes professionnels et non professionnels. L'inhibition de la maturation du phagosome en phagolysosome a été associée chez plusieurs bactéries à des protéines sécrétées dans le cytosol du macrophage ; par exemple, la protéine de *Salmonella enterica* SpiC est sécrétée via le système de sécrétion de type III Spi/Ssa dans



**Figure 2 :** Mécanisme d'entrée de type zippering d'un pathogène dans une cellule hôte eucaryote. L'entrée est promue par l'interaction entre une adhésine bactérienne et un récepteur en surface de la cellule hôte. L'interaction active une voie de signalisation qui donne lieu à des réarrangements d'actine. D'après Alonso et Garcia-del Portillo, 2004.

le cytosol de la cellule hôte et interfère avec le trafic membranaire intracellulaire en inhibant la fusion phagosome-lysosome (Uchiya et al., 1999). *Salmonella* réside et survit à l'intérieur d'un phagosome qui diverge de la voie normale de dégradation du macrophage. Habituellement, les particules endocytées sont localisées dans des vacuoles ou phagosomes qui fusionnent avec le lysosome et subissent une dégradation. Pour *Legionella pneumophila*, les produits des gènes *dot/icm*, constituant l'appareil de sécrétion de type IV, et particulièrement DotA sont requis pour éviter le trafic habituel du phagosome contenant *Legionella* (Roy et al., 1998). Les phagosomes formés par des mutants *dotA* ne mûrissent pas en une vacuole répliquative et ne sont pas capables d'empêcher la fusion du phagosome avec le lysosome. Des protéines effectrices de *Legionella* interfèrent également avec le trafic des membranes, il s'agit des protéines VipA (vacuole protein sorting inhibitor protein), VipD et VipF (Shohdy et al., 2005). Ces protéines inhibent le trafic des protéines lysosomales.

## 3.2. Le destin de *Brucella*

### 3.2.1. Internalisation

Comme toutes les bactéries intracellulaires, les bactéries du genre *Brucella* sont internalisées par une cellule hôte dans laquelle elles survivent et se répliquent. Il a été montré que les cellules M (cellules qui forment l'épithélium sus-jacent aux plaques de Peyer et qui sont capables de transporter des macropores, bactéries et virus de la lumière intestinale vers le tissu lymphoïde sous-jacent), les macrophages et les polynucléaires neutrophiles ingèrent les bactéries *Brucella* par une phagocytose de type zippering (Fig. 2), processus par lequel la membrane du phagocyte recouvre progressivement la bactérie par l'intermédiaire d'interactions entre une protéine de la membrane externe de la bactérie et un récepteur transmembranaire d'adhérence de la cellule hôte eucaryote (Ackermann et al., 1988). Dans le cas des bactéries *Brucella suis* et *melitensis*, l'internalisation débute immédiatement par l'attachement soit sur des protrusions de la surface cellulaire soit sur la membrane plasmique des monocytes (Rittig et al., 2001). L'opsonisation à l'aide d'anticorps contribue considérablement à l'assimilation de *B. suis*. Dans les cellules non phagocytaires, une fois que la bactérie est liée à la cellule, l'internalisation se déroule via de faibles réarrangements membranaires. L'ingestion se fait par un mécanisme qui implique de discrets recrutements de filaments d'actine au site d'entrée de la bactérie (Chaves-Olarte et al., 2002). De plus, des études ont montré que l'internalisation de *Brucella abortus* par une cellule hôte requiert des GTPases de la famille Rho qui aident à moduler le cytosquelette d'actine de la cellule hôte pour induire l'internalisation de la bactérie. L'inactivation des petites GTPases Rho, Rac et Cdc42 par la toxine clostridiale diminue l'internalisation de *B. abortus* par les cellules non phagocytaires (Guzman-Verri et al., 2001). Dans ces cellules, la phagocytose via un mécanisme de type zippering semble être un événement exceptionnel.

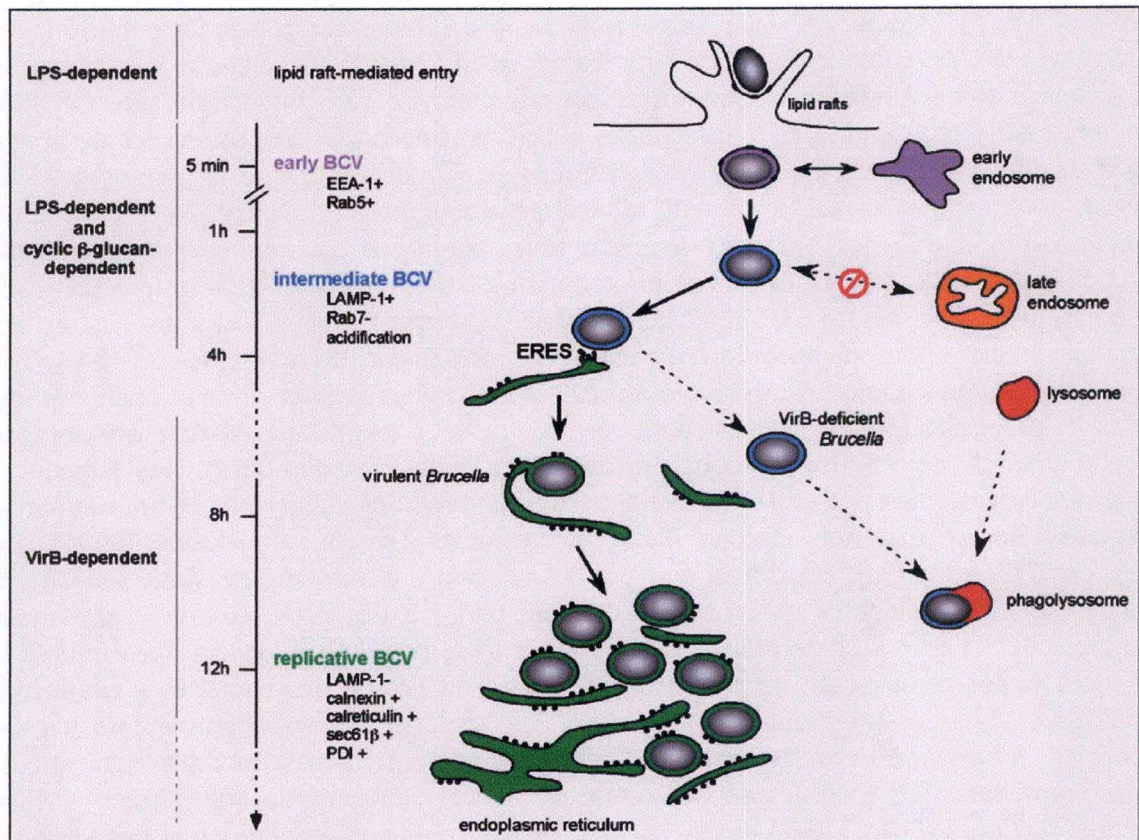
Des études ont révélé que les cavéoles (invaginations de la membrane plasmique) et les radeaux lipidiques (microdomaines spécialisés de la membrane plasmique enrichis en cholestérol et glycosphingolipides) peuvent être impliqués dans l'entrée de certains microorganismes dans la cellule hôte (Shin and Abraham, 2001). Les radeaux lipidiques et les cavéoles sont considérés comme des plateformes de signalisation notamment en raison de la forte concentration de récepteurs et de molécules de signalisation dans ces structures. De nombreux pathogènes comme *Escherichia coli* ou les espèces de *Mycobacterium* ont la capacité d'utiliser les cavéoles pour gagner accès à la cellule hôte (Shin et al., 2000). Cette

entrée peut être liée au fait que leurs récepteurs sont des constituants des cavéoles. Il a été montré par différentes études que la perturbation des radeaux lipidiques des macrophages affecte l'entrée de certaines espèces de *Brucella* dont *B. suis* et *B. abortus* (Naroeni and Porte, 2002), ce qui suggère que des récepteurs pour *Brucella* sont présents dans ces domaines spécialisés. Pour tester l'implication des radeaux lipidiques dans la phagocytose de *B. suis*, des macrophages ont été traités avec des molécules qui lient le cholestérol ou le ganglioside GM1, deux composants des radeaux lipidiques. Après traitement avec des concentrations croissantes en filipine et en  $\beta$ -méthyl cyclodextrine, des molécules qui lient et épuisent le cholestérol respectivement, on visualise par microscopie à fluorescence une forte inhibition de la phagocytose des bactéries non opsonisées (Naroeni and Porte, 2002). Par contre, la phagocytose des bactéries opsonisées n'est pas affectée. Le rôle du ganglioside GM1 est également étudié en traitant des macrophages avec des concentrations croissantes de la sous unité B de la toxine cholérique qui lie le ganglioside. On constate que la phagocytose des bactéries non opsonisées est fortement inhibée (Naroeni and Porte, 2002). Ces résultats suggèrent que l'entrée des bactéries *Brucella* non opsonisées est médiée par les radeaux lipides et que deux composants de ces microdomaines membranaires (cholestérol et GM1) sont impliqués. Par contre, le cholestérol et le GM1 ne sont pas requis pour une internalisation en conditions opsoniques, c'est-à-dire médiée par des opsonines.

Certaines bactéries utilisent d'autres moyens pour entrer en contact et adhérer aux cellules hôtes et notamment les vésicules dérivées de leur membrane externe qui sont des véhicules naturels pour le transport de protéines bactériennes particulières. Les facteurs en surface de ces vésicules peuvent médier l'adhésion aux cellules eucaryotes et ultérieurement l'internalisation de matériel contenu dans ces vésicules (Kuehn and Kesty, 2005). Les pathogènes à Gram négatif expriment souvent des adhésines à leur surface, donc il n'est pas surprenant que les vésicules qui correspondent en partie à des protéines de la membrane externe soient adhésives et permettent l'interaction avec des cellules hôtes spécifiques. La liaison des vésicules aux cellules peut aussi influencer la liaison des bactéries à ces mêmes cellules. Les vésicules augmentent l'adhérence des bactéries, c'est notamment le cas des vésicules d'*Actinobacillus actinomycetemcomitans* qui augmentent son adhérence sur les cellules épithéliales KB (cellules dérivées d'un carcinome épidermoïde oral humain) (Meyer and Fives-Taylor, 1994). Il a été montré que *B. melitensis* libère spontanément des vésicules composées de LPS, phospholipides et protéines de la membrane externe (Gamazo and Moriyon, 1987). La sécrétion des vésicules ou blebs démontrée auparavant est étudiée au sein de l'Unité de Recherche en Biologie Moléculaire (URBM) des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix à l'aide de *Brucella melitensis* 16M.

### 3.2.2. Survie intracellulaire

La majorité des bactéries *Brucella* ingérées par phagocytose sont tuées durant les premières heures qui suivent l'internalisation, ce qui implique que toutes les bactéries n'échappent pas à la voie endocytaire et que seulement une fraction survit et se réplique à long terme. Cela suggère également que le potentiel de survie intracellulaire n'est pas entièrement programmé à l'entrée (Celli and Gorvel, 2004). La survie intracellulaire de *Brucella* repose sur sa capacité à éviter la fusion de la vacuole d'endocytose et puis de la vacuole contenant *Brucella* ou VCB avec le lysosome, empêchant ainsi la destruction de la bactérie induite par la cellule hôte.



**Figure 3 :** Entrée de *Brucella abortus* dans un macrophage. L'entrée est médiée par les radeaux lipidiques et dépendante du LPS. Une fois internalisée, *Brucella* se trouve dans une vacuole qui interagit avec les endosomes primaires (en mauve) mais pas avec les endosomes tardifs (en orange). Ensuite, la vacuole intermédiaire (en bleu) entre en contact avec le RE (en vert) et fusionne en partie avec celui-ci, ce qui donne lieu à une organelle dérivée du RE et qui soutient la réplication de *Brucella*. Les vacuoles qui contiennent des bactéries déficientes pour l'appareil de sécrétion de type IV, VirB, interagissent avec les endosomes primaires mais pas avec le RE et finissent par fusionner avec le lysosome (en rouge) pour donner un phagolysosome dans lequel la bactérie subit une dégradation. D'après Celli, 2006.

### 3.2.2.1. Maturation vacuolaire

De manière générale, après être rentrée par phagocytose, les bactéries du genre *Brucella* résident dans des VCB qui interagissent avec des endosomes précoces/primaires. Ces VCB précoces évitent par la suite des interactions avec la voie endocytaire et sont entourées ou en contact étroit avec le réticulum endoplasmique. Les contacts avec le réticulum sont soutenus et mènent à des événements limités de fusion qui génèrent au final une organelle dérivée du réticulum et tolérante à la réplication de *Brucella*. De manière plus précise, après une rapide entrée médiée par les radeaux lipidiques et dépendante de la structure du LPS, cinq à dix minutes après l'infection les bactéries *Brucella* se retrouvent dans des VCB précoces qui interagissent avec des compartiments précoces nommés early endosomes ou endosomes primaires (Fig. 3). Ces VCB acquièrent transitoirement des marqueurs caractérisant les endosomes précoces et notamment la petite GTPase Rab5 et la protéine EEA1 (early endosome-specific peripheral membrane protein 1). Ensuite, la VCB mature en une vacuole acide intermédiaire qui accumule LAMP-1, la glycoprotéine-1 associée au lysosome, mais pas la petite GTPase Rab7, marqueur caractéristique des endosomes tardifs, ce qui signifie que la VCB se sépare de la voie endocytaire et évite d'interagir avec les endosomes tardifs et le lysosome et cela dans les cellules non phagocytaires et les macrophages (Arenas et al., 2000; Pizarro-Cerda et al., 1998). De plus, d'après les données disponibles, la vacuole n'acquiert pas d'autre marqueur lysosomal que LAMP-1. L'acidification de la vacuole est essentielle à la survie de *Brucella* et est requise pour l'expression de l'appareil de sécrétion de type IV. Deux à huit heures après l'infection, les VCB intermédiaires interagissent de manière soutenue avec le réticulum endoplasmique (RE) ce qui mène à une fusion entre les deux organelles qui engendre une vacuole dérivée du RE et permissive à la réplication bactérienne et cela environ 12 heures après l'infection (Fig. 3). Cette vacuole est LAMP-1 négative par contre elle porte des marqueurs du RE, les protéines calnexine et calréticuline et aussi les protéines sec61 $\beta$  et PDI (protein disulfide isomerase, protéine qui catalyse l'échange de liens disulfides et aide au repliement des protéines nouvellement synthétisées au sein du RE).

Les molécules ou effecteurs putatifs impliqués dans la modification du trafic intracellulaire induite par *Brucella* et notamment *Brucella melitensis* lors de l'infection de cellules phagocytaires et non phagocytaires sont encore inconnus à l'heure d'aujourd'hui. L'objectif de ce mémoire est de contribuer à l'identification des protéines qui détournent le trajet habituel des endosomes ou participent à l'élaboration de vacuoles spécialisées dérivées du RE dans lesquelles se réplique la bactérie.

### 3.2.2.2. Survie et réplication

Dans les cellules épithéliales, la niche répliquative de *Brucella* est dérivée du RE et la maturation tardive de la VCB dépend de l'appareil de sécrétion de type IV, VirB. En effet, les vacuoles contenant des mutants pour cet appareil de sécrétion ne sont pas capables d'interagir de façon soutenue avec le RE et finissent par fusionner avec les lysosomes et sont dégradés. L'appareil VirB est uniquement exprimé intracellulairement après acidification de la vacuole contenant *Brucella*. Dans les macrophages, les vacuoles contenant *Brucella* se retrouvent rapidement en contact étroit avec le RE et cet événement est VirB indépendant, par contre la maturation de la vacuole répliquative est VirB dépendante (Fig. 3). L'arrimage des VCB au RE est suivi de l'acquisition progressive de marqueurs spécifiques du RE au moyen d'événements de fusion limités (Celli and Gorvel, 2004). *Brucella* modifie la voie de sécrétion biosynthétique dans les macrophages pour se créer une vacuole répliquative. Les

organelles qui dérivent du RE supportent la réplication des bactéries à l'intérieur de vacuoles individuelles. La réplication bactérienne semble se dérouler par division d'une VCB en deux vacuoles filles contenant chacune une bactérie via acquisition de membrane du réticulum (Celli and Gorvel, 2004; Gorvel and Moreno, 2002).

Certaines protéines sont connues pour être impliquées directement ou indirectement dans la réplication. Les protéines en direction du Golgi sont exportées dans des vésicules sécrétées aux sites de sortie du RE (ERES : endoplasmic reticulum exit site) et recouvertes du complexe de protéines coatomères COPII. Sar1 est une petite GTPase qui contrôle l'assemblage des complexes COPII sur les membranes du RE. Le blocage de l'activité de Sar1 perturbe les sites de sortie du RE et diminue significativement la réplication de *Brucella* (Celli et al., 2005). Les VCB qui se trouvent dans des cellules où l'activité de Sar1 est inhibée montrent des caractéristiques de vacuoles immatures qui n'ont pas acquis de membranes provenant du RE. Donc, bloquer Sar1 empêche l'acquisition de membranes du RE et la conversion de la VCB en une organelle dérivée du RE. Notons que Sar1 est la première molécule hôte identifiée impliquée dans la réplication de *Brucella*.

Un mécanisme additionnel utilisé par *Brucella* pour éviter la fusion avec le lysosome et survivre à l'intérieur de cellules hôtes a récemment été découvert et implique le  $\beta$ -1,2-glucan cyclique. Les souches mutantes de *B. abortus* pour le gène de la synthétase du  $\beta$ -1,2-glucan cyclique montrent une virulence réduite en souris et une multiplication intracellulaire défectueuse dans les cellules HeLa (Briones et al., 2001). Les bactéries mutées pour ce gène ne parviennent pas à esquiver la fusion avec le lysosome ou atteindre une organelle répliquative dérivée du RE (Arellano-Reynoso et al., 2005). Ce composé est synthétisé par la bactérie et capable d'extraire le cholestérol situé dans les radeaux lipidiques des membranes eucaryotes. Il pourrait interférer avec la maturation normale des vacuoles vers la fusion avec le lysosome en perturbant les radeaux lipidiques de ceux-ci et donc en empêchant la fusion.

### 3.2.2.3. La survie intracellulaire d'autres pathogènes

L'association de vacuoles parasitaires contenant des pathogènes intracellulaires avec des organites tels que le réticulum endoplasmique ou la mitochondrie peut avoir une finalité différente. Cela peut refléter des besoins fonctionnels différents : le recrutement du RE et de la mitochondrie peuvent contribuer à l'acquisition de nutriments tandis que la fusion entre la vacuole contenant la bactérie et l'interception de vésicules de sécrétion semblent contribuer à la biogenèse d'une niche de réplication sûre et séparée de la voie endocyttaire, même si un rôle dans la disponibilité des nutriments n'est pas inconcevable. *Legionella pneumophila* se réplique comme *Brucella* dans une vacuole dérivée du RE mais la biogenèse de leur vacuole semble différer considérablement. Une fois internalisée, *L. pneumophila* se localise dans un phagosome qui acquiert rapidement et retient des caractéristiques d'un compartiment semblable au RE (Roy et al., 1998). Elle réside dans une vacuole qui ne fusionne pas avec le lysosome et qui ne s'acidifie pas contrairement à celle contenant *Brucella*. Dans un premier temps, *Brucella* occupe une vacuole engagée dans la voie endocyttaire précoce qui résulte en l'acidification de celle-ci et l'acquisition de marqueurs d'endosomes précoces, *Legionella* quant à elle échappe aux événements de fusion avec les endosomes précoces.

D'autres pathogènes internalisés par une vacuole sont capables de rompre la membrane de la vacuole environnante et d'aller dans le cytoplasme de la cellule hôte où ils se multiplient et se déplacent par polymérisation de l'actine à une de leur extrémité. C'est le cas de *Shigella*, qui pénètre la barrière épithéliale via les cellules M et une fois dans la cellule

cette bactérie sort du phagosome et réside dans le cytosol. Durant l'infection, *Shigella* utilise des effecteurs sécrétés par son appareil de sécrétion de type III qui manipulent des voies de signalisation et modifient l'activation du système immunitaire inné de l'hôte (Ogawa and Sasakawa, 2006). IcsB par exemple joue un rôle crucial dans le camouflage de *Shigella* contre la reconnaissance du système autophagique (Ogawa et al., 2005).

### 3.2.3. Sortie de la cellule

Contrairement à des pathogènes comme *Listeria* ou *Shigella*, *Brucella* n'infecte pas les cellules par propagation d'une cellule à l'autre. Dans le cas d'érythrophagocytes et de trophoblastes infectés, une réplication bactérienne intensive génère en définitive une nécrose après la libération de la bactérie. Un processus semblable est observé chez des tissus fœtaux massivement infectés, ce qui suggère que la nécrose est une issue finale des cellules infectées. Une fois que les bactéries sont relâchées de la cellule, l'infection d'autres cellules a lieu (Gorvel and Moreno, 2002).

## 3.3. Facteurs de virulence pour les pathogènes intracellulaires

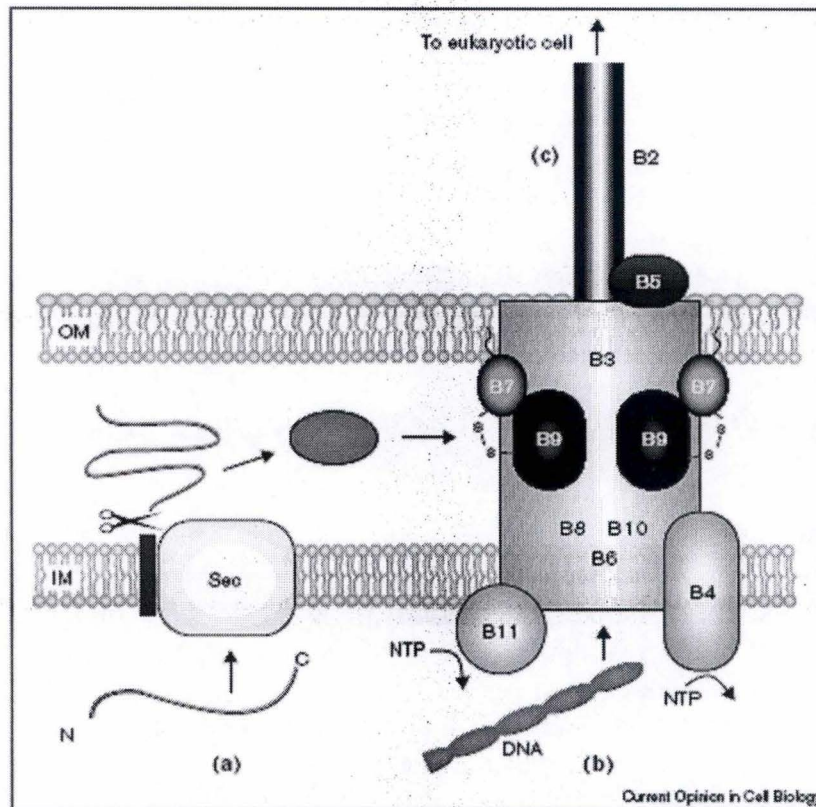
### 3.3.1. Général

Comme vu précédemment, la virulence des bactéries intracellulaires ne réside pas entièrement dans des facteurs classiques comme les exotoxines, les fimbria, les inducteurs d'apoptose, les cytolysines, les capsules et les lipopolysaccharides endotoxiques mais aussi dans leur capacité à envahir, survivre et se répliquer à l'intérieur de phagocytes professionnels et non professionnels. Pour ces différentes étapes, les bactéries sécrètent des protéines ou effecteurs qui modulent à leur avantage les fonctions de la cellule hôte. Il existe plusieurs voies permettant la sécrétion de protéines à travers la membrane bactérienne externe et ces voies sont classifiées en cinq groupes principaux nommés types I à V. Les systèmes de sécrétion de type II, IV et V sont des systèmes en deux étapes dans lesquels les protéines sont d'abord transportées au travers de la membrane interne via la machinerie Sec dont le rôle est de faciliter le transport des protéines à travers et dans les membranes biologiques. Ensuite, ces protéines sont transportées au travers de la membrane externe. Les types I et III sont Sec indépendant c'est-à-dire que les protéines sont directement transférées dans le milieu externe sans passer par la machinerie Sec (Thanassi and Hultgren, 2000). Un sixième système de sécrétion nommé type "VI" fait référence à la sécrétion de vésicules via la membrane externe par des bactéries à Gram négatif (Beveridge, 1999).

### 3.3.2. Le système de sécrétion de type IV

#### 3.3.2.1. Définition

Les systèmes de sécrétion de type IV ou SST4s sont des complexes de transporteurs associés à la membrane et utilisés par de nombreuses bactéries pour délivrer des molécules substrats à des cellules cibles. Les SST4s sont impliqués dans le transfert horizontal d'ADN dans des cellules bactériennes et eucaryotes, dans l'assimilation d'ADN



**Figure 4 :** Modèle de l'appareil de sécrétion de type IV basé sur le système VirB. Les protéines sont sécrétées dans le périplasma par la machinerie de sécrétion Sec et sont ensuite injectées dans le milieu extérieur via l'appareil de sécrétion VirB. L'ADN est directement sécrété dans le milieu externe par le système VirB sans passer par l'intermédiaire de la machinerie Sec. Les protéines composant VirB ont différentes fonctions : VirB4 et VirB11 ont une activité de liaison de l'ADN, VirB7 forme un complexe par des liens disulfides avec VirB9 qui peut lier les protéines. VirB2 est le composant majeur du pilus de type IV et VirB5 est le composant mineur. D'après Thanassi et Hultgren, 2000.

venant du milieu externe, dans la sécrétion de toxines et dans l'injection de facteurs de virulence dans les cellules eucaryotes cibles par plusieurs pathogènes de mammifère. Les membres de la famille des SST4s sont classifiés en quatre sous-groupes, chacun ayant une fonction spécifique et contribuant de manière unique à la pathogénicité de la bactérie. Ces fonctions intègrent la translocation de molécules effectrices dans les cellules hôtes cibles ; la conjugaison d'ADN chromosomique et plasmidique ; l'assimilation et la transformation d'ADN ; et la libération d'ADN dans le milieu extracellulaire. La sécrétion de protéines par le système de type IV peut prendre place via un intermédiaire périplasmique qui injecte les protéines vers l'extérieur une fois que celles-ci ont traversé la membrane interne de la bactérie via la machinerie Sec (Fig. 4). Il est important de souligner que la plupart des appareils de sécrétion de type IV ont des homologues de chacune des protéines qui les composent et un cœur conservé de cinq protéines : VirB4, VirB7, VirB9, VirB10 et VirB11 que l'on retrouve dans la plupart des bactéries.

### 3.3.2.2. Implication de l'appareil de sécrétion de type IV chez des pathogènes intra et extracellulaires

*Agrobacterium tumefaciens* est un pathogène extracellulaire de nombreuses plantes. Durant le processus d'infection, *Agrobacterium* transfère un complexe de protéine-ADN, le complexe T-VirD2, et au moins deux protéines Vir nommées VirE2 et VirF, dans la cellule végétale via l'appareil de sécrétion de type IV VirB/VirD4. Les protéines du SST4 agissant en médiateurs du transfert d'ADN sont les 11 protéines VirB, encodées par les gènes *VirB1* à *VirB11* et la protéine de couplage VirD4 qui est une nucléoside triphosphatase. Des prédictions informatiques, des expériences de fractionnement subcellulaire et des études fonctionnelles montrent que les protéines VirB peuvent être groupées en trois classes : les composants d'un pore (VirB6 à VirB10), les composants énergétiques (les nucléosides triphosphatases VirB4 et VirB11) et les composants associés au pilus (VirB2 et peut-être VirB3 et VirB5). VirB1 est une transglycosylase pour la lyse localisée de la couche de muréine au site d'assemblage du SST4 (Backert and Meyer, 2006). Le SST4d' *Agrobacterium* délivre de l'ADN de transfert (ADN-T) oncogénique covalamment lié à la relaxase VirD2 dans les cellules végétales. En plus du ADN-T, le SST4 transfère indépendamment quatre autres protéines effectrices : VirE2, VirE3, VirF et VirD5 (Tableau 1). VirE2 est une protéine de liaison à l'ADN simple brin pour l'ADN-T. A la fois VirD2 et VirE2 portent un signal de localisation nucléaire et interagissent avec de nombreuses protéines de la cellule hôte pour faciliter le ciblage au noyau et l'intégration de l'ADN-T dans le chromosome hôte.

*Helicobacter pylori* est une bactérie extracellulaire qui colonise la muqueuse gastrique et génère des gastrites, des ulcères et parfois des carcinomes gastriques. Les souches virulentes ont un SST4 porté par l'îlot de pathogénicité *cag* (Backert and Meyer, 2006). CagA est la seule protéine effectrice décrite interférant avec les réarrangements d'actine impliqués dans l'élongation de la cellule hôte. CagA est insérée dans la membrane des cellules épithéliales gastriques infectées et module différentes cascades de signalisation associées à la différenciation cellulaire, la prolifération, les réarrangements du squelette d'actine et les réponses proinflammatoires. Après transfert dans la cellule hôte, CagA est phosphorylée par des kinases de la famille Src et semble interagir avec diverses protéines, notamment les protéines Grb2 et Shp2. Il a été récemment rapporté que d'autres molécules que des protéines peuvent être délivrées par le SST4. Il s'agit de peptidoglycans (Tableau 1).

L'appareil de sécrétion de type IV de *Bordetella pertussis*, Ptl, libère la protéine effectrice nommée toxine pertussis Ptx, dans le milieu extracellulaire (Tableau 1). Ptx est une exotoxine de type A-B composée de cinq sous unités différentes (S1-S5). Chaque sous unité

Table 1

**T4SSs and their effector molecules of pathogenic bacteria and symbionts.**

Bacterium	T4SS	Known effector(s)	Target cells	Associated diseases
<b>Extracellular pathogens</b>				
<i>A. tumefaciens</i>	VirB/VirD4 (pTi)	T-DNA, VirD2, VirD5, VirE2, VirE3, VirF	Plant cells	Crown gall tumors
<i>H. pylori</i>	cagPAI	CagA, peptidoglycan	Human gastric epithelial cells, phagocytes	Gastritis, ulcer, cancer
<i>B. pertussis</i>	Pil	Pertussis toxin	Human ciliated respiratory epithelial cells	Whooping cough
<b>Intracellular pathogens</b>				
<i>L. pneumophila</i>	Dot/Icm	LidA, RalF, LepA, LepB, SidA-SidH, SdbA-SdbD, SdcA-SdcB, SdeA-SdeE, SdhA-SdhC, VipA, VipD, DotA <sup>a</sup> , plasmid RSF1010	Human macrophages, protozoa	Pneumonia (Legionnaires' disease)
<i>Bartonella spp.</i>	VirB/VirD4 Trw	BepA-BepG Plasmid RSF1010	Mammalian erythrocytes, vascular epithelial cells	Intraerythrocytic Bacteremia, cat scratch disease
<i>Brucella suis</i> , <i>Brucella abortus</i>	VirB	?	Macrophages	Brucellosis
<i>Coxiella burnetii</i>	Dot/Icm <sup>b</sup>	?	Mononuclear phagocytes	Q fever
<i>Rickettsia spp.</i>	VirB/VirD4 <sup>b</sup>	?	Mammalian host cells	Typhus, spotted fever
<b>Intracellular symbionts</b>				
<i>Mesorhizobium loti</i>	VirB/VirD4	Msi059, Msi060	Plant cells	Microsymbiont
<i>Wolbachia spp.</i>	VirB/VirD4 <sup>b</sup>		Arthropods	River blindness

<sup>a</sup> DotA is secreted into supernatant of liquid cultures. If it is translocated into the host cell, the cytosol needs to be clarified.

<sup>b</sup> A direct implication of these T4SS in pathogenicity (or symbiosis) has not yet been demonstrated.

**Tableau 1 : Quelques bactéries et leur appareil de sécrétion de type IV ainsi que les effecteurs moléculaires identifiés. D'après Backert et Meyer, 2006.**

est synthétisée avec une séquence signal particulière et transférée dans le périplasme bactérien par l'appareil de sécrétion. Ensuite, la séquence signal est clivée et les sous unités assemblées avant d'être sécrétées en milieu extracellulaire (Backert and Meyer, 2006). Il n'a pas encore été déterminé si ce système de sécrétion chez *Bordetella pertussis* peut aussi supporter la translocation de protéines bactériennes directement dans le cytoplasme de la cellule hôte eucaryote. Une fois sécrété, la toxine Ptx médie la liaison avec la cellule hôte et la libération de la sous unité catalytique S1 dans le cytoplasme de l'hôte. S1 a une activité ADP-ribosylation contre la sous unité inhibitrice alpha des protéines liant le GTP. Les protéines liant le GTP et ADP-ribosylées ne répondent plus à une stimulation par leur récepteur couplé à une protéine G.

*Legionella pneumophila* est un pathogène intracellulaire facultatif de protozoaires et lorsqu'elle est inhalée par les humains elle infecte les macrophages alvéolaires. Son SST4 appelé Dot/Icm et codé par un ensemble de 24 gènes est essentiel aux processus d'infection. *Legionella* utilise le SST4 à différentes fins : transfert d'ADN plasmidique d'une cellule bactérienne à une autre, réplication intracellulaire et sa libération à partir des protozoaires (Backert and Meyer, 2006). De nombreux effecteurs de cet appareil de sécrétion ont été identifiés mais la fonction de la plupart d'entre eux reste à déterminer. Une fois internalisée, le phagosome contenant *Legionella* acquiert les caractéristiques d'un compartiment qui ressemble au RE par recrutement de vésicules de sécrétion précoces au site de sortie de celui-ci. Un SST4 fonctionnel est requis pour cette interaction essentielle à la réplication bactérienne. Par l'intermédiaire de son système de sécrétion, *L. pneumophila* transporte des effecteurs qui inhibent la maturation du phagosome en lysosome et modulent le trafic des vésicules de l'hôte. Quelques substrats du système Dot/Icm ont été identifiés : LidA, RalF, LepA, LepB, SdeA-SdeE, SdhA-SdhC et SidA-SidH (Tableau 1). Mais parmi ceux-ci, seul RalF semble directement perturber le trafic vésiculaire en inhibant l'acquisition de la GTPase ARF1 à la vacuole contenant *Legionella*. LepA et LepB sont des protéines impliquées dans la libération de la bactérie à partir du protozoaire. LidA est un effecteur constitutivement sécrété dans la cellule hôte et qui semble impliqué dans le recrutement de vésicules de sécrétion précoces au phagosome.

*Bartonella henselae* est un pathogène intracellulaire infectant les érythrocytes et les cellules épithéliales. Les bactéries du genre *Bartonella* peuvent induire de massifs réarrangements du cytosquelette d'actine, stimuler la réponse pro inflammatoire par activation de NFkB et créer des effets toxiques sur la cellule hôte. Ces processus dépendent du SST4 de celle-ci, VirB/VirD4, dont sept effecteurs ont été identifiés : BepA-BepG (Tableau 1) (Schulein et al., 2005).

### 3.3.2.3. L'appareil de sécrétion de type IV chez *Brucella*

L'opéron *virB* encode l'appareil de sécrétion de type IV impliqué dans le trafic intracellulaire de *Brucella* et considéré comme l'un de ses facteurs de virulence. Cet opéron est composé de 12 ORFs partageant des homologies avec d'autres systèmes de sécrétion bactériens connus pour être impliqués dans le trafic intracellulaire de pathogènes, exemple du système Dot/Icm de *Legionella pneumophila*. Un opéron *virB* fonctionnel est requis pour la biogenèse des vacuoles contenant *Brucella* (Comerci et al., 2001). Il est impliqué dans le contrôle de la maturation des VCB en organelles qui permettent la réplication intensive. VirB contrôlerait le destin intracellulaire de la bactérie via le transport intracytoplasmique de protéines bactériennes perturbant les fonctions de la cellule hôte (Celli and Gorvel, 2004). Les bactéries défectueuses pour l'appareil de sécrétion VirB ne sont pas capables de soutenir des fusions compétentes entre la VCB et le RE et sont dégradées après une fusion avec le

lysosome (Celli, 2006; Celli and Gorvel, 2004). Il a été montré que certaines mutations suppriment la capacité de *Brucella* à se répliquer intracellulairement, indiquant que ce système est essentiel pour le mode de vie de ce pathogène (Comerci et al., 2001).

L'expression de l'opéron *virB* a lieu dans les vacuoles phagocytaires acides des macrophages et la production des protéines VirB augmente en conditions acides. Un opéron *virB* complet de *Brucella* est requis pour la virulence des souches sauvages en macrophages. Dans les cellules non phagocytaires HeLa, l'absence de quelques protéines VirB fonctionnelles (VirB2, VirB4 et VirB9) n'affecte pas l'entrée de la bactérie et la prévention de la fusion phagolysosomiale (Delrue et al., 2001). Par contre, l'intégrité de l'opéron est nécessaire pour que la bactérie atteigne une niche adéquate et puisse se répliquer dans les cellules HeLa (Rouot et al., 2003).

Les gènes *virB* ne sont pas nécessaires pour contrôler les premiers événements de la biogenèse de *Brucella* dans une cellule comme l'attachement, l'internalisation ou l'inhibition de la fusion avec les compartiments lysosomiaux. Par contre, l'opéron *virB* est requis pour réguler le trafic intracellulaire des vacuoles contenant *Brucella* vers le RE (Fig. 3).

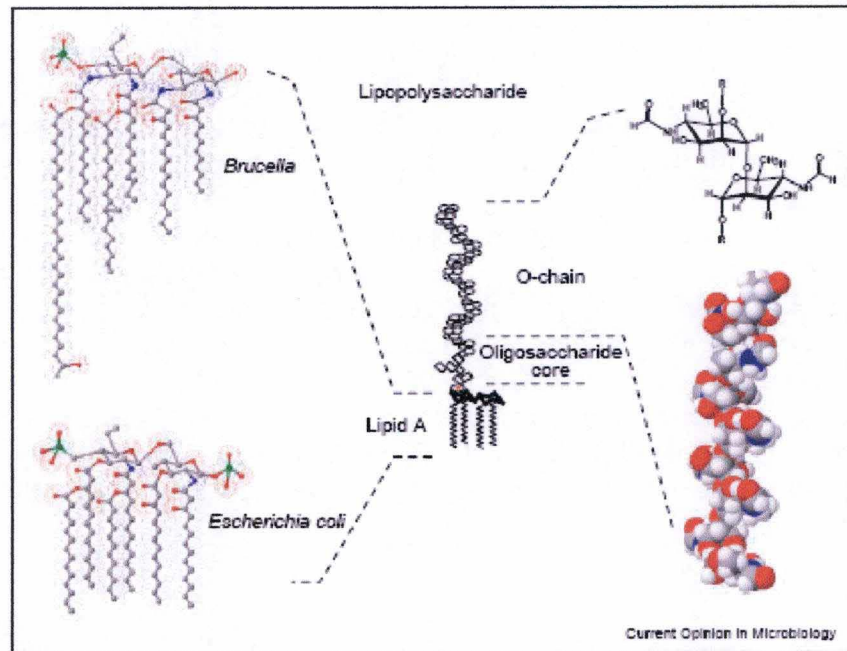
La production du système de sécrétion de type IV diffère parmi les espèces de *Brucella*. L'analyse de différentes espèces de *Brucella* révèle des différences notables dans la production des protéines VirB sous différentes conditions de croissance. Ce qui suggère une régulation différente des protéines en rapport avec les différents hôtes et les différences génétiques entre les souches de *Brucella* (Rouot et al., 2003).

On connaît l'appareil de sécrétion de type IV d'une quantité de pathogènes intracellulaires comme l'appareil Dot/Icm de *Coxiella burnetii*, l'appareil VirB/VirD4 de *Rickettsia spp.* mais tout comme pour *Brucella*, les effecteurs de ces systèmes n'ont pas encore été mis en évidence.

### 3.3.3. Autres facteurs de virulence

La sécrétion de produits extracellulaires est un des mécanismes utilisés par certains pathogènes pour communiquer et intoxiquer des cellules hôtes. Ces produits sont sécrétés dans des vésicules jouant un rôle dans l'établissement d'une niche de colonisation et dans la modulation des réponses de la cellule hôte. Ces vésicules contiennent des adhésines, des toxines et des composés immunomodulateurs qui participent à l'interaction hôte-pathogène et en font dès lors des facteurs de virulence potentiels (Kuehn and Kesty, 2005), notamment par leur capacité à se disséminer. Les vésicules dérivant de la membrane externe de *Brucella melitensis* contiennent principalement des protéines et des lipides de la membrane externe et du périplasme (espace compris entre la membrane interne et externe d'une bactérie à Gram-négatif) mais ne contiennent pas de composants de la membrane interne ni de l'espace cytoplasmique (Gamazo and Moriyon, 1987). Les bactéries pathogènes produisent plus de vésicules que leurs homologues non pathogènes, ce qui est compatible avec l'hypothèse que les bactéries utilisent les processus basiques des vésicules pour disséminer des facteurs de virulence et améliorer leur survie dans l'hôte.

Le lipopolysaccharide ou LPS de certaines bactéries est considéré comme un facteur de virulence. *Brucella* par exemple, exprime un LPS non conventionnel qui en plus d'être faiblement endotoxique et de la protéger contre l'attaque des peptides antimicrobiens et du complément joue un rôle dans l'entrée et les premiers stades de survie dans le macrophage (Lapaque et al., 2005).



**Figure 5 :** Structure du LPS de *Brucella* : lipide A, core, chaîne O. Le lipide A possède un squelette de diaminoglucose lié par des liens amides à de longues chaînes acyles qui diffèrent du LPS classique d'*Escherichia coli*. Le core est composé d'acide 3-deoxy-D-manno-2-octulosonique, de mannose et de glucosamine. La chaîne O est formée d'un homopolymère de N-formyl-perosamine. D'après Lapaque et Moryion, 2005.

## 4. Etude de la virulence de *Brucella melitensis* 16M

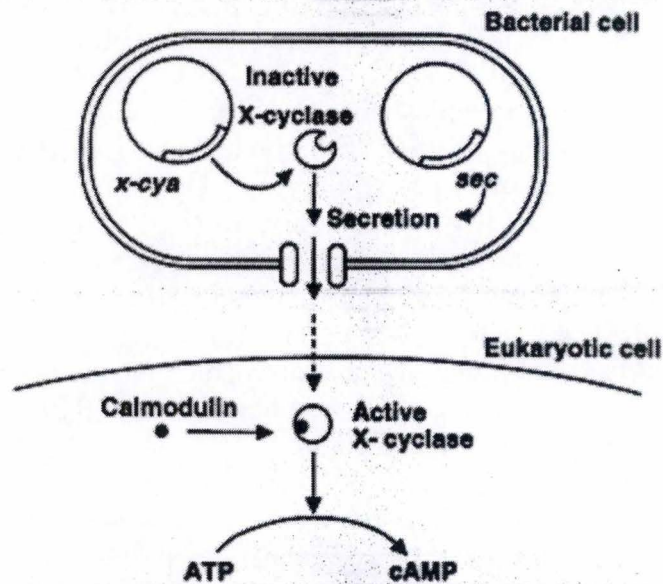
### 4.1. *Brucella melitensis* 16M

*Brucella melitensis* est l'espèce considérée comme cause principale de brucellose humaine et est responsable des infections les plus graves, ce qui en fait un important sujet d'étude. Le génome de la souche *Brucella melitensis* 16M contient 3294931 paires de bases distribuées sur deux chromosomes circulaires de 2117144 pb et 1177787 pb, encodant 3197 ORFs codant des protéines (DeVecchio et al., 2002; Dricot et al., 2004). Parmi ces 3197 ORFs, 2487 ont une fonction assignée et près des deux tiers restant sont similaires à des protéines hypothétiques d'autres organismes. Environ 87 % de l'ADN correspond à des séquences codantes et le contenu en G+C est de 57 %.

*Brucella melitensis* est présente sous forme de deux variants, soit un variant au LPS lisse soit un variant au LPS rugueux, et ce en fonction de l'expression du polysaccharide O ou antigène O, composant du lipopolysaccharide de la membrane externe des bactéries. La plupart des souches sauvages de *Brucella* ont un LPS de type lisse qui consiste en trois domaines : le lipide A, le core (oligosaccharide) et le polysaccharide O (Fig. 5). Il a été rapporté que ce LPS peut être considéré comme facteur de virulence lors d'une infection (Lapaque et al., 2005) et qu'il augmente la capacité de la bactérie à survivre dans les macrophages (Fernandez-Prada et al., 2003). Le polysaccharide O favorise la survie de *B. melitensis* en empêchant la mort des macrophages porteurs de la bactérie. Son LPS faiblement endotoxique lui confère une résistance contre les attaques anti-microbiennes et module les réponses immunitaires de l'hôte. Il semble que le LPS diminue les réponses anti-microbiennes en inhibant le complément et l'attaque des peptides anti-microbiens et en empêchant la synthèse de médiateurs immunitaires. *Brucella* possède un LPS particulier appelé LPS non classique comparé au LPS classique des entérobactéries comme *Escherichia coli*. Par exemple, le lipide A de *B. abortus* possède une structure avec un diaminoglucose plutôt qu'une glucosamine et des groupements acyls plus longs. De plus, il est lié au core par des liens amides uniquement et non des liens esters et amides (Fig. 5). C'est cette structure peu habituelle qui fait du LPS de *Brucella* un facteur de virulence, notamment parce qu'il modifie les patterns moléculaires associés au LPS et qu'il réduit les propriétés typiques des LPS apparentées aux endotoxines. Les bactéries qui ont un LPS rugueux sont moins virulentes du fait de leur plus grande sensibilité à une dégradation médiée par le complément et de leur incapacité à se répliquer intracellulairement. Dans le but de caractériser l'activité biologique du LPS de *B. melitensis* 16M, celui-ci a été comparé avec celui d'entérobactéries comme *Escherichia coli*. Il en résulte que le LPS de *B. melitensis* 16M a des activités biologiques plus faibles que celui de *E. coli* O55. Ces activités reprennent la production de TNF $\alpha$  et d'oxyde nitrique, la léthalité et l'action des endotoxines. Ces taux d'activités plus faibles peuvent être mis en relation avec la structure du lipide A. En revanche, le LPS de *B. melitensis* 16M a une activité anti-complément plus élevée de même qu'une forte action d'adjuvant. Ce qui peut être utile pour sa survie (Tumurkhuu et al., 2006). Il est probable qu'une large part de la pathogénicité des organismes dont le LPS est lisse dérive de l'interférence du polysaccharide O avec la cellule hôte, permettant la survie intracellulaire et la réplication des bactéries à un nombre suffisant avant d'éveiller les fonctions immunitaires de l'hôte et causer la maladie (Fernandez-Prada et al., 2003). Il est aisé d'émettre l'hypothèse que la faible activité endotoxique induite par le LPS de *Brucella* peut être un des facteurs impliqués dans la survie

N° ORF	Annotation
BMEI0736	Ferrityochelin binding protein
BMEI1120	Phosphotyrosyl phosphatase activator
BMEI1132	ATPases of the PP superfamily
BMEI1161	Hypothetical Protein
BMEI1395	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase
BMEI1974	Diacylglycerol Kinase
BMEII0395	Transcriptional regulatory protein, asnc family
BMEII0410	Acetylglutamate kinase
BMEII0588	FdhD protein
BMEII0589	RibH2 Lumazine synthase
BMEII0690	FrnE protein
BMEII0900	mannose-6-phosphate isomerase / mannose-1-phosphate guanylyl transferase (gdp)
BMEII1036	zinc protease
BMEII037	zinc protease

**Tableau 2** : Les 14 ORFs de *Brucella melitensis* 16M (colonne de gauche) dont les protéines interagissent en double hybride avec les orthologues humains de protéines identifiées sur un phagosome artificiel de souris et l'annotation de ces domaines (colonne de droite). Communication interne.



**Figure 6** : Stratégie pour analyser l'internalisation de protéines bactériennes dans le cytosol de cellules eucaryotes. Un gène *X* est fusionné au gène de la cyclase. La protéine de fusion inactive est sécrétée par la bactérie. Dans le cas où la protéine est sécrétée dans une cellule eucaryote et qu'elle arrive à lier de la calmoduline, ce qui la rend active, elle convertit de l'ATP en AMP cyclique. C'est cet AMP cyclique que l'on mesure pour détecter s'il y a eu sécrétion dans la cellule eucaryote. D'après Sorry et Boland, 1995.

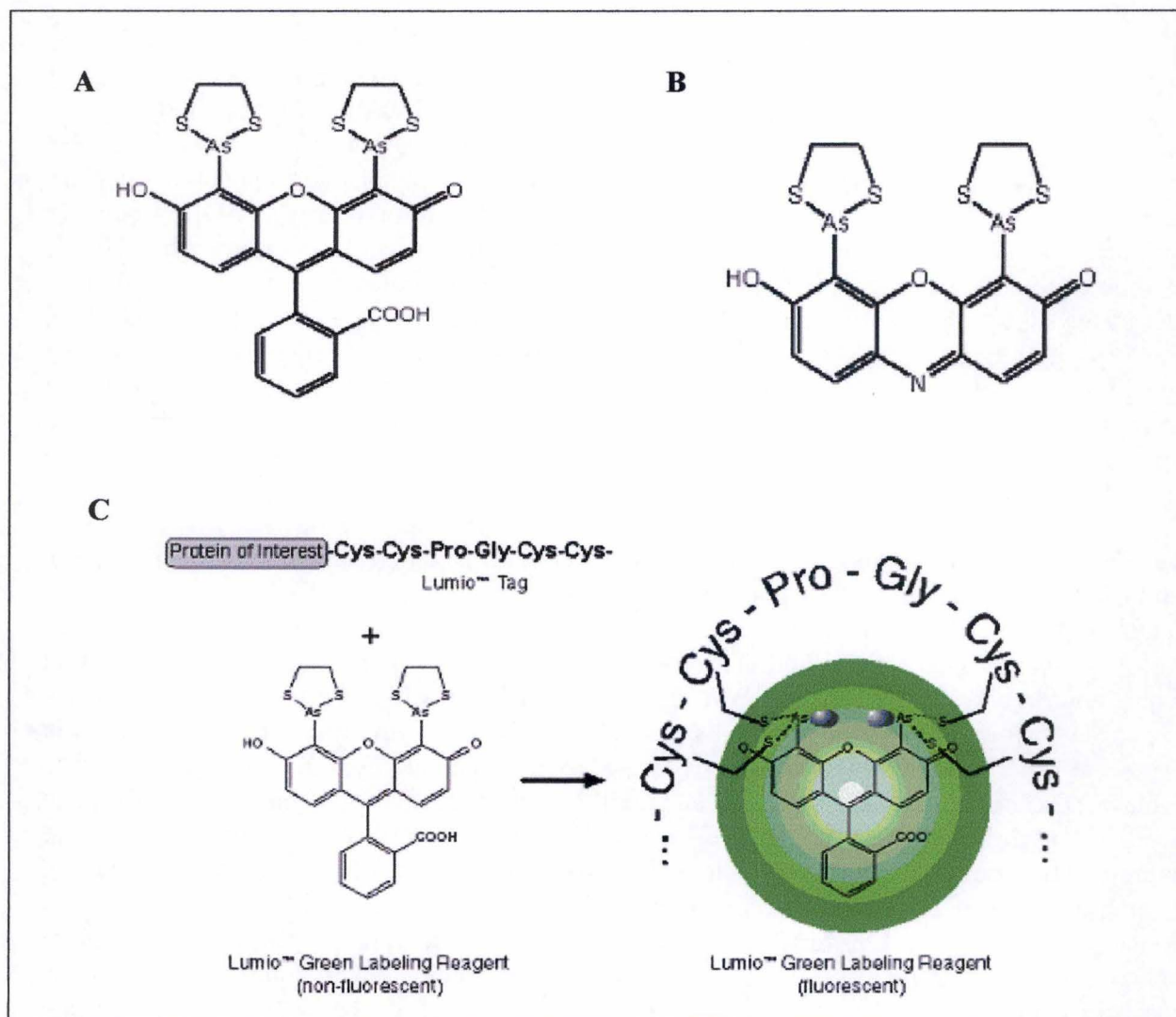
intracellulaire de la bactérie. De cette façon, la cellule hôte est capable de supporter la réplication intracellulaire du pathogène.

## 4.2. Aspect à l'étude

Au laboratoire, nous tentons d'identifier des effecteurs putatifs capables de manipuler le trafic intracellulaire. Il s'agit de mettre en évidence des protéines sécrétées par *Brucella melitensis* 16M et qui auraient un rôle dans la modification du trafic intracellulaire induite par celle-ci. Pour mettre en évidence de telles protéines, des fusions traductionnelles avec des ORFs de *B. melitensis* 16M et le domaine adénylate cyclase de l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis* *cyaA* ont été réalisées au cours de ce mémoire. Les ORFs choisies pour ces fusions sont entre autres celles de protéines identifiées lors d'un crible double hybride en levure (Tableau 2) comme interagissant avec des orthologues humains de protéines identifiées sur un phagosome artificiel de souris réalisé à l'aide d'une bille de latex (Garin et al., 2001). La région 5' du gène *cyaA*, *cyaA'*, est fusionnée en amont ou en aval de ces ORFs que l'on suppose ayant un rôle dans le trafic intracellulaire. Par la suite, si ces protéines correspondent à des protéines sécrétées dans le cytoplasme d'une cellule hôte eucaryote, une augmentation d'AMP cyclique due à l'activité enzymatique de l'adénylate cyclase devrait être observée (Fig. 6).

L'adénylate cyclase dépendante de la calmoduline est un des facteurs impliqués dans la virulence de *Bordetella pertussis*, l'agent causatif de la coqueluche (Gregory, 2006). Le locus *cya* encode cinq gènes dont celui de l'adénylate cyclase, *cyaA*, qui est doté de deux activités : une activité adénylate cyclase dont la fonction enzymatique convertit l'ATP en AMP cyclique et une activité hémolytique (Benz et al., 1994). Les gènes *cyaB*, *D* et *E* sont requis pour la sécrétion de *cyaA* et *cyaC* est requis pour l'activation du domaine hémolytique et pour la toxine adénylate cyclase mais pas pour l'activité enzymatique de celle-ci (Barry et al., 1991; Dalet et al., 2004). En effet, le terme toxine adénylate cyclase englobe l'adénylate cyclase et la protéine hémolytique qui en conditions normales permet l'entrée de l'adénylate cyclase dans les cellules. Le gène *cyaA* est traduit sous forme d'une protoxine activée par palmitoylation de la lysine 983 à l'aide du produit du gène *cyaC* qui est une acyltransférase. La première partie du gène *cyaA* correspond à l'adénylate cyclase et la deuxième partie au domaine hémolytique. La forme catalytique active de l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis* se trouve dans les 400 premiers résidus de la protéine encodée par le gène *cyaA* et correspondent à la protéine CyaA'. Le segment N-terminal de ce domaine porte le site catalytique tandis que le segment C-terminal correspond au domaine de liaison de la calmoduline et est dépourvu de propriétés catalytiques (Ladant et al., 1989). La toxine adénylate cyclase une fois activée par de la calmoduline endogène dans les cellules eucaryotes élève l'AMP cyclique intracellulaire de ces cellules jusqu'à un niveau cytotoxique

L'intérêt d'utiliser la protéine CyaA' comme rapporteur de sécrétion est multiple. L'adénylate cyclase intra bactérienne ne manifeste pas d'activité enzymatique puisque les bactéries ne produisent pas de calmoduline (Botsford and Harman, 1992) or la cyclase est calmoduline dépendante (Wolff et al., 1980). Donc une forte augmentation de la concentration en AMP cyclique reflète la sécrétion intracellulaire d'une protéine de fusion. De plus, il a été démontré que l'infection d'une monocouche de cellules par des souches sauvages de *Yersinia pseudotuberculosis* ne mène pas à une augmentation d'AMP cyclique (Rosqvist et al., 1991). Ce qui signifie que la détection de l'activité de la cyclase après infection de cellules eucaryotes indique la localisation intracellulaire de la fusion entre le gène *cyaA'* et un gène d'intérêt.



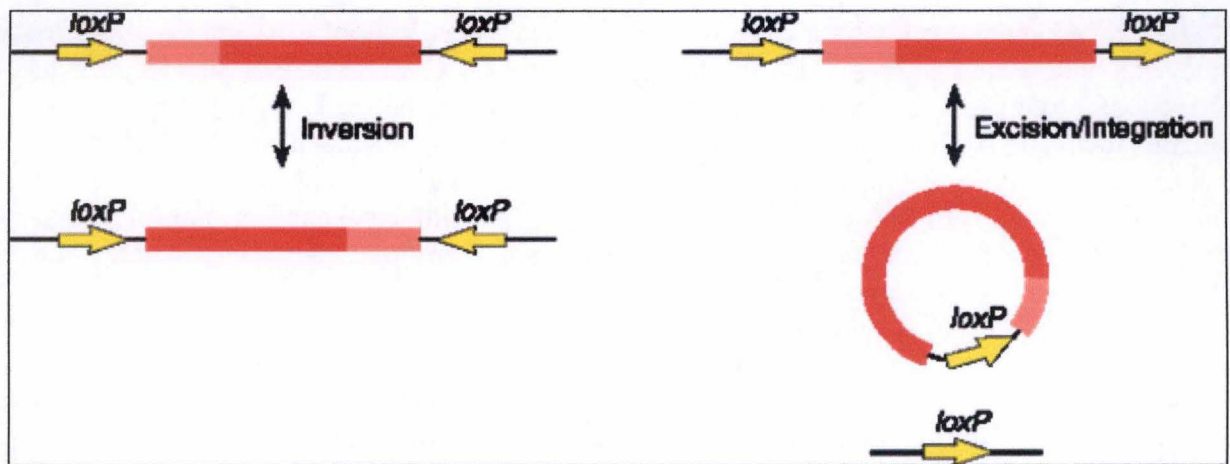
**Figure 7 :** **A)** Le réactif FIASH (Invitrogen). Formule:  $C_{24}H_{18}As_2O_5S_4$ . **B)** Le réactif ReAsH (Invitrogen). Formule:  $C_{16}H_{13}As_2NO_3S_4$ . **C)** Détection d'une protéine d'intérêt fusionnée au tag Lumio (Invitrogen). La fusion du tag Lumio avec une protéine est détectée par l'interaction du tag avec le Lumio Green Labeling Reagent non fluorescent au départ qui devient fluorescent une fois lié au tag par des liens disulfures.

Le rapporteur CyaA a été utilisé pour étudier la sécrétion de protéines chez des pathogènes autres que *Brucella*. En effet, le groupe de G. Cornelis a mis en évidence le transport de protéines bactériennes dans le cytosol de cellules hôtes. Dans cette optique, le domaine adénylate cyclase de *Bordetella pertussis* est fusionné à des protéines transférées dans les cellules hôtes par un système de sécrétion de type III. Les bactéries pathogènes du genre *Yersinia* sécrètent un set de protéines contre l'hôte infecté appelées Yop. *Yersinia pseudotuberculosis* transfère la protéine YopE à travers la membrane plasmique de la cellule hôte. Pour étudier ce processus de transfert, une *Yersinia enterocolitica* recombinante qui produit la fusion de YopE au rapporteur CyaA' a été fabriquée (Sory and Cornelis, 1994). L'infection d'une monocouche de cellules HeLa avec *Yersinia* recombinante a induit la formation d'une quantité significative d'AMP cyclique dans ces cellules, ce qui marque la présence de la protéine hybride dans le cytoplasme de la cellule hôte eucaryote. La protéine YopH qui est une tyrosine phosphatase semble suivre la même voie que YopE et son transport a également été analysé par une approche utilisant une fusion du gène d'intérêt avec celui de l'adénylate cyclase (Sory et al., 1995). Plus récemment, CyaA' a été utilisé pour démontrer la translocation de deux protéines de *Legionella* (LepA et LepB) dans les macrophages murins par le système Dot/Icm. Comme prédit pour la plupart des systèmes de type IV, l'appareil Dot/Icm engage des protéines dans le cytosol de la cellule bactérienne et les transporte via cet appareil dans la cellule eucaryote. RalF fait partie de ces protéines et son transport dans la cellule hôte a été étudié à l'aide de l'approche de fusion avec CyaA (Nagai et al., 2005).

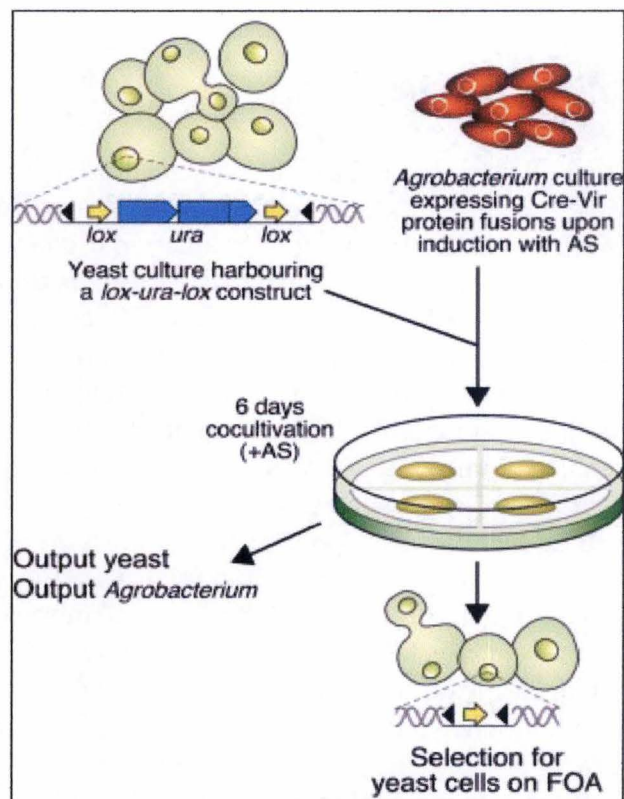
### 4.3. Autres types de rapporteur

D'autres étiquettes ou rapporteurs existent pour mettre en évidence la sécrétion de protéines. Parmi ceux-ci, le rapporteur *Lumio* constitué de six acides aminés (cystéine-cystéine-proline-glycine-cystéine-cystéine) permet la production d'une protéine d'intérêt avec cette séquence d'acides aminés en N- ou en C-terminal. La détection de la fusion à une protéine d'intérêt peut se réaliser à l'aide de deux réactifs non fluorescents, le FIAsh (Fig. 7-A) et le ReAsH (Fig. 7-B). Ces réactifs sont des molécules contenant deux arsenics qui se lient spécifiquement et avec une haute affinité au motif tétracystéine (CCXXCC). Les deux groupes arsenics lient deux thiols du rapporteur tétracystéine et cette liaison rend les substrats fluorescents (Fig. 7-C). FIAsh est un dérivé de la fluorescéine et le ReAsH est un dérivé du fluorophore rouge résorufine. Des expériences à l'aide du rapporteur *Lumio* ont montré que deux effecteurs de l'appareil de sécrétion de type III de *Shigella flexneri*, IpaB et IpaC, étaient sécrétés et injectés dans la cellule hôte (Enninga et al., 2005). Une fois qu'il y a contact, ces protéines sont sécrétées et forment un complexe dans la membrane de la cellule hôte permettant la translocation d'autres effecteurs de l'appareil de type III.

Un autre rapporteur, le rapporteur Cre encode le gène de la recombinase Cre, une protéine produite par le bactériophage P1 et qui reconnaît spécifiquement une séquence d'ADN consensus de 34 pb appelée site *loxP*. Cette recombinase est une enzyme qui catalyse la recombinaison entre deux séquences d'ADN *loxP* auxquelles elle se lie. A l'issue de la recombinaison on a soit excision d'une séquence d'ADN si les sites *loxP* sont orientés dans le même sens soit inversion d'une séquence d'ADN si ces sites sont orientés en sens inverse (Fig. 8). Le système Cre/*lox* repose sur la fusion d'un gène d'intérêt avec la recombinase qui dès qu'elle se retrouve dans le cytoplasme excise un gène et change la sensibilité de la cellule. Ce système a notamment été utilisé pour détecter le transfert de protéines Vir d'*Agrobacterium tumefaciens* vers la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Schrammeijer et al., 2003). Les protéines de fusion entre Cre et VirE2 ou VirF sont exprimées dans *Agrobacterium* et le transfert est contrôlé par un événement d'excision sélectionné qui résulte



**Figure 8 :** Mode d'action de la recombinase Cre. La recombinase Cre est une enzyme qui catalyse la recombinaison d'ADN situé entre deux séquences consensus *loxP*. Lorsque les sites *loxP* sont orientés en sens inverse, l'évènement de recombinaison résulte en l'inversion d'une séquence d'ADN tandis que lorsque les sites sont orientés dans le même sens on a excision d'une molécule d'ADN.



**Figure 9 :** Stratégie de détection du transfert de protéines Vir d'*Agrobacterium tumefaciens* dans la levure. La levure contient une séquence *lox-URA3-lox*. Dans le cas où *Agrobacterium* exprime et sécrète la protéine de fusion Cre-Vir dans la levure, une co-culture des deux types de cellules en présence d'acétosyringone (AS), un inducteur de l'expression de la protéine de fusion, cela donne lieu à un évènement de recombinaison entre les sites *lox* qui résulte en la perte du gène *URA3* et donc la capacité de croître sur un milieu contenant du 5FOA. D'après Schrammeijer et den Dulk-Ras, 2003.

d'une recombinaison site spécifique médiée par Cre sur un transgène de levure flanqué de sites *lox*. Les levures *S. cerevisiae* contiennent un marqueur *lox-URA3-lox* intégré. Une fois co-cultivées avec des cellules d'*Agrobacterium* exprimant la protéine de fusion Cre-Vir pendant six jours, les cellules sont étalées sur un milieu contenant du 5-FOA, un composé non toxique qui est converti en un composé toxique par les cellules exprimant le gène *URA3*. La libération d'une enzyme Cre fonctionnelle d'*Agrobacterium* vers la levure est détectée par l'excision du gène *URA3* et donc la capacité des levures à pousser sur un milieu contenant du 5-FOA (Fig. 9).

# *Objectifs*

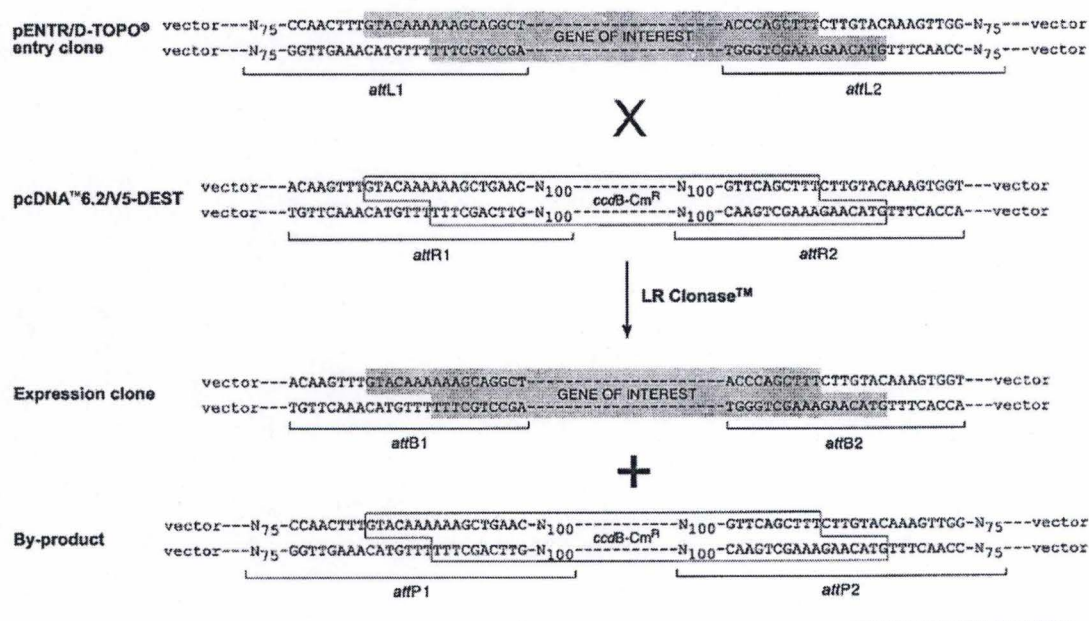
*Brucella melitensis* est la bactérie en cause des brucelloses humaines les plus sévères et de la décimation par contamination de nombreux troupeaux de bétail qui représentent une perte économique importante notamment dans les pays sous-développés. De ce fait, c'est un sujet d'étude grandissant en vue d'approfondir son mode de vie ainsi que sa pathogénie afin de développer des outils et notamment un vaccin pour lutter contre ce pathogène. Un des aspects de son mode de vie chez l'hôte, la survie intracellulaire et plus précisément le trafic intracellulaire, fait l'objet d'études aux Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix. En effet, les bactéries du genre *Brucella* détournent le trafic intracellulaire à leur avantage en court-circuitant le trajet habituel des endosomes vers le lysosome, lieu de destruction des pathogènes. La manière dont ce court-circuit a lieu et les protéines engagées sont à l'étude.

L'objectif de ce mémoire consiste à développer des outils permettant l'étude et l'identification des protéines engagées dans ce court-circuit. Il s'agit de mettre en évidence parmi les effecteurs putatifs impliqués dans le trafic intracellulaire de *Brucella melitensis* 16M ceux qui sont sécrétés. L'identification de telles protéines est basée sur un crible double hybride qui a été réalisé en levure par le Docteur Alexandre Jamet avec des protéines phagosomales et 3000 protéines prédites de *B. melitensis* 16M. Quatorze protéines de cette bactérie interagissent avec des protéines phagosomales humaines (Garin et al., 2001). Tout ceci laisse penser que ces protéines bactériennes interviennent dans la manipulation du trafic vésiculaire des cellules eucaryotes. Néanmoins, cette donnée d'interaction ne prouve pas que ces protéines soient des effecteurs sécrétés ou transloqués par la bactérie au cours de l'infection. L'objectif du travail est de réaliser des fusions entre deux des quatorze protéines bactériennes mentionnées ci-dessus et aussi d'autres protéines que l'on pense être des effecteurs bactériens et des étiquettes permettant de détecter la sécrétion ou la translocation d'effecteurs. Une de ces étiquettes est le domaine N-terminal de l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis*, CyaA', dont l'activité est calmoduline dépendante (Wolff et al., 1980). En présence de calmoduline, l'adénylate cyclase de *Bordetella* convertit l'ATP en AMP cyclique. L'absence de calmoduline dans les bactéries nous permettra de discriminer les protéines de fusion sécrétées et les protéines de fusion non sécrétées. Par ailleurs, une augmentation de la concentration en AMP cyclique devrait être observée dans ces cellules où des protéines de fusion sont exportées dans le cytoplasme.

# *Résultats*

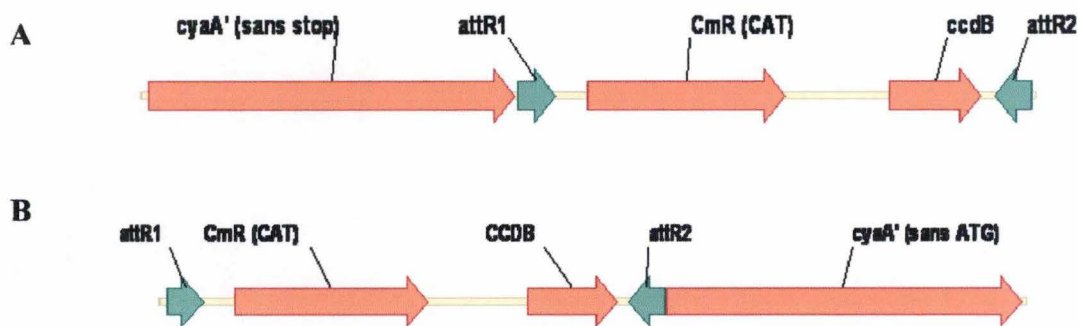
# 1. Construction des plasmides de destination

L'objectif de ce mémoire est de développer des outils pour étudier et identifier des effecteurs de *B. melitensis* 16M impliqués dans le trafic intracellulaire de cette bactérie. La construction de ces outils fait appel à la technologie Gateway qui est une méthode de clonage basée sur la recombinaison site spécifique. Il s'agit d'une méthode rapide et efficace pour déplacer une séquence d'ADN (flanquée de sites *att*) dans de multiples vecteurs. La recombinaison est réalisée par deux types de clonase, la BP ou la LR clonase, suivant les sites entourant la séquence d'ADN. Comme son nom l'indique, la LR clonase catalyse la réaction de recombinaison entre des sites *attL1-attL2* et des sites *attR1-attR2* (Fig. 1).

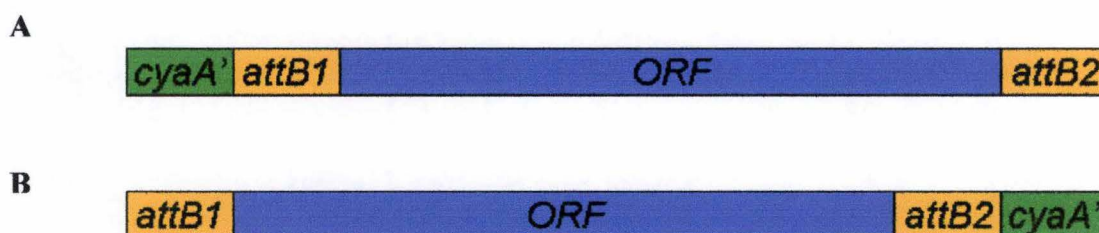


**Figure 1 :** Exemple de réaction de recombinaison *attL* x *attR* (LR). A l'issue de la recombinaison opérée par la LR Clonase, la séquence d'intérêt ou "Gene of Interest" portée par le pENTR/D-TOPO (entry clone) se retrouve dans un vecteur d'expression ou "Expression Clone".

Le but est de construire des plasmides ou vecteurs de destination Gateway portant le gène *cyaA'* fusionné en amont ou en aval d'une cassette Gateway (Fig. 2-A, 2-B). La cassette Gateway utilisée pour la fusion comprend les sites de recombinaison *attR1* et *attR2*, un gène de résistance au chloramphénicol et le marqueur de contre sélection *ccdB*. Ces plasmides sont construits afin de réaliser par la suite une recombinaison à l'aide des sites *att* et obtenir un plasmide portant la fusion du gène *cyaA'* en amont ou en aval d'une ORF de *Brucella melitensis* 16M (Fig. 3-A, 3-B) permettant l'expression de protéines chimères ORF*CyaA'*C ou *CyaA'*NORF. Ces ORFs sont entre autres choisies parmi les 14 ORFs de *B. melitensis* 16M qui interagissent en crible double hybride avec les orthologues humains de protéines phagosomales de souris. Les protéines issues de ces ORFs sont supposées être impliquées dans le trafic intracellulaire de la bactérie du fait de cette interaction.

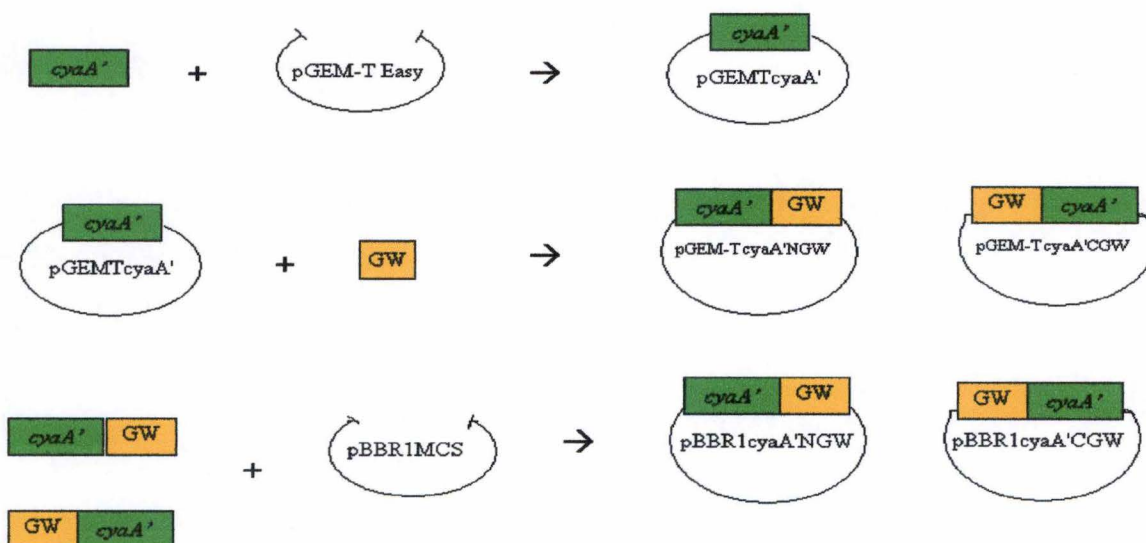


**Figure 2 :** **A)** Le gène *cyaA'* fusionné en amont d'une cassette Gateway. **B)** Le gène *cyaA'* fusionné en aval d'une cassette Gateway. La cassette Gateway porte les sites de recombinaison *attR1* et *attR2*, le gène de résistance au chloramphénicol (*CmR*) et le marqueur de contre sélection *ccdB*.



**Figure 3 :** **A)** Le gène *cyaA'* en amont d'une ORF de *B. melitensis* 16M. **B)** Le gène *cyaA'* en aval d'une ORF de *B. melitensis* 16M.

La figure 4 présente le schéma général de la construction des vecteurs de destination : le gène *cyaA'* est cloné dans le pGEM-T Easy pour donner le pGEM-T*cyaA'*. La cassette Gateway est ensuite insérée dans ce vecteur en 5' ou en 3' du gène *cyaA'* pour donner le pGEM-T*cyaA'*NGW. La fusion *cyaA'*C/NGW est enfin insérée par clonage dans le pBBR1MCS pour donner le pBBR1*cyaA'*NGW. Le détail des constructions est repris plus loin.



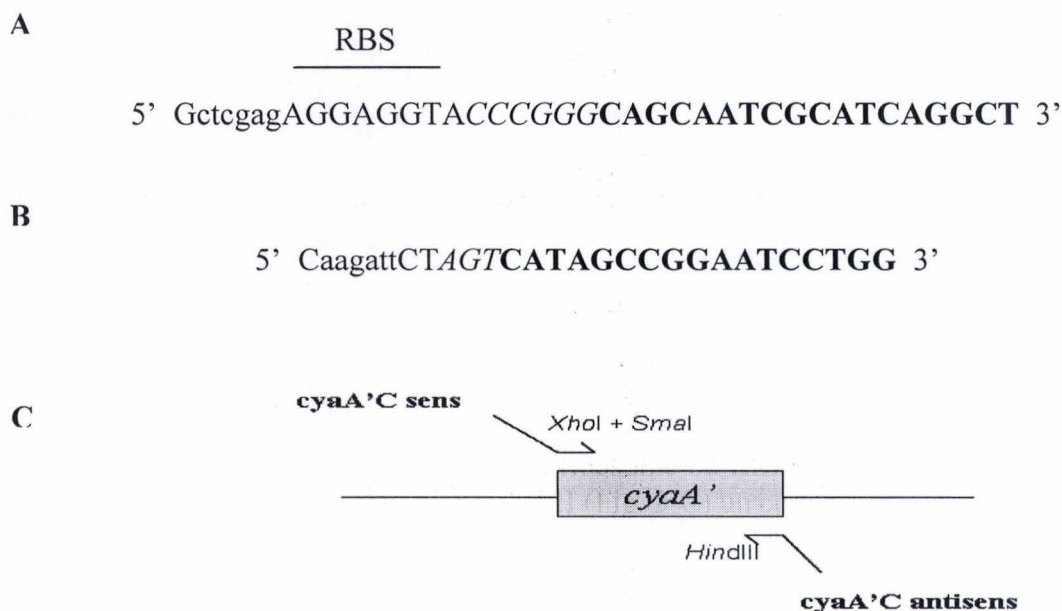
**Figure 4 :** Schéma général de la construction des vecteurs de destination.

## 1.1. Amplification de *cyaA'*

La première étape de la construction de ces plasmides est l'amplification par PCR du gène *cyaA'* à l'aide d'amorces spécifiques en vue de cloner celui-ci. Le fragment *cyaA'* porté par le plasmide pMS107 correspond à la partie N-terminale du gène *cyaA* (Sory and Cornelis, 1994). Par facilité, on distingue l'amplification de *cyaA'C* et *cyaA'N* en référence à la position de CyaA' dans la structure de la future protéine de fusion c'est-à-dire positionné en C- ou en N-terminal par rapport aux produits des ORFs de *B. melitensis* 16M, respectivement. Deux types de fusion sont réalisées pour s'affranchir du fait que la sécrétion des protéines par l'appareil de type IV puisse être gênée par la fusion d'un rapporteur à la séquence signal qui se trouve généralement en région C-terminale des protéines (Hubber et al., 2004). On parle également de *cyaA'CTL* qui correspond au rapporteur CyaA' sans fusion. En effet, *cyaA'CTL* n'est pas fusionné à une ORF de *B. melitensis* 16M et sert de contrôle de sécrétion supposé négatif.

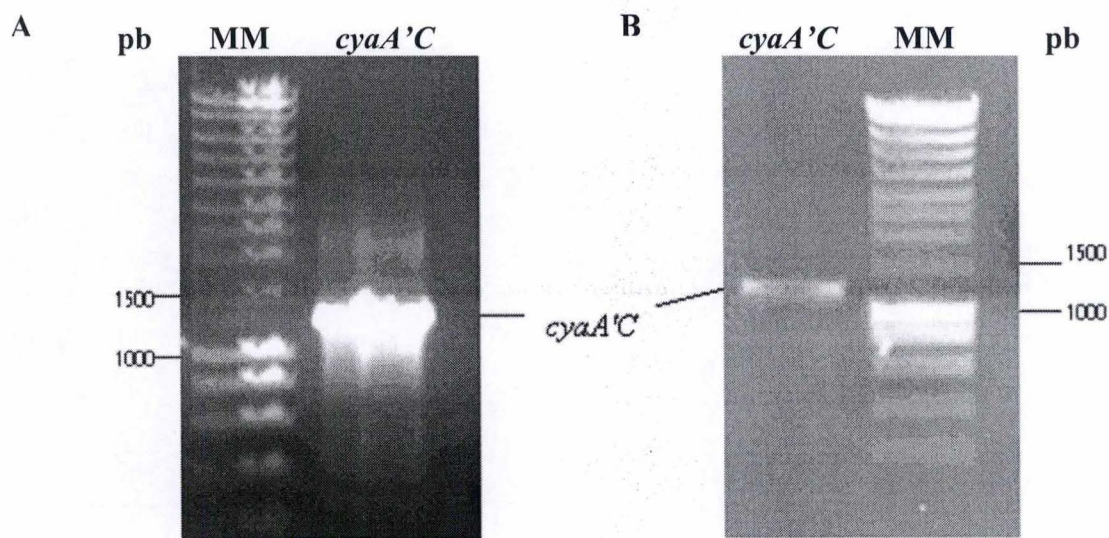
- Amplification par PCR de *cyaA'C*

Après amplification avec la High Fidelity et à l'aide des amorces *cyaA'C* sens (Fig. 5-A) et antisens (Fig. 5-B) les fragments *cyaA'C* doivent avoir une taille de 1242 pb. Le fragment *cyaA'C* est amplifié des nucléotides 4 à 1197 à partir de l'ATG (codon d'initiation de la traduction) du gène *cyaA'*. L'amorce sens permet d'introduire les sites de restriction *XhoI* et *SmaI* ainsi que le site de liaison du ribosome ou RBS. L'amorce antisens quant à elle introduit en plus du site de restriction *HindIII* (Fig. 5-C) un codon de fin de traduction (TGA).



**Figure 5 :** A) Amorce *cyaA'C* sens. Le site de restriction *XhoI* est en minuscules, le site de restriction *SmaI* est en italique et la séquence homologue au gène *cyaA'* est en gras. Le RBS (AGGAGGT) est mis en évidence à l'aide d'un trait horizontal noir. B) Amorce *cyaA'C* antisens. Le site de restriction *HindIII* est en minuscules, le codon de fin de traduction est en italique et la séquence homologue au gène *cyaA'* est en gras. C) Schéma de la position des amorces *cyaA'C* sens et antisens.

Quelques microlitres de l'amplification PCR sont déposés sur gel d'agarose 1% pour vérifier que l'amplification a eu lieu et que l'on obtient des fragments de taille attendue et en l'occurrence des fragments de 1242 pb dans le cas de *cyaA'C*. Les fragments sont de taille attendue puisque la bande de migration se situe entre les bandes à 1500 et 1000 pb du marqueur moléculaire (Fig. 6-A).

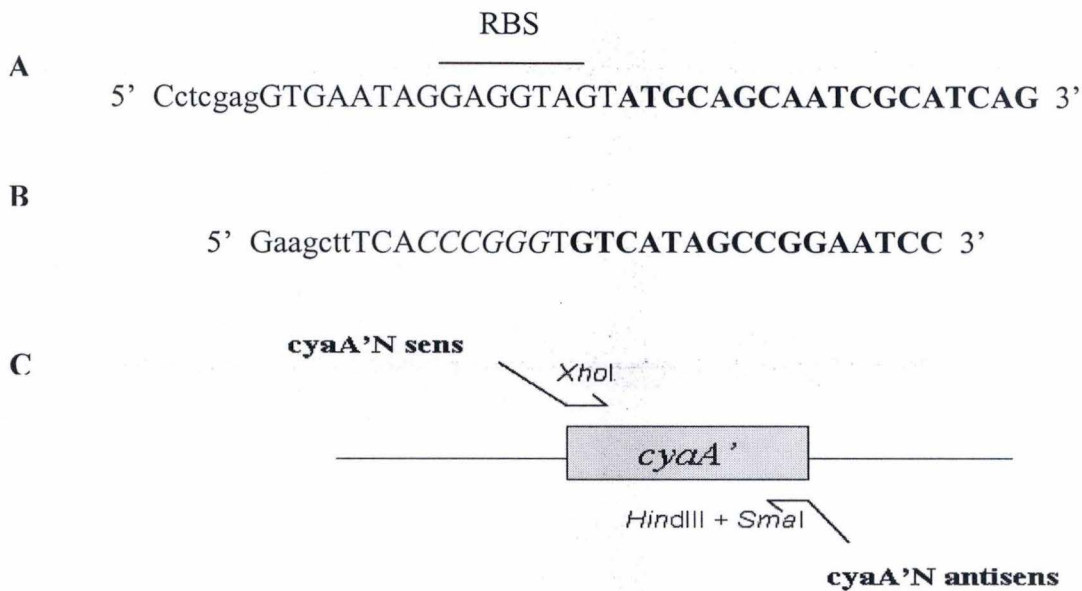


**Figure 6 :** A) Fragment *cyaA'C*. 10  $\mu$ l de PCR déposés sur gel agarose 1%. B) *cyaA'C* purifié. 3  $\mu$ l de purification déposés sur gel d'agarose 1%. MM: marqueur moléculaire. pb: paires de bases.

Une fois amplifiés, les fragments *cyaA'C* sont purifiés pour éliminer les produits intervenant lors de l'amplification tels que la polymérase, les amorces, les dNTP et autres impuretés. Les fragments sont purifiés par extraction du gel d'agarose 1% d'après le "DNA Extraction Kit" (Fermentas). Un échantillon de la purification est déposé sur gel d'agarose 1% pour s'assurer que les fragments n'ont pas été perdus durant la purification (Fig. 6-B).

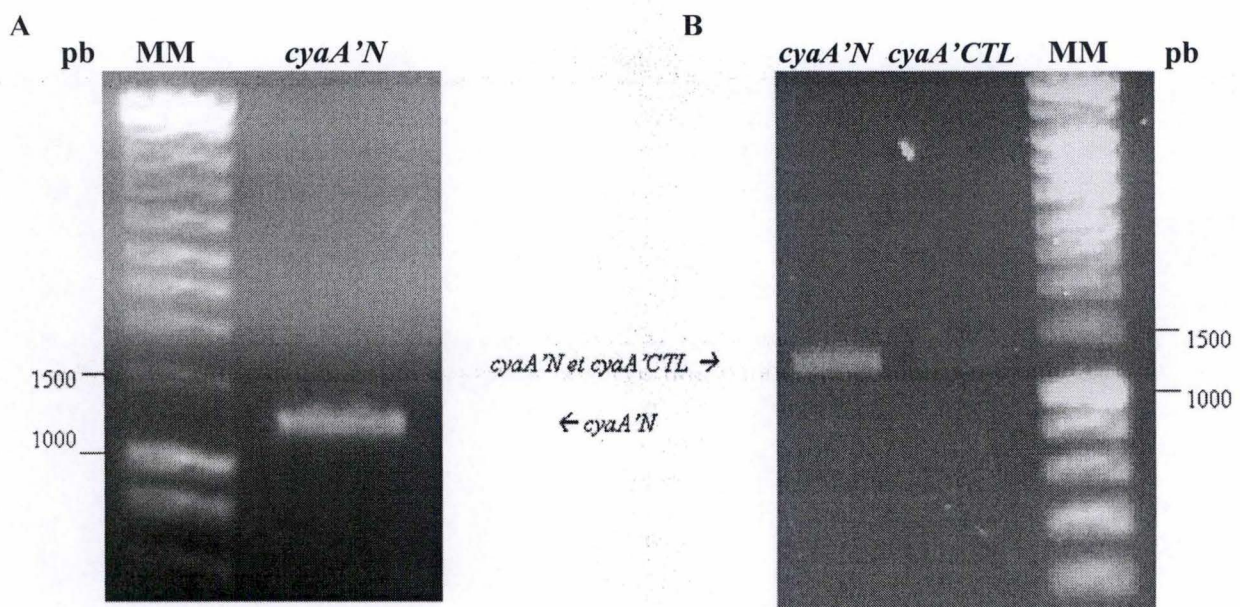
- Amplification par PCR de *cyaA'N*

Après amplification du fragment *cyaA'* avec la High Fidelity et à l'aide des amorces *cyaA'N* sens (Fig. 7-A) et antisens (Fig. 7-B) on doit obtenir des fragments d'une taille de 1255 pb. Le fragment *cyaA'N* est amplifié avec le codon d'initiation de la traduction présent sur le gène *cyaA'*. L'amorce sens permet d'introduire le site de restriction *XhoI* et le RBS. L'amorce antisens introduit les sites de restriction *HindIII* et *SmaI* (Fig. 7-C).



**Figure 7 :** **A)** Amorce *cyxA'N* sens. Le site de restriction *XhoI* est en minuscules et la séquence homologue au gène *cyxA'* est en gras. Le RBS (AGGAGGT) est mis en évidence à l'aide d'un trait horizontal noir. **B)** Amorce *cyxA'N* antisens. Le site de restriction *HindIII* est en minuscules, le site de restriction *SmaI* est en italique et la séquence homologue au gène *cyxA'* est en gras. **C)** Schéma de la position des amorces *cyxA'N* sens et antisens.

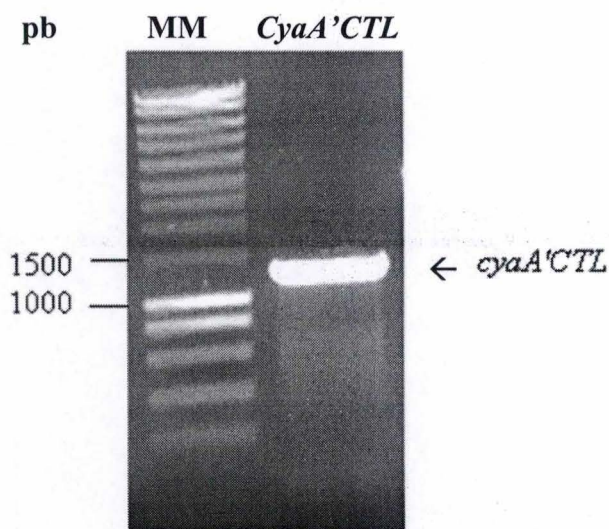
Quelques microlitres de l'amplification par PCR sont déposés sur gel d'agarose 1% pour vérifier que l'amplification a eu lieu et que celle-ci donne des fragments de taille attendue. Ce qui est le cas puisque l'on observe une bande située entre les bandes à 1500 et 1000 pb du marqueur moléculaire (Fig. 8-A). Les fragments *cyxA'N* sont purifiés à l'aide du kit "PCR Clean-Up System" (Promega). La figure 8-B présente la migration d'un échantillon des produits de purification qui atteste de la présence des fragments d'ADN après purification.



**Figure 8 :** **A)** Fragment *cyxA'N*. 10 µl de PCR déposés sur gel d'agarose 1%. **B)** *cyxA'N* et *cyxA'CTL* purifiés. 3 µl de purification déposés sur gel d'agarose 1%. MM : marqueur moléculaire. pb : paires de bases.

- Amplification par PCR de *cyaA'*CTL

Le fragment *cyaA'*CTL est amplifié avec la High Fidelity et à l'aide des amorces *cyaA'*N sens (Fig. 7-A) et *cyaA'*C antisens (Fig. 5-B). Grâce à ces amorces les sites de restriction *Xho*I et *Hind*III sont introduits ainsi qu'un RBS et un codon de fin de traduction. Le codon d'initiation de la traduction porté par *cyaA'* est conservé lors de l'amplification. Les fragments attendus ont une taille 1242 pb et c'est ce que l'on obtient après amplification (Fig. 9). Les fragments sont purifiés à l'aide du kit "PCR Clean-Up System" (Promega). Un échantillon de la purification est déposé sur gel d'agarose 1% pour vérifier que les fragments n'ont pas été perdus lors de la purification (Fig. 8-B). Ceux-ci n'ont pas été perdus et sont purifiés.



**Figure 9 :** Fragment *cyaA'*CTL. 10  $\mu$ l des produits PCR sont déposés sur gel d'agarose 1%. MM : marqueur moléculaire. pb : paires de bases.

## 1.2. Clonage en pGEM-T Easy

Les fragments *cyaA'*C, *cyaA'*N et *cyaA'*CTL sont insérés dans le plasmide pGEM-T Easy par ligation. Le pGEM-T Easy utilisé pour la ligation est pré-restreint en *Eco*RV et une thymidine terminale a été ajoutée aux extrémités 3' ce qui donne des bouts protrudants permettant l'insertion de fragments compatibles avec ce type d'extrémité.

- Clonage de *cyaA'*C en pGEM-T Easy

Le pGEM-T Easy est ligué à *cyaA'*C au cours d'une réaction de ligation et la ligation est transformée en *E. coli* DH10B pour cloner le pGEM-T*cyaA'*C (Fig. 10). La transformation est étalée sur un milieu sélectif contenant de l'ampicilline, de l'isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) et du 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal). Les colonies qui possèdent le plasmide pGEM-T*cyaA'*C sont blanches en référence au test blanc/bleu et poussent sur milieu contenant de l'ampicilline car le pGEM-T Easy (Fig. 11) porte le gène de résistance contre cet antibiotique (*bla*).

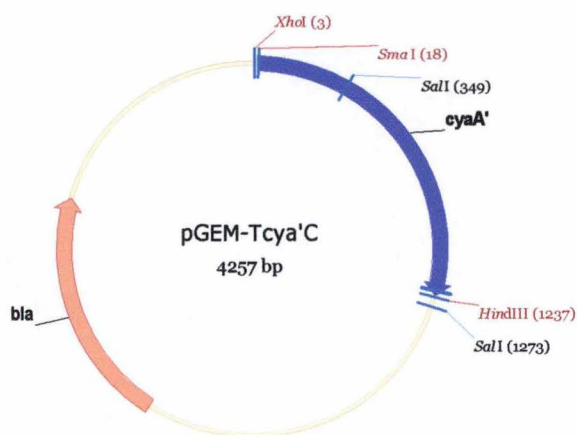


Figure 10 : Le plasmide pGEM-TcyaA'C.

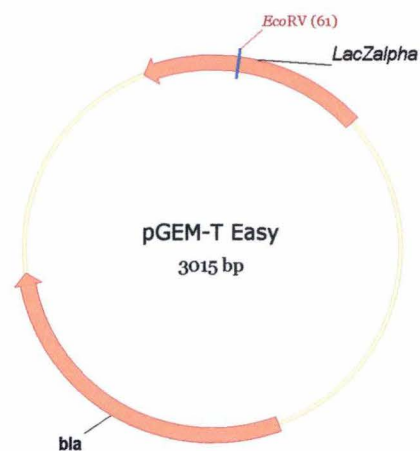


Figure 11 : Le plasmide pGEM-T Easy.

Deux colonies blanches issues de la transformation sont mises en culture en milieu LB + ampicilline afin d'en extraire le pGEM-TcyaA'C d'une taille de 4257 pb par minipréparation d'ADN plasmidique. Une restriction diagnostique est réalisée pour vérifier que le plasmide extrait est celui attendu. Pour cela, un échantillon de la minipréparation est digéré par *SalI* qui a deux sites de restriction sur le plasmide : un dans la séquence de *cyaA'C* et un dans le pGEM-T Easy. Après restriction on s'attend à avoir des bandes d'une taille de 924 et 3333 pb. Un contrôle de non restriction est également réalisé. Les deux clones issus des colonies mises en culture correspondent au plasmide pGEM-TcyaA'C car ils ont le profil de restriction attendu (Fig. 12).

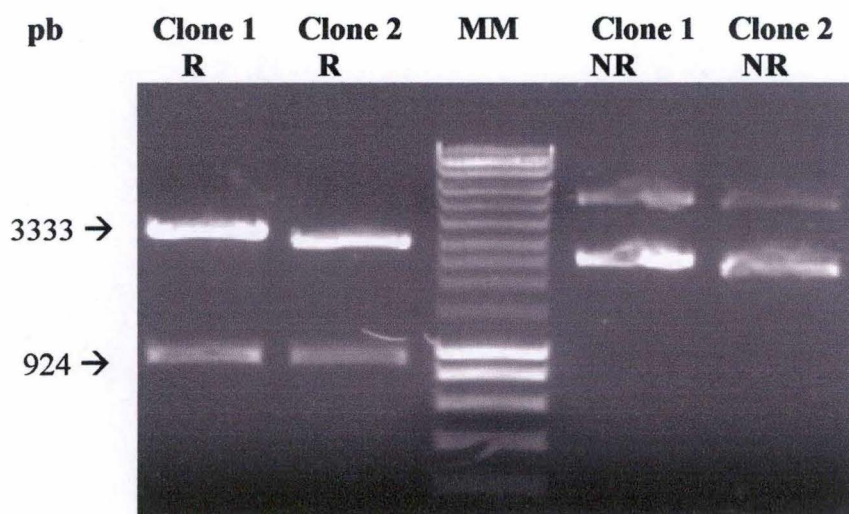
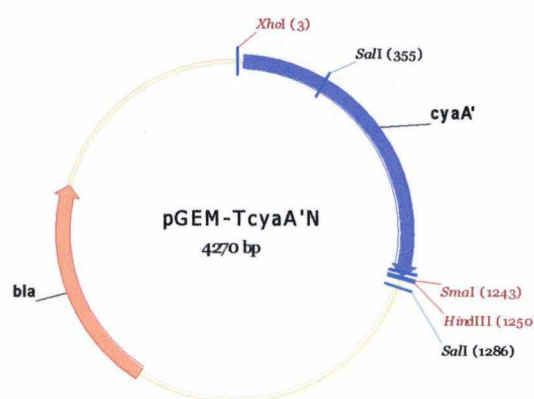


Figure 11 : Restriction diagnostique de 1 µl du pGEM-TcyaA'C par *SalI*. Taille des bandes en référence au marqueur de poids moléculaire (MM) SmartLadder (Eurogentec). pb : paires de bases. R : restreint. NR : non restreint.

Une fois que le fragment *cyaA*'C a été cloné dans le pGEM-T Easy le plasmide est séquencé pour s'assurer que l'amplification par PCR n'ait pas introduit de mutations dans le gène *cyaA*'C. Le séquençage a révélé que le gène contenait des mutations c'est pourquoi les étapes d'amplification et de clonage ont été répétées jusqu'à obtenir comme ce fut le cas un clone dont la séquence ne porte pas de mutation.

- Clonage de *cyaA*'N en pGEM-T Easy

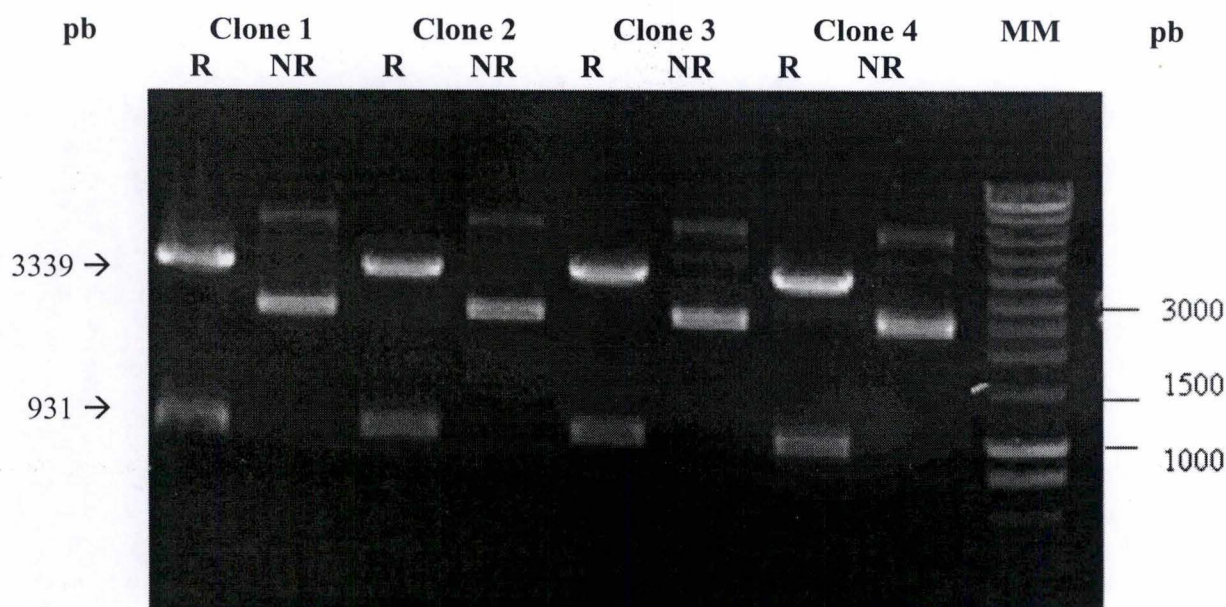
La séquence *cyaA*'N a été insérée par ligation dans le pGEM-T Easy pour donner le plasmide pGEM-T*cyaA*'N d'une taille de 4270 pb (Fig. 13). Le mélange de ligation est transformé en *E. coli* DH10B pour cloner le plasmide. Parmi les transformants sélectionnés sur milieu contenant de l'ampicilline, de l'IPTG et du X-gal, quatre colonies blanches sont mises en culture en milieu LB + ampicilline.



Le pGEM-T*cyaA*'N porte le gène de résistance à l'ampicilline, les sites de restriction *EcoRV*, *HindIII*, *SalI*, *SmaI*, *XhoI* et le gène *cyaA*'.

**Figure 13 :** Le plasmide pGEM-T*cyaA*'N.

Une minipréparation d'ADN est effectuée sur ces quatre colonies pour récupérer le plasmide et une restriction diagnostique par *SalI* est réalisée sur une partie de la minipréparation pour s'assurer que l'on a récupéré le plasmide attendu. Les bandes attendues ont une taille de 3339 et 931 pb. Un contrôle de non restriction sans l'enzyme *SalI* est également réalisé. *SalI* a un site de restriction dans la séquence du gène *cyaA*'N et un dans le pGEM-T Easy. Après restriction, on constate que les quatre clones obtenus par minipréparation d'ADN présentent le profil attendu (Fig. 14).

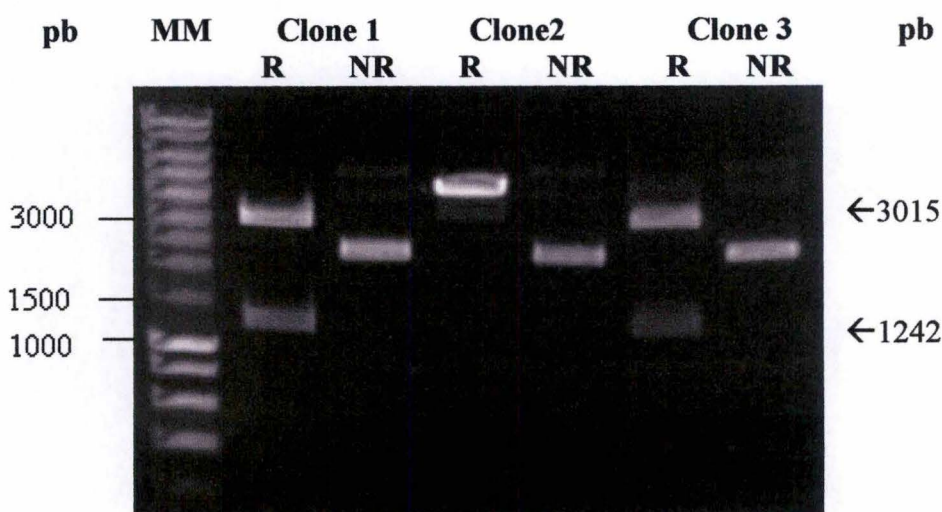


**Figure 14** : Restriction diagnostique de 1  $\mu$ l du pGEM-*TcyA'N* par *SalI*. MM : marqueur moléculaire. pb : paires de bases. R : restreint. NR : non restreint.

De même que pour le pGEM-*TcyA'C*, le séquençage du pGEM-*TcyA'N* a révélé que le gène *cyA'N* porte des mutations. Les étapes d'amplification, de clonage et de séquençage du plasmide ont été répétées et à chaque fois le pGEM-*TcyA'N* portait les mêmes mutations c'est-à-dire l'isoleucine 194 en isoleucine (C $\rightarrow$ T), la glycine 370 en sérine (G $\rightarrow$ A), la sérine 375 en phénylalanine (C $\rightarrow$ T). Par soucis, le pMS107, matrice portant la séquence *cyA'*, et utilisé lors de l'amplification par PCR est également séquençé et il s'avère que celui-ci porte les mêmes mutations. La suite des expériences s'est poursuivie avec un clone contenant ces mutations. Celles-ci se trouvent en fin de protéine et ne sont pas situées dans des endroits importants de la protéine c'est-à-dire ni dans le site actif ni dans le site liaison de la calmoduline. De plus, elles n'introduisent pas de codon de terminaison de la traduction dans la séquence de *cyA'*. Tout ceci laisse supposé que les protéines sont actives.

- Clonage de *cyA'CTL* en pGEM-T Easy

La séquence du gène *cyA'CTL* est également liguée au pGEM-T Easy et la ligation pour obtenir le pGEM-*TcyA'CTL* est transformée en DH10B puis étalée sur milieu sélectif contenant de l'ampicilline, de l'IPTG et du X-gal. Trois colonies blanches sont mises en culture LB + ampicilline et les plasmides sont extraits des cellules par minipréparation d'ADN plasmidique. Un échantillon des plasmides récoltés est restreint par *XhoI-HindIII* comme contrôle positif de la présence des plasmides recherchés et un contrôle sans enzyme est réalisé. Parmi les trois clones obtenus par minipréparation d'ADN seuls les clones 1 et 3 présentent le profil attendu soit des bandes à 1242 et 3015 pb (Fig. 15). Le clone 2 n'a pas le bon profil et la bande à environ 3000 pb correspond au pGEM-T Easy.

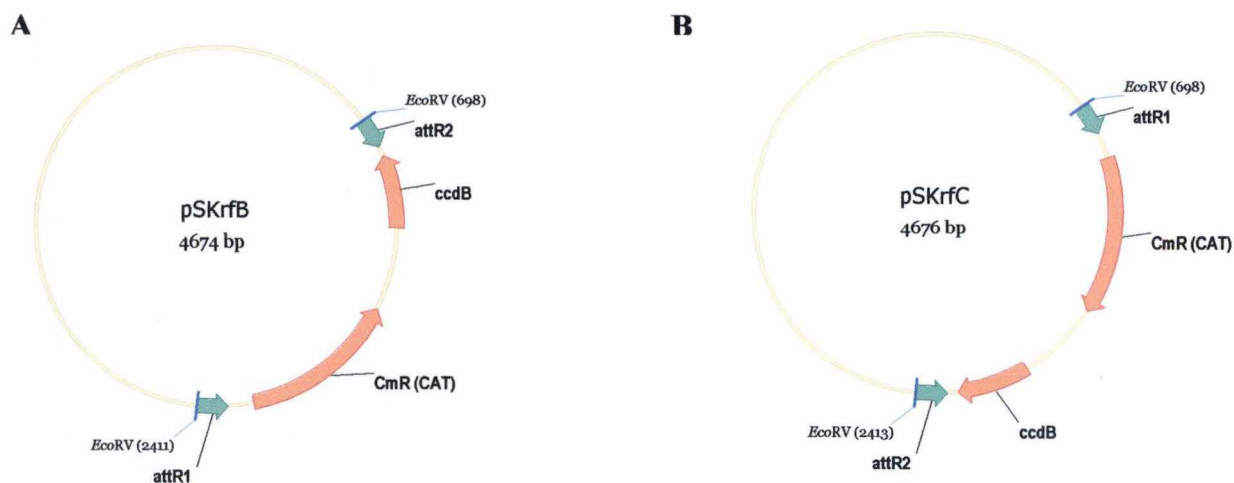


**Figure 15 :** Restriction diagnostique de 1  $\mu$ l du pGEM-TcyA'CTL par XhoI-HindIII. MM : marqueur moléculaire. pb : paires de bases. R : restreint. NR : non restreint.

Le séquençage du plasmide a révélé les mêmes mutations que pour le pGEM-TcyA'N. La suite des expériences est réalisée avec un clone qui possède ces mutations.

### 1.3. Fusion avec la cassette Gateway

Les plasmides pGEM-T contenant les gènes *cyA'C* ou *cyA'N* sont restreints par *SmaI* afin d'y insérer la cassette Gateway (GW) provenant du pSKrfB (Fig. 16-A) dans le cas de *cyA'C* et pSKrfC (Fig. 16-B) dans le cas de *cyA'N*. Cette cassette permettra par recombinaison de fusionner *cyA'* en amont ou en aval d'ORFs de *B. melitensis* 16M. La provenance de la cassette est choisie pour conserver la phase de lecture lors de la fusion. Le site de restriction *SmaI* a été introduit grâce aux amorces dessinées pour l'amplification par PCR de *cyA'*.



**Figure 16 :** A) Le plasmide pSKrfB. B) Le plasmide pSKrfC.

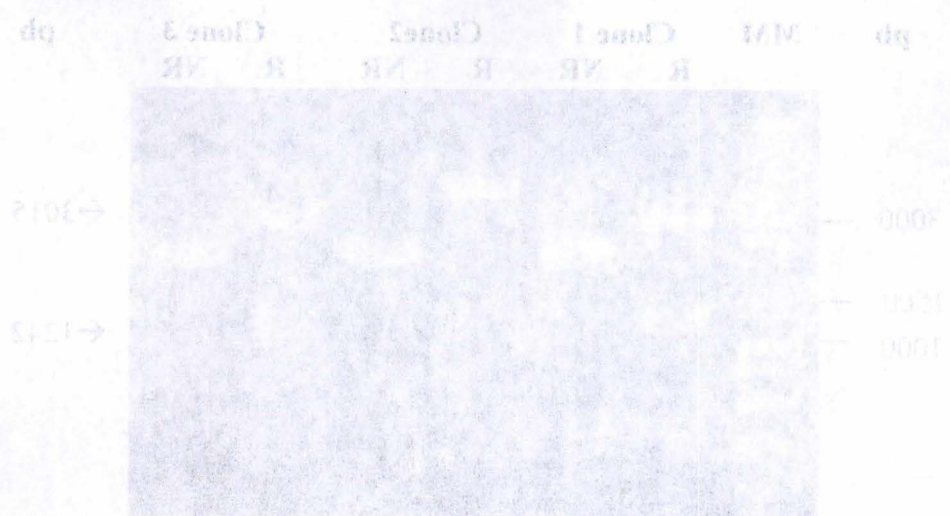


Figure 12 : Restriction digests of the pGEM-1 vector (1) and the pGEM-1 vector (2) and (3) by *Xba*I. Lane 1: pGEM-1 vector; Lane 2: pGEM-1 vector with the 1012 bp fragment; Lane 3: pGEM-1 vector with the 1242 bp fragment.

Les séquences de plasmide à l'échelle des mêmes mutons des pour le pGEM-1 (Fig. 13) à la suite des expériences est relative avec un clone qui possède ces mutations.

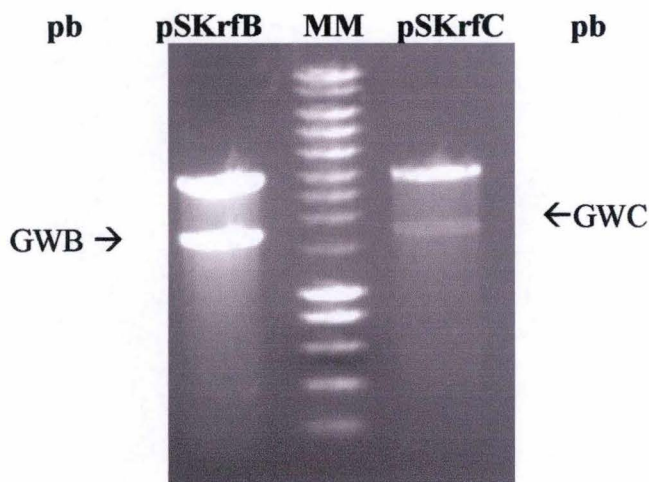
### 3.3. Fusion avec la cassette Gateway

Les plasmides pGEM-1 contenant les gènes *cat1* et *cat2* ont été transformés par *Yeast* afin d'y insérer la cassette Gateway (*GGV*) provenant du pSRTB (Fig. 14-15) dans le cas de *cat1* et *cat2* (Fig. 16-17) dans le cas de *cat3*. Cette cassette sert à la recombinaison de l'ADN par le système *Cre* en amont ou en aval d'OKF de la souche *Yeast*. La présence de la cassette est choisie pour contrôler la phase de lecture lors de la fusion. Le site de restriction *Sma*I a été introduit grâce aux amorces dessinées pour l'amplification par PCR de *cat1*.



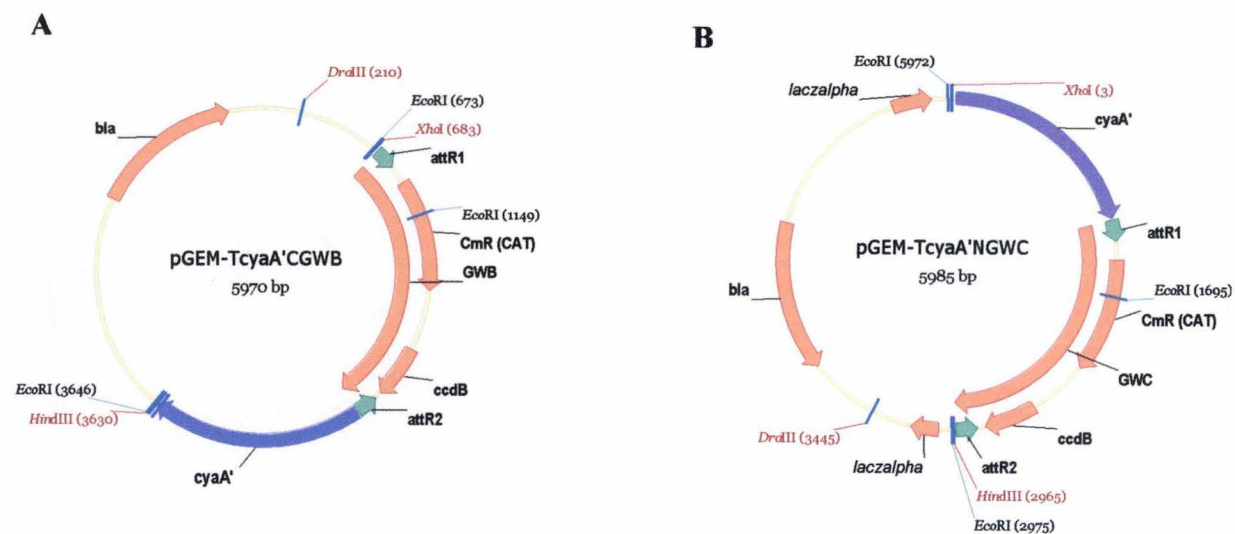
Figure 13 : A) Le plasmide pGEM-1; B) Le plasmide pGEM-1.

Les plasmides pSKrfB et pSKrfC sont restreints par *EcoRV* afin d'en extraire la cassette Gateway (Fig. 17). Les cassettes d'une taille de 1700 (GWC) et 1713 (GWB) pb sont purifiées à partir du gel d'agarose d'après le "DNA Extraction Kit" (Fermentas).



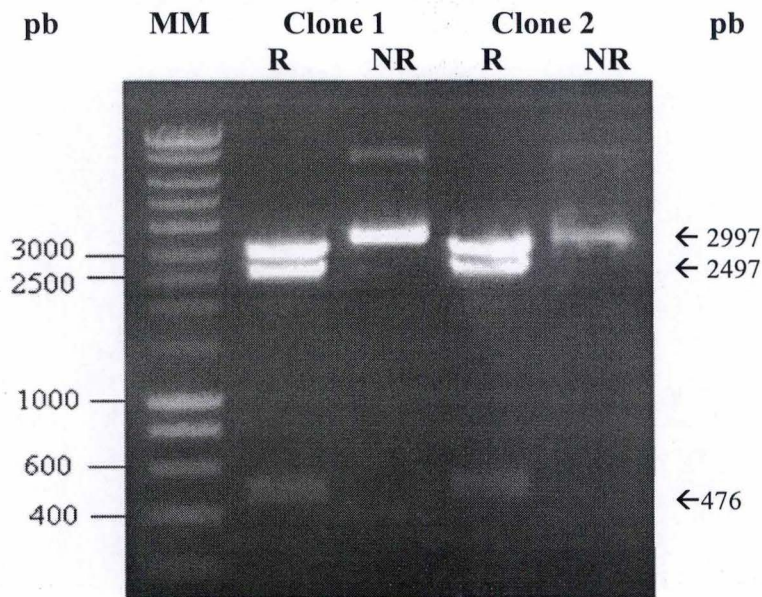
**Figure 17 :** Restriction de 2  $\mu$ l des pSKrfB et pSKrfC par *EcoRV*. Les bandes à 1700 et 1713 pb correspondent aux cassettes Gateway C et B respectivement. Taille des bandes en référence au marqueur de poids moléculaire (MM) SmartLadder (Eurogentec). pb : paires de bases.

Les cassettes GWB et GWC sont liguées respectivement au pGEM-*TcyaA*'C et au pGEM-*TcyaA*'N restreints par *SmaI* pour obtenir les pGEM-*TcyaA*'CGWB (Fig. 18-A) et pGEM-*TcyaA*'NGWC (Fig. 18-B). Les ligations sont transformées en *E. coli* DB3.1 et les cellules sont sélectionnées sur un milieu contenant du chloramphénicol. La souche DB3.1 utilisée est résistante au gène *ccdB* compris entre les sites *attR1* et *attR2* de la cassette Gateway. Les cellules qui contiennent le pGEM-*TcyaA*'CGWB ou le pGEM-*TcyaA*'NGWC se développent sur un milieu incluant du chloramphénicol car elles possèdent le gène de résistance contre cette antibiotique amené par la cassette Gateway. De plus, elles possèdent une résistance à la toxine CcdB qui résulte du gène *ccdB* contenu dans la cassette.



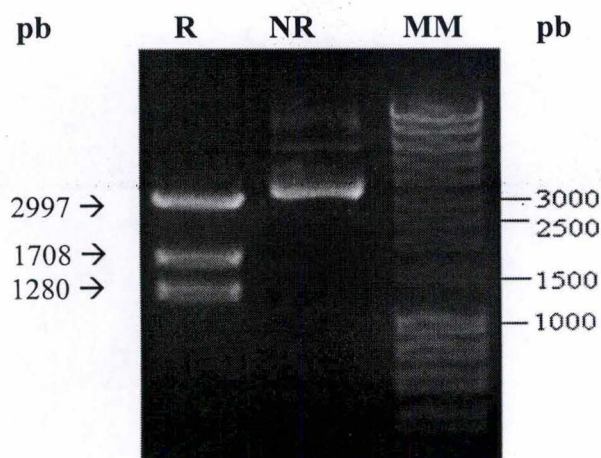
**Figure 18 :** A) Le plasmide pGEM-*TcyaA*'CGWB. B) Le plasmide pGEM-*TcyaA*'NGWC.

Dans le cas du pGEM-*TcyAA'CGWB* des clones sont mis en culture en milieu LB + chloramphénicol et une minipréparation d'ADN plasmidique est réalisée. Une restriction diagnostique par *EcoRI* est réalisée sur un échantillon des plasmides récoltés de même qu'un contrôle de non restriction sans l'enzyme. Après restriction, on attend des bandes d'une taille de 476, 2497 et 2997 pb. Les deux clones obtenus par minipréparation présentent un profil de restriction correct (Fig. 19).



**Figure 19 :** Restriction diagnostique de 1  $\mu$ l du pGEM-*TcyAA'CGWB* par *EcoRI*. MM : marqueur moléculaire. pb : paires de bases. R : restreint. NR : non restreint.

Des colonies sont également mises en culture LB + chloramphénicol pour le pGEM-*TcyAA'NGWC*. Une minipréparation d'ADN est réalisée et un échantillon de cette minipréparation est restreint par *EcoRI*. Un contrôle sans enzyme est réalisé en parallèle. Après restriction, on attend des bandes d'une taille de 1280, 1708 et 2997 pb. Le clone mis en culture présente le bon profil de restriction (Fig. 20).

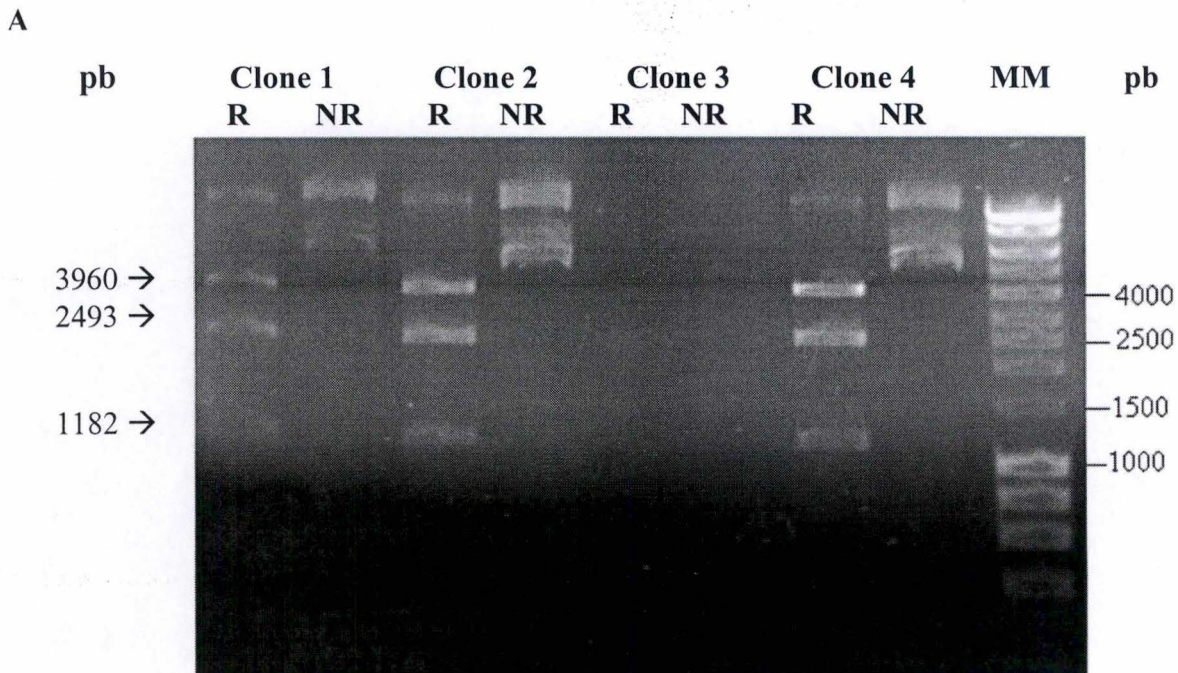


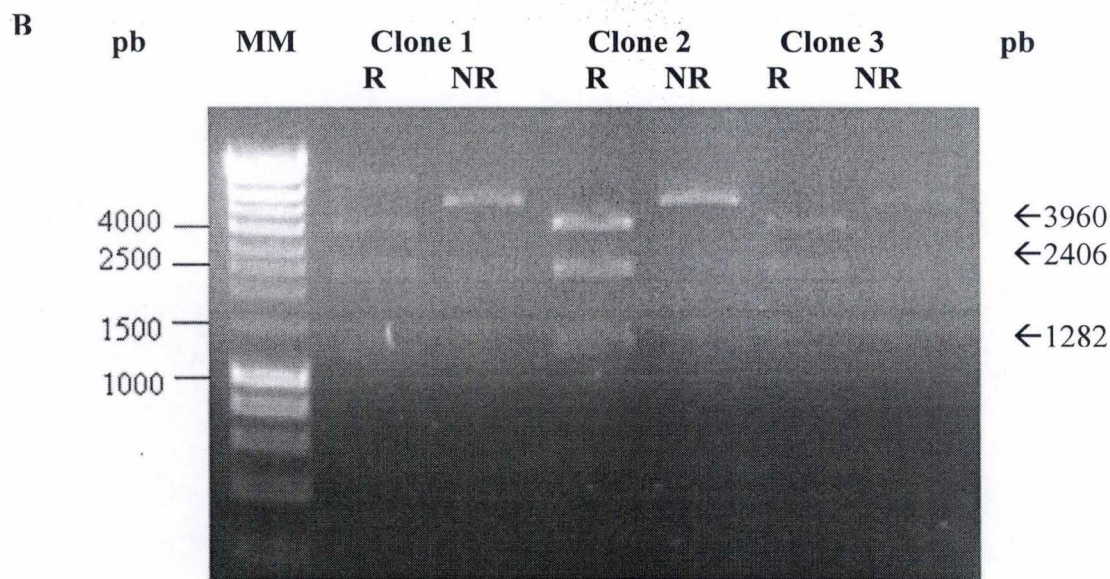
**Figure 20 :** Restriction diagnostique de 1  $\mu$ l du pGEM-*TcyAA'NGWC* par *EcoRI*. MM : marqueur moléculaire. pb : paires de bases. R restreint. NR : non restreint.

### 1.4. Clonage en pBBR1MCS

Après que le gène *cyaA* soit fusionné à une cassette Gateway le but est d'extraire cette fusion du pGEM-T et de l'introduire dans un plasmide de destination en l'occurrence le pBBR1MCS car il possède une origine de réplication fonctionnelle à la fois dans *E. coli* et dans *B. melitensis* 16M. L'origine de réplication est une séquence spécifique au niveau de laquelle la réplication de l'ADN est initiée et est donc nécessaire à la multiplication du plasmide. Pour cela, les pGEM-T*cyaA*'CGWB et pGEM-T*cyaA*'NGWC sont restreints en *Xho*I-*Hind*III-*Dra*III afin d'extraire respectivement les bandes de 2947 pb (*cyaA*'CGWB) et de 2962 pb (*cyaA*'NGWC). Les fragments d'ADN correspondant à ces bandes sont purifiés par extraction du gel d'agarose 1% à l'aide du "DNA Extraction Kit" (Fermentas) après migration du plasmide restreint. Le pBBR1MCS est également restreint en *Xho*I-*Hind*III. La restriction par ces enzymes engendre des bouts 5' protrudants qui permettent l'insertion orientée de fragments spécifiques ayant des bases complémentaires avec le site de coupure.

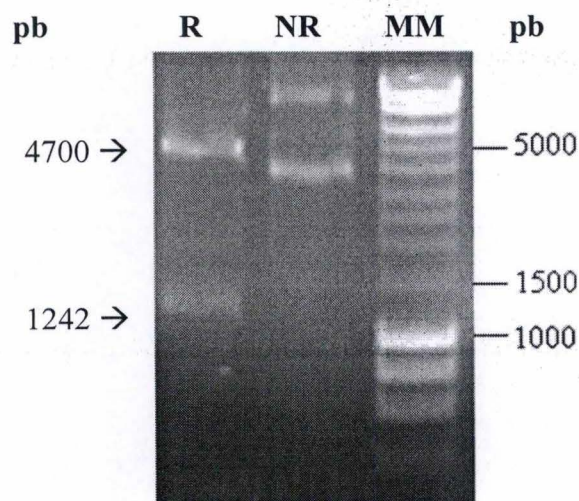
Une fois les fragments *cyaA*'CGWB et *cyaA*'NGWC purifiés, ceux-ci sont ligés avec le pBBR1MCS restreint et la ligation est transformée en DB3.1. Les cellules transformées sont sélectionnées sur un milieu contenant du chloramphénicol. Des clones sont mis en culture en milieu LB + chloramphénicol et une minipréparation d'ADN est réalisée sur ceux-ci. Les plasmides récoltés sont contrôlés via une restriction par *Eco*RI. Une restriction du pBBR1*cyaA*'CGWB par cette enzyme donne des fragments d'une taille de 1182, 2493 et 3960 pb. Les clones 1, 2 et 4 ont le profil attendu (Fig. 21-A). Le clone 3 quant à lui pourrait être un mutant spontané ayant acquis une résistance au chloramphénicol. La restriction du pBBR1*cyaA*'NGWC donne des fragments d'une taille de 1282, 2406 et 3960 pb. Le clone 2 présente le profil de restriction attendu (Fig. 21-B).





**Figure 21 :** A) Restriction diagnostique de 3  $\mu$ l du pBBR1*cyaa*'CGWB par *Eco*RI. B) Restriction diagnostique de 3  $\mu$ l du pBBR1*cyaa*'NGWC par *Eco*RI. MM : marqueur moléculaire. pb : paires de bases. R : restreint. NR : non restreint.

Le fragment *cyaa*'CTL est extrait du pGEM-T*cyaa*'CTL par *Xho*I-*Hind*III et inséré par ligation dans le pBBR1MCS également restreint en *Xho*I-*Hind*III pour donner le plasmide pBBR1*cyaa*'CTL. Des colonies issues de la transformation des plasmides sont mises en culture en milieu LB + chloramphénicol et le plasmide est extrait des cellules par minipréparation d'ADN. Une restriction diagnostique en *Xho*I-*Hind*III est réalisée pour vérifier que le bon plasmide a été extrait. Après restriction, le clone a le profil attendu c'est-à-dire des bandes d'une taille de 1242 et 4700 pb (Fig. 22).



**Figure 22 :** Restriction diagnostique de 1  $\mu$ l du pBBR1*cyaa*'CTL par *Xho*I-*Hind*III. MM : marqueur moléculaire. pb : paires de bases. R : restreint. NR : non restreint.

## 2. Réaction de recombinaison LR permettant les fusions *cyaA*'ORF

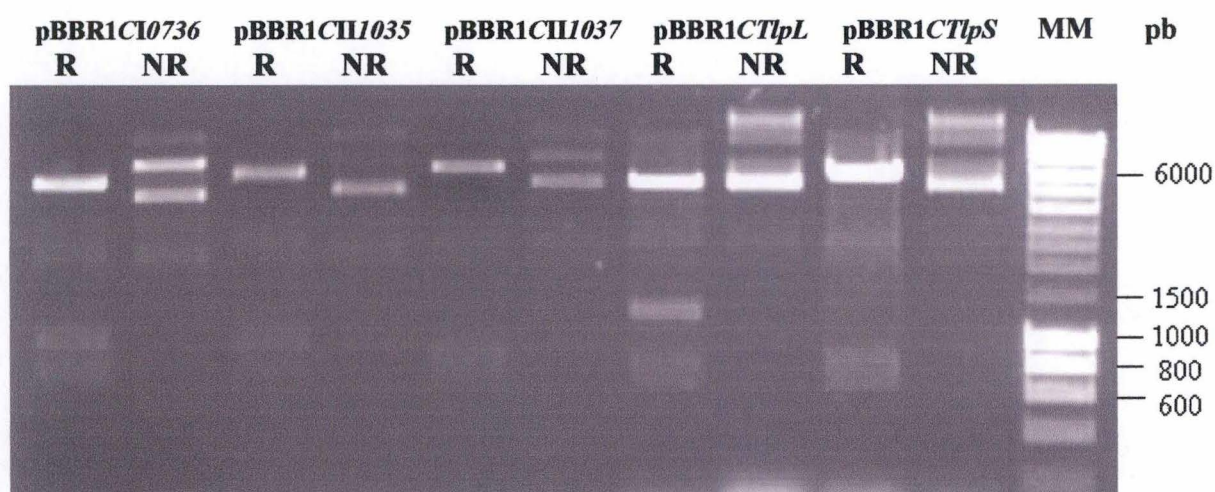
Une fois que les plasmides contenant la fusion du gène *cyaA*' avec une cassette Gateway ont été obtenus, le remplacement de cette cassette par l'ORF d'intérêt, bordée par les sites *attL1* et *attL2* dans un vecteur d'entrée, peut être réalisée. L'ORF d'intérêt est une ORF de *Brucella melitensis* 16M (Dricot et al., 2004). Une réaction LR permet d'obtenir des vecteurs d'expression portant le gène *cyaA*' fusionné en amont ou en aval d'une ORF de *B. melitensis* 16M (Fig. 3-A, 3-B), qui permettent l'expression de fusions traductionnelles en N- ou en C-terminal. Ces vecteurs d'expression sont sélectionnés par perte du gène *ccdB* et à l'aide du marqueur de résistance présent sur le plasmide. En effet, les plasmides sont transformés dans des cellules qui ne sont pas résistantes à la toxine CcdB et donc seules les bactéries ayant acquis le plasmide recombiné sont capables de croître.

Ces recombinaisons LR sont réalisées entre les plasmides pBBR1*cyaA*'CGWB et pBBR1*cyaA*'NGWC et les vecteurs d'entrée pENTR201-I0736, pENTR201-II1035, pENTR201-II1037, pENTR201-TlpL et pENTR201-TlpS. La protéine issue de l'ORF BMEI0736 est annotée comme une protéine de liaison à la ferripyocheline, ce qui est probablement une erreur d'annotation et interagit en double hybride avec la protéine humaine Rab2. La protéine codée par l'ORF BMEII035 possède un domaine N-terminal homologue aux phospholipases de la famille des patatines et n'a pas été identifiée en double hybride mais choisie pour ces expériences parce qu'un mutant a un phénotype atténué en souris. De plus, elle est en opéron avec la II1037 identifiée en double hybride et ayant un domaine annoté comme une zinc protéase. Cette protéine a plusieurs interactants dont Rab7, une GTPase de la famille des oncogènes Ras, impliquée dans la maturation des endosomes tardifs et des lysosomes selon le type cellulaire. Tlp désigne l'ORF BMEI1674 de *Brucella melitensis* 16M dont le produit est homologue au domaine eucaryote TIR (*Toll-IL-1 Receptor*) impliqué dans les voies de signalisation du système immunitaire inné. TlpS pour *TIR-like protein* code une protéine de 138 acides aminés dont 132 forment le domaine TIR qui est un domaine cytoplasmique associé aux TLR (*Toll-like receptor*) dans les cellules eucaryotes. TlpL fait référence à la version la plus longue de la protéine c'est-à-dire la protéine qui porte le domaine TIR C-terminal de 132 acides aminés et le domaine *coiled-coil* N-terminal. Ce dernier domaine est proposé comme un domaine utile à la sécrétion de la protéine Tlp (communication interne).

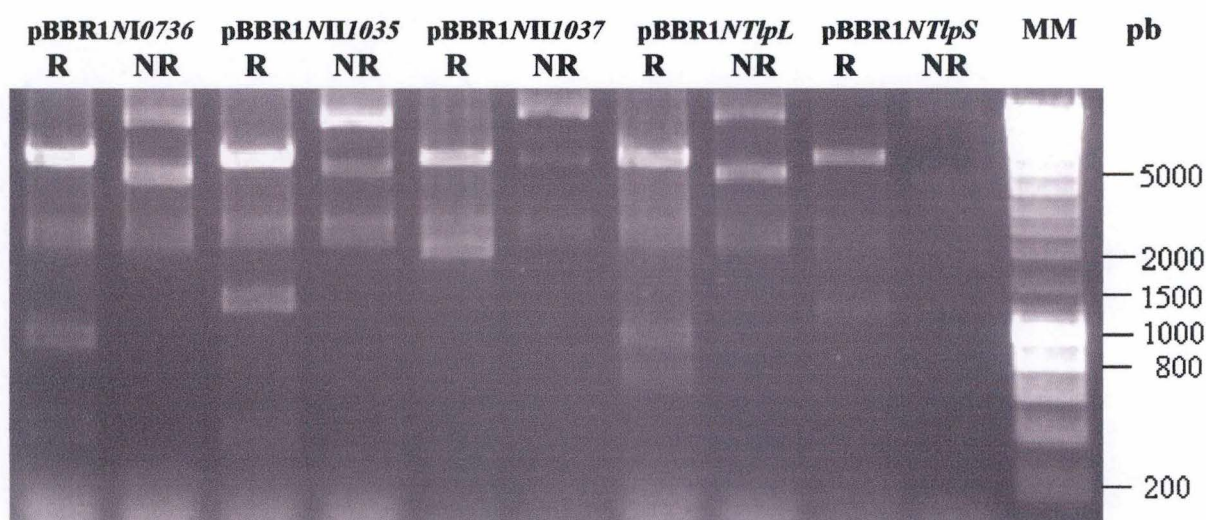
Au final, la recombinaison donne le plasmide pBBR1*cyaA*'CORF ou pBBR1*cyaA*'NORF. Les vecteurs d'expression sont contrôlés par une restriction en *EcoRV* pour les fusions N-terminales (Fig. 23) et C-terminales (Fig. 24). Le tableau 1 reprend la taille des bandes attendues après restriction par l'enzyme *EcoRV* :

	FUSION C-TERMINALE (PB)	FUSION N-TERMINALE (PB)
pBBR1 <i>cyaA</i> 'I0736	663 – 912 – 4930	364 - 891 - 5263
pBBR1 <i>cyaA</i> 'II1035	663 – 900 – 5296	352 -1257 - 5263
pBBR1 <i>cyaA</i> 'II1037	663 – 789 – 5977	241 - 1938 - 5263
pBBR1 <i>cyaA</i> 'TlpL	663 – 1195 – 4950	646 – 912 - 5263
pBBR1 <i>cyaA</i> 'TlpS	663 - 5726	1150 - 5263

Tableau 1 : Taille en paires de bases des fragments après restriction en *EcoRV* des plasmides pBBR1*cyaA*'CORF et pBBR1*cyaA*'NORF.



**Figure 23 :** Restriction diagnostique de 5  $\mu$ l des pBBR1cyxA'CORF par *EcoRV*. MM : marqueur moléculaire. pb : paires de bases. R : restreint. NR : non restreint.



**Figure 24 :** Restriction diagnostique de 3  $\mu$ l des pBBR1cyxA'NORF par *EcoRV*. MM : marqueur moléculaire. pb : paires de bases. R : restreint. NR : non restreint.

Les plasmides recombinés sont transformés en *E. coli* S17-1 CaCl<sub>2</sub>-compétentes et introduits ensuite par conjugaison chez les souches de *Brucella melitensis* 16M (16M) et *Brucella melitensis* 16M  $\Delta$ virB total ( $\Delta$ virBtot). Dans cette dernière souche, les douze gènes composant l'opéron *virB* sont délétés. Les bactéries *Brucella* qui ont acquis le plasmide recombiné sont sélectionnées sur un milieu contenant du chloramphénicol (Cm) et de l'acide nalidixique (Nal). Le plasmide pBBR1cyxA'CTL est également transformé en S17-1 et introduit par conjugaison chez la bactérie sauvage *B. melitensis* 16M et  $\Delta$ virBtot. Les *Brucella* exoconjugantes sont sélectionnées sur le même milieu (avec Cm et Nal).

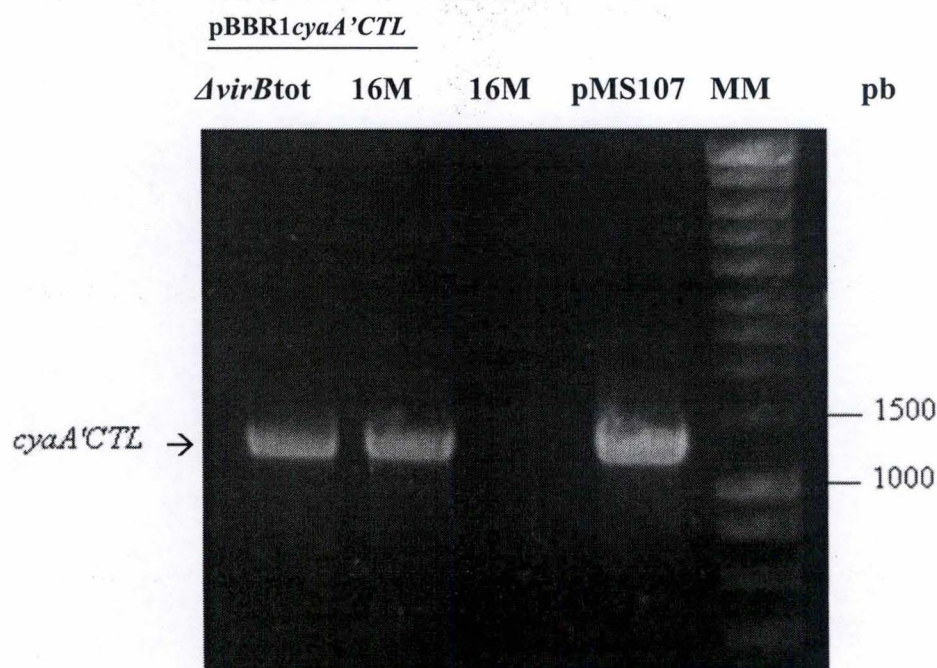
### 3. Tests de production des fusions

#### 3.1. Présence du plasmide de fusion

L'amplification par PCR d'un fragment de plasmide à partir d'une colonie permet de vérifier que les bactéries composant la colonie contiennent le plasmide d'intérêt. L'amplification est réalisée à l'aide d'amorces spécifiques d'une séquence portée par le plasmide.

- Détection du pBBR1*cyaA'*CTL

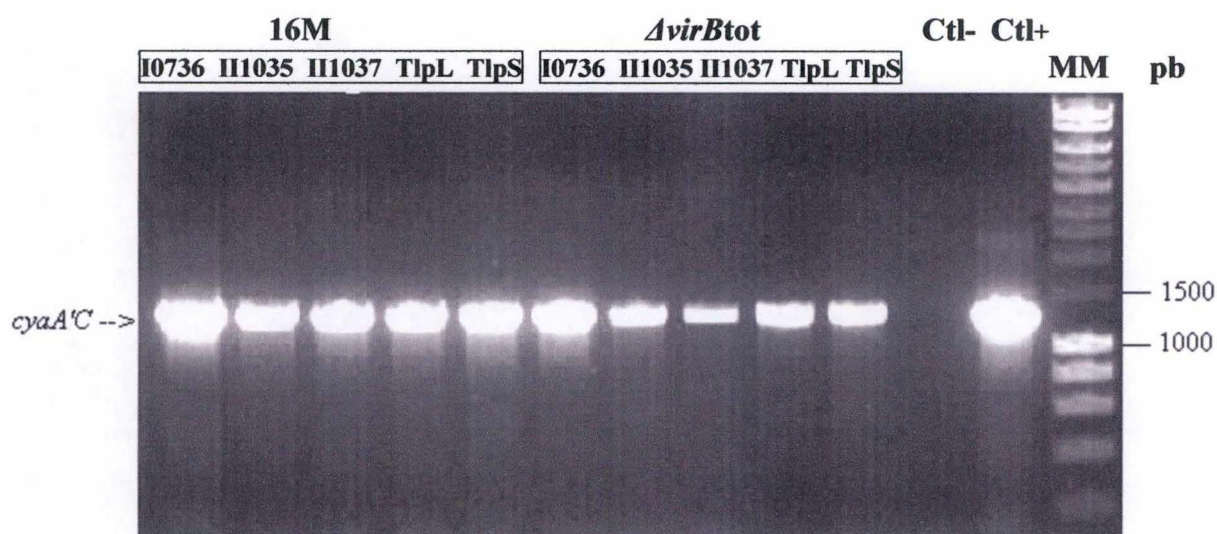
Une PCR à partir d'une colonie est effectuée à l'aide de la Taq polymérase et d'amorces spécifiques pour *cyaA'* afin de vérifier que les bactéries contiennent le plasmide pBBR1*cyaA'*CTL. L'amplification est réalisée à l'aide des amorces *cyaA'*N sens et *cyaA'*C antisens sur une colonie de la souche sauvage et une colonie de la souche  $\Delta virBtot$ . Les souches analysées contiennent bien le pBBR1*cyaA'*CTL étant donné qu'après amplification une bande est observée aux environs de 1200 pb similaire à celle issue de la PCR sur le pMS107 considéré comme contrôle positif (Fig. 25). Une souche sauvage sans plasmide est utilisée comme contrôle négatif.



**Figure 25 :** Détection du fragment *cyaA'*CTL par amplification PCR dans les souches 16M et  $\Delta virBtot$  contenant le plasmide pBBR1*cyaA'*CTL. 10  $\mu$ l de la PCR sont déposés sur gel d'agarose 1%. MM : marqueur moléculaire. pb : paires de bases.

- Détection des pBBR1 *cyxA*'CORF

Pour vérifier que les colonies sélectionnées contiennent le plasmide d'intérêt, une amplification par PCR est réalisée sur ces colonies. Par conjugaison, les plasmides pBBR1 *cyxA*'CI0736, pBBR1 *cyxA*'CII1035, pBBR1 *cyxA*'CIII1037, pBBR1 *cyxA*'CTIpL et pBBR1 *cyxA*'CTIpS ont été transférés dans les souches sauvage et *AvirBtot*. Une amplification est réalisée avec la Taq polymérase et à l'aide des amorces spécifiques pour la séquence du gène *cyxA*' pour déterminer si les bactéries possèdent ou non cette séquence. On constate que toutes les PCR sont positives, sauf dans le cas du contrôle négatif (Fig. 26). Notons toutefois, que cette PCR ne renseigne pas sur le fait que les colonies bactériennes possèdent le plasmide d'intérêt. Dans cette manipulation, le contrôle positif (Ctl+) est une PCR réalisée à partir d'une souche sauvage contenant le plasmide pBBR1 *cyxA*'CTL. Une PCR à partir de la souche sauvage qui n'a pas reçu de plasmide a servi de contrôle négatif (Ctl-).

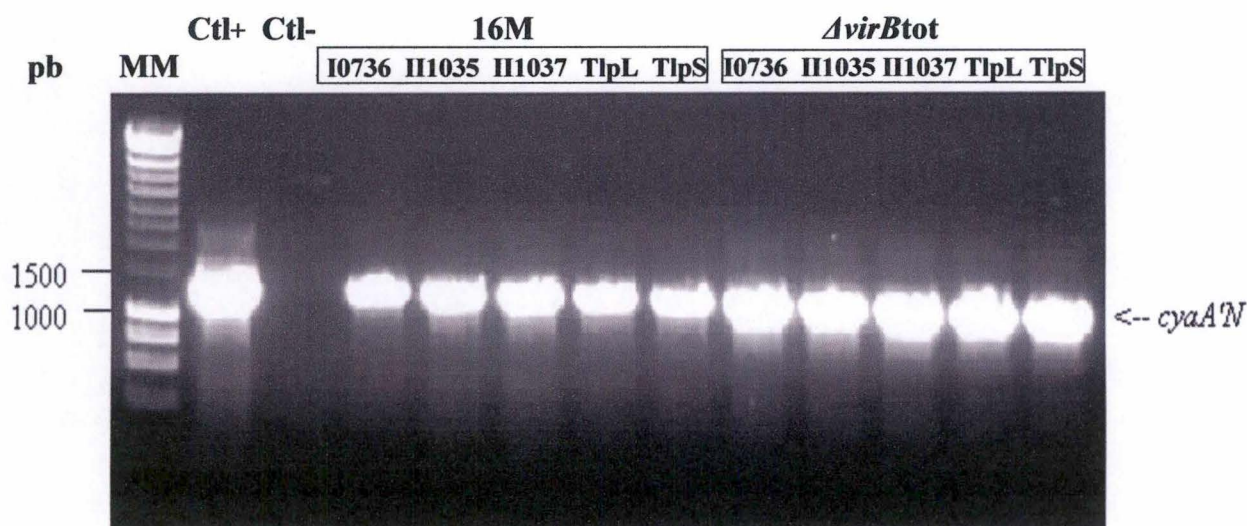


**Figure 26** : Détection du fragment *cyxA*'C par amplification PCR dans les souches 16M et *AvirBtot* contenant le plasmide pBBR1 *cyxA*'CORF. 10 µl de l'amplification par PCR sont déposés sur gel d'agarose 1%. MM : marqueur moléculaire. pb : paires de bases.

- Détection des pBBR1 *cyxA*'NORF

La présence des plasmides pBBR1 *cyxA*'NI0736, pBBR1 *cyxA*'NII1035, pBBR1 *cyxA*'NIII1037, pBBR1 *cyxA*'NTIpL et pBBR1 *cyxA*'NTIpS dans les souches 16M et *AvirBtot* a également été vérifié par PCR. L'amplification est réalisée avec la Taq polymérase et à l'aide des amorces *cyxA*'N sens et *cyxA*'C antisens pour amplifier la séquence *cyxA*'. De même que pour les fusions ORF*cyxA*'C, l'amplification à l'aide de ces amorces ne renseigne pas sur la présence des fusions *cyxA*'NORF mais seulement sur la présence de *cyxA*'. Les résultats de la figure 27 suggèrent donc que les souches 16M et *AvirBtot* possèdent les plasmides d'intérêt puisque l'amplification de *cyxA*' est positive pour chaque plasmide. De plus, les bandes ont une taille d'environ 1200 pb similaire à l'amplification du

pBBR1*cyaA'*CTL considéré comme contrôle positif (Ctl+). Une souche de la 16M sans plasmide est utilisée comme contrôle négatif (Ctl -).

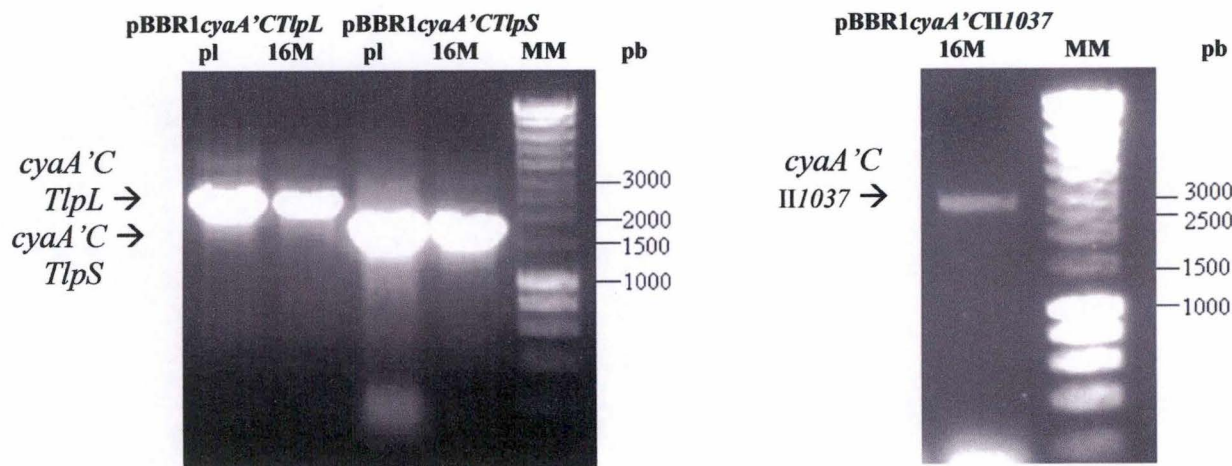


**Figure 27** : Détection du fragment *cyaA'*N par amplification PCR dans les souches 16M et  $\Delta virBtot$  contenant le plasmide pBBR1*cyaA'*NORF. 10  $\mu$ l de l'amplification PCR sont déposés sur gel d'agarose 1%. MM : marqueur moléculaire. pb : paires de bases.

Des PCR à partir d'une colonie dans le but d'amplifier la fusion entière ont été réalisées sur la souche 16M contenant les fusions ORF*cyaA'*. Une première PCR est effectuée sur les fusions *cyaA'*CI0736 et *cyaA'*CII1037 avec l'amorce *cyaA'*C antisens pour amplifier la partie C-terminale de la protéine de fusion et une amorce sens qui s'hybride dans la séquence des ORF citées. Après amplification, seul le pBBR1*cyaA'*CII1037 dans la souche a donné un produit PCR positif (Fig. 28-droite). Les plasmides pBBR1*cyaA'*CI0736 et pBBR1*cyaA'*CII1037 purifiés (par préparation d'ADN) ont été amplifiés en guise de contrôle positif des fusions mais l'amplification est négative. Une seconde PCR avec les amorces *cyaA'*C antisens et *attB1* sens a été effectuée sur la souche 16M contenant les 5 fusions réalisées. L'amorce *attB1* sens s'hybride sur le site de recombinaison *attB1* de la cassette Gateway entourant les ORFs. Ces amplifications PCR n'ont fonctionné que pour les pBBR1*cyaA'*CTlpL et pBBR1*cyaA'*CTlpS en 16M. Les plasmides purifiés ont également été amplifiés comme contrôle positif et seuls les pBBR1*cyaA'*CTlpL et pBBR1*cyaA'*CTlpS ont donné un résultat positif (Fig. 28-gauche). L'amplification des autres plasmides est négative et cela peut être dû à la longueur parfois excessive de certaines fusions et à la nature de la séquence à amplifier.

Tailles des fragments attendus :

- *cyaA'*CI0736 : 1809 pb
- *cyaA'*CII1035 : 2163 pb
- *cyaA'*CII1037 : 2733 pb
- *cyaA'*CTlpL : 2111 pb
- *cyaA'*CTlpS : 1699 pb



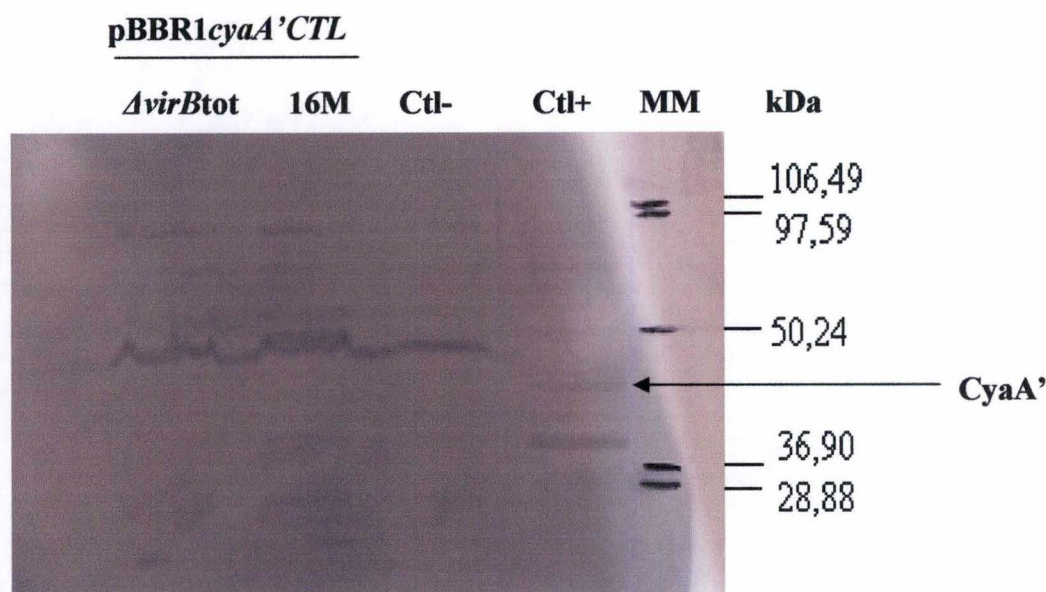
**Figure 28 :** Gauche : Amplicons *cyxA'CTlpL* et *cyxA'CTlpS*. pl : plasmide purifié. 16M : plasmide dans la souche 16M. Droite : Amplicon *cyxA'CII1037*. 16M : plasmide dans la souche 16M. 10 µl des PCR déposés sur gel d'agarose 1%. MM : marqueur moléculaire. pb : paires de bases.

### 3.2. Détection des protéines de fusion

Une fois que les plasmides d'intérêt ont été identifiés par amplification PCR dans les souches 16M et *ΔvirBtot*, un western blot est effectué pour déterminer si les fusions traductionnelles réalisées sont produites. Les souches contenant les deux types de fusion sont mises en culture dans du milieu liquide 2YT et concentrées ensuite à la DO<sub>600</sub> voulue dans du PBS (Phosphate Buffered Saline).

- Production de la protéine CyaA'CTL

Les souches 16M et *ΔvirBtot* contenant le plasmide pBBR1*cyxA'CTL* ont été cultivées et concentrées dans du PBS pour obtenir une DO<sub>600</sub> de 10. Un western blot est réalisée sur ces souches avec un anticorps polyclonal de chèvre anti-CyaA', Cya A (bN-13) (Santa Cruz Biotechnology). Cet anticorps est dilué 200 fois et l'anticorps secondaire (anticorps de lapin anti-chèvre) lié à la peroxydase est dilué 5000 fois. Une souche 16M sans plasmide est utilisée comme contrôle négatif de la présence de CyaA' (Ctl-) et une culture de *E.coli* contenant le plasmide est utilisée comme contrôle positif (Ctl+). Cette souche a été cultivée en milieu LB + chloramphénicol et induite à l'aide d'IPTG 1 mM pendant 16 heures. Ensuite les bactéries ont été concentrées dans du PBS à une DO<sub>600</sub> de 10. Les résultats du western blot ne confirment pas la production de CyaA' d'une taille théorique de 43,5 kDa dans les souches étudiées. Cependant, le contrôle positif dévoile un profil dont une des bandes pourrait correspondre à CyaA' (Fig. 29). On remarque à l'aide de ce contrôle positif et des autres échantillons, qu'il y a une quantité non négligeable de bandes non spécifiques



**Figure 29 :** Western blot avec un anticorps anti-CyaA' sur les souches 16M et *AvirBtot* contenant le pBBR1cyaA'CTL. Ctl- = 16M sans plasmide. Ctl+ = *E.coli* contenant le pBBR1cyaA'CTL. Taille théorique de CyaA' : 43,5 kDa. MM : marqueur moléculaire. kDa : kilodaltons. Gel 12%. Révélation ECL.

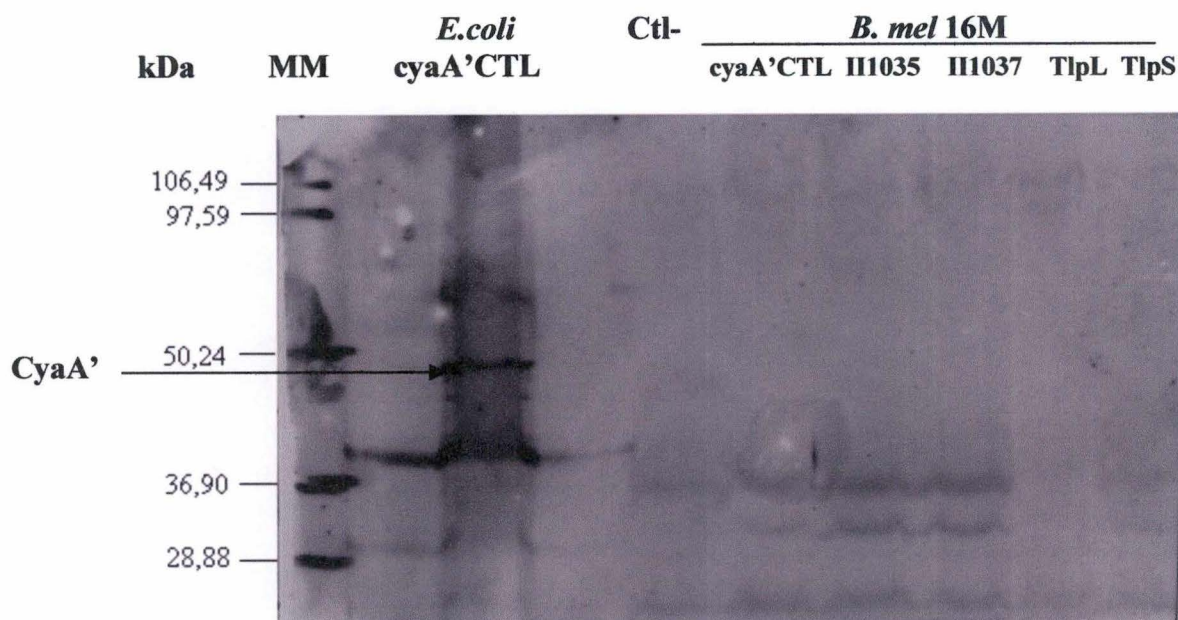
Un autre western blot en concentrant les échantillons pour obtenir une DO de 50 a été réalisée et de même que pour le précédent, la protéine CyaA' n'est pas clairement détectée et une série de bandes non spécifiques sont toujours observées.

- Production des protéines ORFCyaA'C

Un western blot pour détecter les protéines de fusions ORFCyaA'C a été réalisé avec des échantillons cultivés en milieu 2YT + chloramphénicol et concentrés à une DO<sub>600</sub> de 100 dans du PBS. L'anticorps primaire Cya A (bN-13) est dilué 200 fois et l'anticorps secondaire (anticorps de lapin anti-chèvre) couplé à la peroxydase est dilué 5000 fois. La figure 30 donne le western blot réalisé avec la souche 16M contenant soit le plasmide pBBR1cyaA'CII1035, pBBR1cyaA'CII1037, pBBR1cyaA'CTlpL, pBBR1cyaA'CTlpS ou pBBR1cyaA'CTL. Une souche 16M sans plasmide est utilisée comme contrôle négatif (Ctl-) et une souche d'*E. coli* contenant le pBBR1cyaA'CTL comme contrôle positif (Ctl+). Cette souche a été cultivée en milieu LB + chloramphénicol et induite à l'IPTG 1 mM pendant 16 heures. Ensuite les bactéries ont été concentrées dans du PBS à une DO<sub>600</sub> de 10. Ces résultats ne permettent pas de déterminer si la protéine CyaA' se trouve dans les souches de *Brucella* par contre, dans la souche d'*E. coli* on observe une bande entre 50,24 et 36,90 kDa (Fig. 30) qui semble correspondre à CyaA' puisque celle-ci a une taille théorique de 43,5 kDa. Tout comme dans les western blots réalisés sur pBBR1cyaA'CTL une série de bandes se trouvent dans le bas du gel.

Poids moléculaires théoriques attendus pour les fusions :

- II1035CyaA'C : 55 kDa
- II1037CyaA'C : 95 kDa
- TlpLCyaA'C : 73,6 kDa
- TlpSCyaA'C : 59 kDa



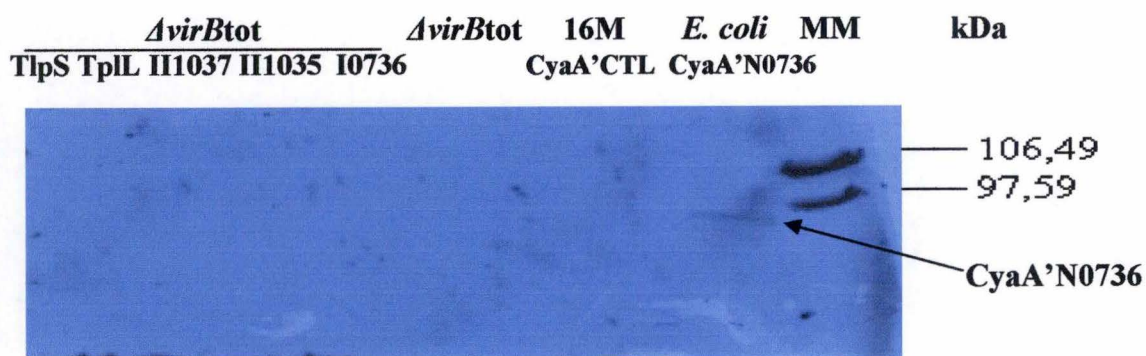
**Figure 30 :** Western blot avec un anticorps anti-CyaA' sur la souche 16M contenant les plasmides pBBR1cyaA'III1035, pBBR1cyaA'III1037, pBBR1cyaA'CTlpL ou pBBR1cyaA'CTlpS. Ctl- = 16M sans plasmide. *E. coli* contenant le pBBR1cyaA'CTL correspond au contrôle positif (Ctl+). Taille théorique de CyaA' : 43,5 kDa. MM : marqueur moléculaire. kDa : kilodaltons. Gel 12%. Révélation ECL.

- Production des protéines CyaA'NORF

Un western blot pour détecter les fusions CyaA'NORF dans la souche *AvirBtot* a été réalisée avec des échantillons concentrés à une DO<sub>600</sub> de 10 dans du PBS. Ceux-ci ont été préalablement cultivés en milieu 2YT + chloramphénicol et induit à l'IPTG 1 mM pendant 16 heures. La figure 31 donne le western blot réalisé avec l'anticorps primaire Cya A (bN-13) dilué 200 fois et un anticorps secondaire dilué 5000 fois sur les 5 ORFs sélectionnées et conjuguées en *AvirBtot*. Ce western blot est un autre moyen de vérifier la production des fusions réalisées. Une souche *AvirBtot* sans plasmide est utilisée comme contrôle négatif et une souche 16M contenant le plasmide pBBR1cyaA'CTL est utilisée comme contrôle positif de la présence de CyaA'. Une souche S17-1 contenant le plasmide pBBR1cyaA'NI0736 sert de référence à la présence d'un plasmide de fusion. Les résultats du western blot ne démontrent pas la présence de CyaA' ni des protéines de fusion dans la souche étant donné qu'aucune bande n'est observée. Cependant, dans la souche S17-1 contenant le plasmide, la fusion CyaA'NI0736 d'une taille théorique de 65 kDa est détectée.

Poids moléculaires théoriques attendus pour les fusions :

- CyaA' : 43,5 kDa
- CyaA'NI0736 : 65 kDa
- CyaA'NII1035 : 55 kDa
- CyaA'NII1037 : 95 kDa
- CyaA'NTlpL : 73,6 kDa
- CyaA'NTlpS : 59 kDa



**Figure 31 :** Western blot avec un anticorps anti-CyaA' sur la souche *ΔvirBtot* contenant les plasmides pBBR1cyaA'N0736, pBBR1cyaA'NII1035, pBBR1cyaA'NII1037, pBBR1cyaA'NTlpL, pBBR1cyaA'NTlpS. *ΔvirBtot* = *ΔvirBtot* sans plasmide. 16M CyaA'CTL correspond à la souche 16M contenant le plasmide pBBR1cyaA'CTL. *E. coli* CyaA'N0736 correspond à la souche S17-1 contenant le pBBR1cyaA'N0736. MM : marqueur moléculaire. kDa : kilodaltons. Gel 10%. Révélation ECL.

D'autres western blots ont été réalisés en modifiant la dilution de l'anticorps primaire ou en soniquant les échantillons afin de les rendre moins visqueux et faciliter leur migration à travers les mailles du gel, mais cela ne donne pas de meilleurs résultats. La concentration du gel de séparation a également été modifiée à 10% au lieu de 12% pour permettre aux grosses protéines de mieux migrer mais les résultats ne sont pas plus probants.

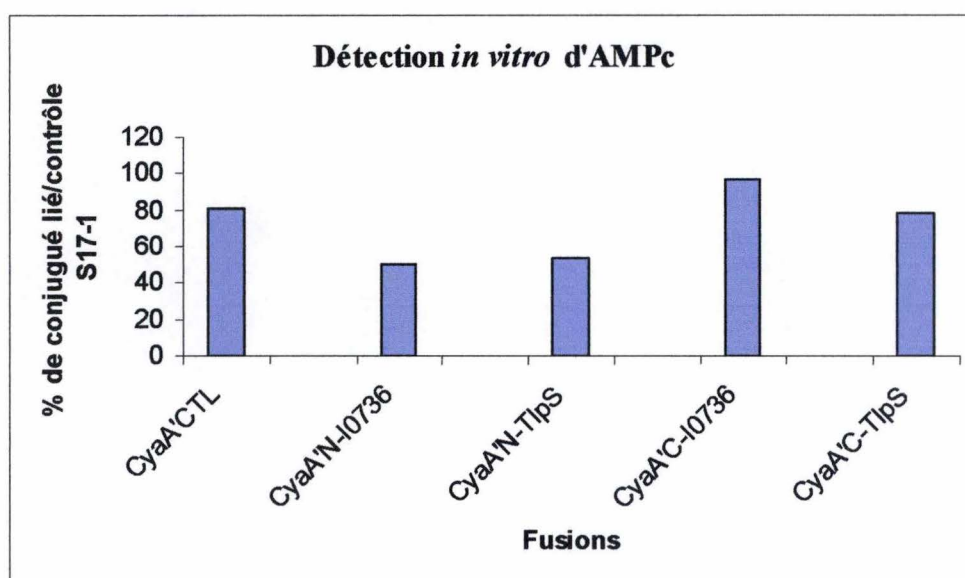
#### 4. Production *in vitro* d'AMP cyclique

Outre la production des protéines de fusion, il est nécessaire de vérifier la capacité de CyaA' à produire de l'AMPc lorsqu'elle est fusionnée aux ORFs. C'est pourquoi, une production *in vitro* d'AMPc a été réalisée à l'aide de cultures d'*E. coli* S17-1 sans plasmide ou contenant soit le plasmide pBBR1cyaA'CTL soit les fusions *cyaA'N/CI0736* ou *cyaA'N/CTlpS*. Le kit "cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay System" a ensuite permis de détecter l'AMPc produit. Le principe de celui-ci repose sur une compétition entre l'AMPc conjugué à une peroxydase et l'AMPc libre produit par les échantillons. La coloration du milieu, mesurée par la DO<sub>630</sub> est fonction de la quantité de peroxydase conjuguée à l'AMPc (Peroxydase-AMPc) qui s'est liée à un anticorps spécifique dirigé contre l'AMPc (anticorps de lapin anti-AMPc). Plus la DO est élevée plus il y a de peroxydase conjuguée liée, ce qui signifie qu'il y a moins d'AMPc libre dans les échantillons testés. Le protocole utilisé est celui décrit par Sory (Sory and Cornelis, 1994). Les bactéries ont été cultivées toute une nuit en présence d'IPTG 1mM permettant la surexpression des protéines de fusion puis concentrées à une DO<sub>600</sub> de 2 dans du tampon A (Tableau 2). Les bactéries sont ensuite soniquées quatre fois 20 secondes et centrifugées pour récupérer 100 μl du surnageant auxquels de l'ATP 2 mM, de la calmoduline bovine 0,1 μM et du tampon B (Tableau 2) sont additionnés. Le tout est incubé 5 minutes à 30°C.

TAMPON A	TAMPON B
20 mM Tris-HCl (pH 8)	50 mM Tris-HCl (pH 8)
10 mM MgCl <sub>2</sub>	6 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,12 mM CaCl <sub>2</sub>
	100 µg/ml BSA

Tableau 2 : Composition des tampons A et B.

Les échantillons sont ensuite dilués dans de l'éthanol (concentration finale 65%) et le tout est centrifugé. Le culot est séché et repris dans 200 µl d'Assay buffer. Les échantillons sont ensuite testés pour l'AMPc. Le graphique de la figure 32 représente le pourcentage du taux de conjugué Peroxydase-AMPc lié à l'anticorps dans les différentes souches testées par rapport à celui d'une souche contrôle ne contenant pas le gène *cyaA'* (S17-1). D'une façon générale, le taux d'AMPc produit *in vitro* est plus élevé lorsqu'il s'agit d'une fusion du rapporteur en N-terminal.



**Figure 32 :** Production *in vitro* d'AMPc chez différentes souches S17-1 portant l'une des fusions CyaA'N/CORF. Les fusions utilisées sont indiquées sous le graphique. Les valeurs représentent le pourcentage (%) du taux de conjugué peroxydase-AMPc lié dans les différentes souches par rapport à la souche S17-1 ne portant pas de fusion.

Les taux d'AMPc observés montrent que le kit utilisé est fonctionnel et que CyaA' fusionné aux protéines est également fonctionnel puisque différents taux ont été observés. Il serait toutefois avantageux d'utiliser une fusion de CyaA' avec une protéine dont on sait qu'elle est produite et fonctionnelle en *E. coli*. Les taux d'AMPc montrent que moins d'ATP a été converti en AMPc par les protéines recombinantes issues des souches portant les fusions ORFCyaA'C (CyaA'C-I0736 et CyaA'C-TlpS). Il est possible que les protéines issues des fusions CyaA'NORF (CyaA'N-I0736 et CyaA'N-TlpS) soient plus facilement produites ou moins dégradées que les fusions ORFCyaA'C. Il est aussi possible, que les fusions ORFCyaA'C soient moins fonctionnelles. La fusion CyaA'CTL (*cyaA'* non fusionné à une ORF) a quant à elle produit une quantité d'AMPc similaire aux fusions ORFCyaA'C et inférieure aux fusions CyaA'NORF.

## *Conclusions et perspectives*

Les pathogènes intracellulaires échappent au système immunitaire notamment en détournant la voie classique d'endocytose dans les cellules qu'elles envahissent. Les bactéries capables de ce détournement empêchent le phagosome qui les contient de fusionner avec le lysosome, organite impliqué dans la dégradation de nombreux pathogènes dans les cellules eucaryotes. Certaines bactéries comme celles des genres *Legionella* et *Salmonella* sont connues pour inhiber cette fusion phagolysosomiale à l'aide d'effecteurs transloqués dans le cytoplasme de la cellule infectée. Chez *S. enterica*, SpiC, est sécrété par le système de type III et inhibe la fusion du phagosome avec le lysosome (Uchiya et al., 1999). En ce qui concerne *L. pneumophila* plusieurs effecteurs dont la sécrétion dépend du système de sécrétion de type IV ont également été identifiés. Il s'agit entre autres des protéines VipA, VipD, VipF qui inhibent le trafic des protéines lysosomales (Shohdy et al., 2005). *Brucella* spp. est également capable d'éviter la fusion de sa vacuole avec le lysosome cependant les acteurs impliqués dans ce mécanisme n'ont pas encore été identifiés à ce jour. Signalons toutefois que le LPS de *B. abortus* est à lui seul capable de considérablement retarder la maturation d'endosomes précoces en endosomes tardifs puis en lysosomes, ce qui suggère que des effecteurs non protéiques peuvent participer à cette fonction.

Dans le but de mettre en évidence des effecteurs sécrétés par *Brucella* spp. impliqués dans la modulation du trafic intracellulaire, des protéines de fusion à partir d'ORFs de *B. melitensis* 16M ont été réalisées au cours de ce mémoire. La construction de ces fusions traductionnelles a reposé sur l'utilisation du domaine adénylate cyclase d'une des toxines de *Bordetella pertussis*, CyaA', qui convertit l'ATP en AMPc en présence de calmoduline eucaryote (Botsford and Harman, 1992). Notre stratégie consistait à fusionner cette étiquette avec l'effecteur putatif afin de réaliser par la suite des tests d'infection pour évaluer le taux d'AMPc intracellulaire dans les cellules infectées. Le fait que l'activité de CyaA' soit dépendante de la calmoduline, absente chez les bactéries, permet de corrélérer l'augmentation d'AMPc à la sécrétion d'une protéine de fusion.

Cinq ORFs de *B. melitensis* 16M ont été sélectionnées pour être fusionnées avec *cyaA'*: BMEI0736, BMEII1035, BMEII1037, TlpL et TlpS. Celles-ci ont été choisies en fonction de leur interaction avec des protéines phagosomales humaines lors d'un crible double hybride ou de leur participation à la virulence de la bactérie. La construction des vecteurs permettant la production des protéines de fusion a également fait appel au système de recombinaison Gateway. Les sites *att* sont choisis de sorte qu'ils respectent la phase de lecture des séquences étudiées une fois la recombinaison effectuée.

Deux types de vecteurs ont été réalisés permettant par la suite des fusions traductionnelles en C-terminal (ORFCyaA'C) ou en N-terminal (CyaA'NORF), de même qu'un vecteur contenant *cyaA'* sans fusion. Il est à noter que le plasmide pMS107 utilisé comme matrice pour amplifier le fragment *cyaA'* comporte une série de mutations par rapport à la séquence publiée et de ce fait, les protéines de fusion portent également ces mutations. Celles-ci sont situées en fin de protéine et à des loci en dehors du site catalytique et de liaison de la calmoduline, ce qui laisse penser que les mutations n'influencent probablement pas l'activité de CyaA'. Mais le doute subsiste à ce niveau. En ce qui concerne la fusion de l'étiquette en C-terminal des protéines, un clone sans mutation a été obtenu. Une fois ces vecteurs construits, ils ont été recombinés avec les plasmides portant les ORFs de *B. melitensis* sélectionnées et introduits chez *B. melitensis* 16M et *ΔvirBtot* pour étudier leur sécrétion.

Pour s'assurer que les souches *B. melitensis* 16M et *B. melitensis* 16M *ΔvirBtot* contenaient les plasmides d'intérêt, une amplification *cyaA* par PCR a été réalisée tout d'abord à l'aide des amorces spécifiques pour la séquence *cyaA'* et ensuite à l'aide d'amorces pour détecter la fusion *cyaA'* ORF. Les résultats de l'amplification avec les amorces pour *cyaA'* ont permis de confirmer la présence de cette séquence dans les souches citées ci-dessus. Cette

présence sous-entend celles des fusions entières c'est-à-dire *cyaA*'N/CORF mais ne le prouve pas. C'est pourquoi une PCR visant à détecter la fusion des ORFs avec l'étiquette a été réalisée. L'amplification par PCR a démontré la présence des fusions II1037, TlpL et TlpS avec *cyaA*'. La présence des fusions *cyaA*'CI0736 et *cyaA*'CII1035 n'a pu être confirmée. Toutefois, cela ne signifie pas que les bactéries ne contiennent pas ces fusions étant donné que la présence de *cyaA*' a été démontrée et que l'amplification d'une fusion plus longue, en l'occurrence *cyaA*'CII1037, s'est révélée positive. Le fait que leur présence n'ait pas pu être établie peut provenir des conditions de la PCR mais aussi des amorces utilisées. Il serait préférable de concevoir un couple d'amorces qui s'hybride à la fois sur l'ORF et sur la séquence de *cyaA*' et qui génère des fragments plus petits que ceux déjà obtenus, plus aisément amplifiables. La présence des différentes fusions pourrait aussi être confirmée en réalisant une minipréparation d'ADN plasmidique. Il reste à réaliser des PCR pour détecter le reste des fusions dans les deux souches de *Brucella* utilisées.

Après s'être assuré de la présence des plasmides recombinants dans les souches 16M et *ΔvirBtot*, des western blots ont été effectués pour tester la production des différentes protéines de fusion. Les résultats obtenus ne permettent pas de confirmer la présence de ces protéines dans les souches de *B. melitensis*, cependant, une bande qui correspond vraisemblablement à la fusion CyaA'CI0736 a été observée dans des extraits d'*E. coli* S17-1 contenant la fusion *cyaA*'NI0736 (Fig. 30-résultats). Une série de bandes non spécifiques sont également visualisées sur ces blots. Le fait que CyaA' ne soit pas détectée de manière spécifique voire pas détectée du tout pourrait être dû aux échantillons (par exemple une protéolyse), à leur préparation ou à la sensibilité de la détection. En effet, CyaA' pourrait être dégradée dans les cellules qui la produisent, ce qui expliquerait les bandes observées en bas de certains western blots (p. ex. Fig. 29-résultats). En vue d'améliorer les western blot pour détecter CyaA', il a été envisagé de diminuer la concentration des échantillons et de les lyser par sonication pour permettre une meilleure migration. Un western blot en concentrant les échantillons à une DO<sub>600</sub> de 10 et en les soniquant a été réalisé mais seul CyaA' dans la souche *E. coli* a été détecté. La dilution des anticorps primaire et secondaire peut également être revue. Et l'anticorps secondaire seul devrait être testé pour déterminer le bruit de fond qui pourrait lui être associé. D'autres anticorps primaires et secondaires pourraient être testés, ainsi que leur condition d'utilisation, par exemple des anticorps primaires dirigés contre les produits des ORFs sélectionnées.

Une autre approche pour tester la production et l'activité de CyaA' dans les fusions a été utilisée. Il s'agit de tester la production *in vitro* d'AMPc par CyaA'. La production d'AMPc à l'aide d'extraits d'*E. coli* S17-1 portant les fusions CyaA'N/CI0736, CyaA'N/CTlpS et CyaA' seul ont mis en évidence la présence de ces fusions par augmentation d'AMPc par rapport à une souche sans plasmide. De plus, dans le cas des fusions N-terminales (CyaA'NORF), plus d'AMPc est détecté, ce qui signifie que ces protéines convertissent plus d'ATP en AMPc. De façon étonnante, la production d'AMPc à partir d'un extrait d'*E. coli* contenant la protéine CyaA' non fusionnée à une ORF est une des plus faible et équivaut donc à une faible conversion d'ATP par la protéine ou à une faible production. La question de l'utilisation de CyaA'CTL comme contrôle supposé négatif de sécrétion se pose : étant donné que les tests montrent une faible détection d'AMPc, dans le cas où CyaA'CTL serait sécrété, sa sécrétion pourrait ne pas être perçue par rapport au bruit de fond. Il faudrait envisager un autre contrôle positif de sécrétion. Une fusion de CyaA' avec une protéine de *B. melitensis* 16M que l'on sait non sécrétée est également envisagée comme contrôle négatif. Il reste à confirmer les données recueillies ici avec une fusion reconnue comme active en (1) *E. coli* et (2) dans les souches de *B. melitensis* 16M qui portent les fusions ORFCyaA'C ou CyaA'NORF.

Etant donné que certaines fusions sont fonctionnelles au regard de l'activité de CyaA' et que le fonctionnement du kit "Enzymeimmuno Assay System" a été vérifié par détection *in vitro* d'AMPc, une détection d'AMPc *in vivo* lors d'une infection pourrait être réalisée. Le principe de cette détection repose sur l'infection de cellules eucaryotes phagocytaires (telles que des macrophages) et non phagocytaires (par exemple des cellules HeLa), par des souches *B. melitensis* 16M et *B. melitensis* 16M  $\Delta$ virBtot ayant reçu les fusions *cyaA*'N/CORF. Après un certain temps d'infection, la quantité intracellulaire d'AMPc dans les cellules eucaryotes est évaluée. Une augmentation d'AMPc dans une cellule infectée est un élément en faveur d'une sécrétion des protéines de fusion. L'implication du système de sécrétion de type IV, VirB, dans cette translocation sera vérifiée à l'aide de la souche  $\Delta$ virBtot. Parallèlement à la souche 16M, si aucune augmentation d'AMPc dans la cellule n'est détectée cela signifie que les produits des ORFs fusionnées n'ont pu être sécrétés par ce système de sécrétion. Par contre, si une augmentation d'AMPc est observée il est probable que l'ORF code une protéine sécrétée de façon indépendante du système de sécrétion VirB.

Le rapporteur CyaA' est constitué de 400 résidus et il est possible que dans la protéine de fusion celui-ci provoque un encombrement stérique conduisant à une conformation ne permettant pas la sécrétion. De plus, l'activité du rapporteur dans la cellule peut être gênée et il serait donc avantageux d'utiliser des rapporteurs détectables directement à l'aide d'anticorps primaire et secondaire dans la cellule eucaryote. Cela est réalisable avec un anticorps contre CyaA', cependant, il serait préférable de choisir des rapporteurs de petite taille pour limiter les possibilités de perturber la translocation à travers les systèmes de sécrétion. Parmi ceux-ci, le Flag est un rapporteur de 8 acides aminés aisément détecté à l'aide d'anticorps. D'autres rapporteurs que ceux détectés par anticorps peuvent être utilisés notamment le peptide *Lumio* (ou rapporteur tétracystéine) qui réagit avec le FIAsh, un réactif fluorescent une fois lié au peptide *Lumio*. Ces deux étiquettes sont en cours de test.

Un test de fonctionnalité des protéines de fusion pourrait aussi être réalisé. Il consiste à comparer trois groupes de bactéries : des bactéries sauvages, des bactéries mutantes pour une ORF "x" et des bactéries mutantes pour cette ORF "x" et complétée par une fusion X-étiquette. S'il y a complémentation, la bactérie mutante portant la fusion présentera un phénotype similaire à celui de la souche sauvage. Cela signifiera que la fusion ORF-étiquette est fonctionnelle concernant la production et la fonction de l'ORF. Dans ce cas, l'utilisation de la fusion pourra permettre de mieux comprendre le rôle et la fonction dans le trafic de l'ORF considérée en regardant par exemple sa localisation.

Enfin, une fois que les produits des cinq ORFs sélectionnées auront été déterminées comme des protéines sécrétées ou non, les douze autres protéines identifiées lors du crible double hybride en levure pourront être testées concernant leur sécrétion. A l'aide du système développé, la mise en évidence d'autres effecteurs sécrétés au niveau intracellulaire peut être envisagée avec une optique à grande échelle. En effet, les caractéristiques des constructions réalisées permettent une fusion rapide d'ORFs contenue dans l'ORFéome de *Brucella melitensis* 16M avec l'étiquette et une détermination de la sécrétion *in vitro* est réalisable pour plusieurs ORFs au cours d'une même expérience grâce au test enzymatique.

## *Matériel et méthodes*

# 1. Plasmides et souches bactériennes

## 1.1. Souches bactériennes

SOUCHES BACTERIENNES	GENOTYPES ET CARACTERISTIQUES	REFERENCE
<i>E. coli</i>		
DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ( <i>mrrhsdRMSmcrBC</i> )φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74recA1endA1araD139</i> Δ( <i>ara,leu</i> )7697 <i>galIU galK</i> λ- <i>rpsL nupG</i> /pMON14272/ pMON7124	Invitrogen
DB3.1	F- <i>gyrA462 endA1 glnV44</i> Δ( <i>sr1-recA</i> ) <i>mcrB mrhsdS20</i> (rB-, mB-) <i>ara14 galK2 lacY1rproA2 rpsL20</i> (Smr) <i>xyl5</i> Δ <i>leu mtl1</i> , souche <i>lacZ</i> positive	Invitrogen
TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15Δ <i>lacX74recA1 araD139</i> Δ( <i>araleu</i> )7697 <i>galIU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
S17-1	<i>recA pro hsdR RP4-2-Tc: :Mu-Km::Tn7</i> , souche donneuse pour la conjugaison, <i>lacZ</i> positive	Simon, 1983
<i>B. melitensis</i>		
16M biovar 1	Souche retrouvée sur le terrain en 1955 et rendue résistance à l'acide nalidixique aux FUNDP.	MacMillan A. Weybridge, U.K.
16M Δ <i>virB</i> total	Souche de <i>B. melitensis</i> 16M dont l'appareil de sécrétion de type IV, <i>VirB</i> , est entièrement délété.	Nijskens C. thèse en cours (URBM)

## 1.2. Plasmides

PLASMIDES	CARACTERISTIQUES	REFERENCE
pMS107	pIC20H contenant le gène <i>cyaA</i> , des nucléotides 4 à 1216 ( <i>cyaA'</i> )	Sory and Cornelis, 1994
pGEM-T Easy	Vecteur de clonage restreint en <i>EcoRV</i> et possédant une thymidine aux extrémités 3', Amp <sup>R</sup>	Promega
pGEM-T <i>cyaA'</i> C	pGEM-T Easy portant le gène <i>cyaA'</i> , Amp <sup>R</sup> , origine du phage filamenteux fl	Ce travail
pGEM-T <i>cyaA'</i> N	pGEM-T Easy portant le gène <i>cyaA'</i> , Amp <sup>R</sup>	Ce travail
pGEM-T <i>cyaA'</i> CTL	pGEM-T Easy portant le gène <i>cyaA'</i> , Amp <sup>R</sup>	Ce travail
pSKrfB	pBluescript SK portant la reading frame (rf) cassette B (rfB), Cm <sup>R</sup>	Communication interne

pSKrfC	pBluescript SK portant la reading frame (rf) cassette C1 (rfC), Cm <sup>R</sup>	Communication interne
pGEM-T $cyaA'$ CGWB	pGEM-T Easy portant le gène $cyaA'$ fusionné à une cassette Gateway, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Ce travail
pGEM-T $cyaA'$ NGWC	pGEM-T Easy portant le gène $cyaA'$ fusionné à une cassette Gateway, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Ce travail
pBBR1MCS	Plasmide de 4,7 kb contenant 16 sites de clonages uniques dans le gène $lacZ\alpha$ , Cm <sup>R</sup> , ORI dans <i>E. coli</i> et dans <i>B. melitensis</i> 16M	Kovach et al., 1994
pBBR1 $cyaA'$ CGWB	pBBR1MCS portant la fusion entre le gène $cyaA'$ et la cassette GWB, Cm <sup>R</sup>	Ce travail
pBBR1 $cyaA'$ NGWC	pBBR1MCS portant la fusion entre le gène $cyaA'$ et la cassette GWC.1, Cm <sup>R</sup>	Ce travail
pBBR1 $cyaA'$ CTL	pBBR1MCS portant le gène $cyaA'$ , Cm <sup>R</sup>	Ce travail
pENTR201-I0736	pDONR201 dans lequel a été inséré par réaction Gateway l'ORF I0736 de <i>B. melitensis</i>	Dricot et al., 2004
pENTR201-II1035	pDONR201 dans lequel a été inséré par réaction Gateway l'ORF II1035 de <i>B. melitensis</i>	Dricot et al., 2004
pENTR201-II1037	pDONR201 dans lequel a été inséré par réaction Gateway l'ORF II1037 de <i>B. melitensis</i>	Dricot et al., 2004
pENTR201-TlpL	pDONR201 dans lequel a été inséré par réaction Gateway l'ORF TlpL de <i>B. melitensis</i>	Dricot et al., 2004
pENTR201-TlpS	pDONR201 dans lequel a été inséré par réaction Gateway l'ORF TlpS de <i>B. melitensis</i>	Dricot et al., 2004
pBBR1 $cyaA'$ CORF	pBBR1MCS portant la fusion $cyaA'$ CORF, Cm <sup>R</sup>	Ce travail
pBBR1 $cyaA'$ NORF	pBBR1MCS portant la fusion $cyaA'$ NORF, Cm <sup>R</sup>	Ce travail

ORF fait référence à l'une des ORFs suivantes de *B. melitensis* 16M : BMEI0736, BMEII1035, BMEII1037, TlpL ou TlpS.

### 1.3. Culture bactérienne

#### 1.3.1. Types de milieu

- **Milieu Luria Bertani (LB)**

Peptone (hydrolysate de caséine)	10 g/l
Extrait de levure	5 g/l
NaCl	5 g/l
Agar (pour milieu solide)	12 g/l

Ces milieux sont autoclavés 20 minutes à 120°C.

- **Milieu 2YT**

Mix LB Gibco	20 g/l
Extrait de levure	5 g/l

Peptone	6 g/l
Agar (pour milieu solide)	12 g/l

Ces milieux sont autoclavés 20 minutes à 120°C.

- **Antibiotiques et composés additionnels**

	<i>E. COLI</i>	<i>B. MELITENSIS</i> 16M
Ampicilline	100 µg/ml	-
Chloramphénicol	20 µg/ml	20 µg/ml
Acide nalidixique	-	25 µg/ml
IPTG	0,2 mM (solide)	-
X-gal	40 µg/ml	-

Concentrations finales d'utilisation pour *E. coli* et *B. melitensis* 16M. Les solutions stocks sont concentrées 1000x et conservées à -20°C. Les composés sont dilués dans de l'eau stérile puis filtrés sur un filtre 0,22 µm, sauf pour le chloramphénicol (dilué dans de l'éthanol absolu), le X-Gal (dilué dans du diméthylformamide) et l'acide nalidixique (dilué dans NaOH 0,2 M).

### 1.3.2. *Escherichia coli*

*E. coli* est cultivée en aérobiose à 37°C avec du milieu LB accompagné ou non d'un antibiotique de sélection. La culture liquide se déroule sous agitation (250 rpm).

### 1.3.3. *Brucella melitensis* 16M

Les manipulations à l'aide de cette souche bactérienne se réalisent dans un laboratoire de niveau de biosécurité 3 (BL3). Si les expériences nécessitent de travailler dans un BL2, les bactéries doivent être incubées 1 heure dans un bain à + 80°C. *B. melitensis* 16M de même que *B. melitensis* 16M  $\Delta virBtotal$  sont cultivées en aérobiose à 37°C et avec un milieu 2YT accompagné ou non d'un antibiotique de sélection. La culture liquide se déroule sous agitation (200 rpm).

## 2. Techniques utilisées

### 2.1. Polymerase chain reaction

L'amplification d'ADN par PCR (polymerase chain reaction) est une méthode qui permet d'amplifier de façon exponentielle une séquence spécifique d'ADN ou amplicon. La technique est basée sur une répétition de cycles comprenant une dénaturation, une hybridation et une élongation des brins d'ADN complémentaires à l'aide d'une ADN polymérase et d'oligonucléotides spécifiques de la séquence à amplifier. La réaction s'effectue dans un appareil automatique (un Mini cycler de MJ Research par exemple) où les échantillons subissent une première dénaturation de 10 minutes à 95°C avant de commencer un

programme de 30 cycles. La température de dénaturation est de 95°C durant 30 secondes. La température et le temps d'hybridation sont fonction de la composition et de la longueur des amorces. La température d'hybridation correspond à  $T_m - 5^\circ\text{C}$ . dans un premier essai, on calcule le  $T_m$  de la façon suivante :  $T_m = 4^\circ\text{C} (\text{G+C}) + 2^\circ\text{C} (\text{A+T})$ . La température d'élongation est de 72°C et le temps d'élongation dépend de la longueur des fragments (on compte 1 minute par kb à amplifier). L'amplification s'achève par une élongation de 10 minutes à 72°C pour terminer l'élongation des fragments qui seraient inachevés. L'amplification d'ADN par PCR peut se réaliser soit à partir d'un échantillon purifié d'ADN soit à partir d'une colonie.

Mix PCR :	- Amorces sens	0,3 $\mu\text{M}$
	- Amorces antisens	0,3 $\mu\text{M}$
	- dNTP mix	250 $\mu\text{M}$
	- Polymérase	5 U/ $\mu\text{l}$ Taq (Promega)
		3,5 U/ $\mu\text{l}$ Expand High Fidelity (Roche)
	- Tampon de la polymérase	1x
	- Matrice	1-10 ng
	- Eau désionisée	qsp 50 $\mu\text{l}$

## 2.2. Extraction d'ADN plasmidique à partir d'un gel d'agarose

L'extraction d'ADN plasmidique à l'aide du "DNA extraction kit" de Fermentas est utilisé pour purifier des fragments d'ADN à partir d'un gel d'agarose, concentrer de l'ADN, retirer des protéines, nucléotides non incorporés, amorces ou enzymes de restriction.

Protocole :

- Exciser du gel d'agarose la bande contenant l'ADN à extraire et déterminer le volume de gel en fonction du poids (1g équivaut approximativement à 1 ml).
- Ajouter 3 volumes de Binding solution à 1 volume de gel et incubé 5 minutes à 55 °C pour dissoudre l'agarose.
- Ajouter la suspension de poudre de silice. Au-delà de 2,5  $\mu\text{g}$  d'ADN ajouter 5  $\mu\text{l}$  de poudre de silice et en dessous ajouter 2  $\mu\text{l}$ . Incuber 5 minutes à 55 °C.
- Centrifuger le complexe ADN/poudre de silice 5 secondes pour former un culot.
- Retirer le surnageant et rincer le culot avec 500  $\mu\text{l}$  de tampon de rinçage glacé. Vortexer et centrifuger 5 secondes. Retirer le surnageant et répéter l'opération trois fois.
- Resuspendre le culot dans 15  $\mu\text{l}$  d'eau désionisée stérile et incubé 5 minutes à 55°C. Centrifuger et récupérer le surnageant dans un nouveau tube. Répéter une fois l'opération.

## 2.3. Purification de fragments PCR

Après amplification, s'il n'y a pas de bande parasite en gel d'agarose, les fragments PCR peuvent être purifiés à l'aide du kit "PCR Clean-Up System" (Promega). Cette purification permet d'éliminer de l'ADN amplifié les amorces, les dNTP, la polymérase et les autres impuretés.

Protocole :

- Ajouter un volume égal de membrane Binding Solution à la réaction PCR.

- Transférer les produits PCR préparés dans une Minicolonne SV placée dans un tube collecteur. Incuber 1 minute à température ambiante.
- Centrifuger 1 minute à 16000 g. Eliminer le liquide dans le tube collecteur et réinsérer la Minicolonne.
- Ajouter 700 µl de Membrane Wash Solution et centrifuger 1 minute à 16000 g. Eliminer le liquide dans le tube collecteur et réinsérer la Minicolonne.
- Répéter l'opération avec 400 µl de Membrane Wash Solution. Centrifuger 5 minutes à 16000 g.
- Eliminer le liquide dans le tube collecteur et centrifuger 1 minute pour évaporer les résidus d'éthanol.
- Transférer la Minicolonne dans un tube de 1,5 ml.
- Ajouter 50 µl de Nuclease-Free Water dans la Minicolonne et incuber 1 minute à température ambiante. Centrifuger 1 minute à 16000 g.
- Conserver l'ADN à -20°C.

## 2.4. Clonage d'un gène à partir d'une banque génomique

Le principe du clonage est d'insérer un fragment d'ADN dans un vecteur capable de se répliquer dans les bactéries. L'insertion d'un fragment (insert) dans un plasmide (vecteur) se fait soit par ligation soit par recombinaison dans le cas d'un clonage Gateway. Dans le cas d'une ligation, le vecteur est préalablement linéarisé à l'aide d'enzymes de restriction et les liaisons phosphodiester entre le vecteur et l'insert à cloner sont créées par une enzyme particulière, la ligase. Dans le cas d'une réaction Gateway, une clonase réalise la recombinaison entre deux plasmides. Ensuite, le mélange de ligation ou la réaction Gateway sont mis en présence de bactéries de façon à ce que le vecteur avec éventuellement l'insert pénètre dans les bactéries et s'y multiplie : c'est la transformation bactérienne. Il existe deux types de transformation : la transformation naturelle ou la transformation artificielle. La transformation artificielle est appliquée dans ces expériences et est précédée du traitement chimique des parois bactériennes de façon à rendre les cellules compétentes à la transformation. Le produit final est sélectionné par pression de sélection à l'aide d'antibiotique.

### 2.4.1. Ligation

	LIGATION AVEC PGEM-T EASY	LIGATION COMMUNE	
		Bouts francs	Bouts protrudents
Tampon de ligation	1x	1x	1x
Vecteur	50 ng	3-30 fmol	15-60 fmol
Insert	150 ng	9-90 fmol	45-180 fmol
T4 DNA ligase	3 U/µl	0,1 U	1 U
Eau désionisée	qsp 10 µl	qsp 10 µl	qsp 10 µl

Protocoles de ligation avec le pGEM-T Easy ou ligation commune. Réaliser le mélange repris dans le tableau avec un rapport de 1 vecteur pour 3 inserts et incuber le tout 1 heure à température ambiante ou toute la nuit à 16°C.

### 2.4.2. Transformation bactérienne

- CaCl<sub>2</sub> : ajouter 50 µl de cellules CaCl<sub>2</sub> compétentes (dégelées sur glace) à 2 µl de ligation. Incuber 30 minutes sur glace. Incuber 30 secondes à 42°C puis laisser 2 minutes sur glace. Ajouter 1ml de LB et incuber 1 heure à 37°C avec agitation. Ensuite étaler sur le milieu sélectif adéquat et incuber à température et durée variable suivant la souche bactérienne utilisée.
- Electroporation : ajouter à 50 µl de cellules électrocompétentes (dégelées sur glace) 1 à 4 µl de ligation. Incuber 20 minutes sur glace. Electroporer à 25 µF, 2,2 kV, 200Ω dans une cuvette stérile et ajouter immédiatement après 1 ml de LB. Incuber 1 heure à 37°C avec agitation et étaler ensuite sur le milieu sélectif adéquat et incuber à température et durée variable suivant la souche bactérienne utilisée.

### 2.4.3. Sélection et test blanc/bleu

Après la ligation, des vecteurs peuvent ne pas posséder d'insert et après transformation, des bactéries peuvent ne pas avoir intégré de vecteurs. Il faut donc sélectionner les bactéries qui possèdent le vecteur d'intérêt. Cette étape de sélection se réalise grâce au système de sélection (antibiotique, toxine) apporté par le vecteur et/ou l'insert. Cela permet de distinguer les bactéries qui ont reçu le vecteur de celles qui ne l'ont pas reçu et qui sont naturellement sensibles à l'antibiotique ou à la toxine.

Par ailleurs, le site d'insertion de l'insert peut être situé dans la séquence du gène *lacZα*. L'insertion d'un insert rompt ce gène et rend la β-galactosidase non fonctionnelle. La distinction entre les vecteurs ayant intégré l'insert et ceux qui se sont reliés sur eux-mêmes à l'aide de la ligase se fait en testant le fonctionnement de cette enzyme. Ceci est réalisé en additionnant au milieu de culture de l'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) et du 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside (X-gal). L'IPTG est un inducteur de la synthèse de la β-galactosidase et le X-gal est un substrat chromogène qui hydrolysé par la β-galactosidase donne un produit coloré. Dans le cas où le gène est interrompu par l'insertion d'un fragment d'ADN, la β-galactosidase n'est pas exprimée, le X-gal n'est pas clivé en 5-bromo-3-chloro-indoxyl et les colonies bactériennes sont blanches. Dans le cas contraire, les colonies sont bleues indigos.

## 2.5. Minipréparation d'ADN plasmidique

Cette technique permet d'extraire de l'ADN plasmidique à partir d'une culture liquide de bactéries. La minipréparation correspond à un volume de culture de maximum 5ml. Après culture sur une nuit, les cellules sont isolées du milieu de culture par centrifugation et resuspendues dans une solution tampon. Ensuite, la paroi des cellules est lysée et les protéines sont précipitées et éliminées. Du reste, l'ADN plasmidique est précipité pour être récupéré. L'extraction d'ADN peut se faire classiquement ou à l'aide d'un kit.

Protocole classique :

- Ensemencer une colonie bactérienne dans 5 ml de milieu milieu (+ antibiotique) et incuber toute une nuit à 37°C et sous agitation.
- Transférer 1,5 ml de culture dans un eppendorf et centrifuger 3 minutes à 11000 g. Eliminer le surnageant.

- Resuspendre le culot dans 100  $\mu$ l de GTE (2,5 ml de Tris 1M, 2 ml d'EDTA 0,5M, 0,901 g de glucose 50mM, eau désionisée qsp 100 ml, pH 8 et autoclaver).
- Ajouter 200  $\mu$ l de dénaturant (0,1 ml de NaOH 10N, 0,5 ml de SDS 10%, 4,4 ml d'eau désionisée). Laisser 2 à 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 150  $\mu$ l d'acétate de potassium 3M. Incuber 5 minutes sur glace.
- Centrifuger 5 minutes à 11000 g et récupérer le surnagent.
- Ajouter 1 ml d'isopropanol, vortexer et incuber 10 minutes sur glace. Centrifuger 10 minutes à 11000 g et éliminer le surnagent.
- Ajouter ml d'éthanol 70% sans resuspendre le culot et centrifuger 5 minutes à 11000 g. Eliminer le mieux possible le surnagent. Laisser sécher et resuspendre le culot dans 20  $\mu$ l d'eau désionisée.

Protocole d'après le kit "Macherey Nagel" :

- Prélever 1,5 ml de culture dans un eppendorf et centrifuger 30 secondes à 11000 g.
- Eliminer le surnagent et resuspendre le culot dans 250  $\mu$ l de tampon A1.
- Ajouter 250  $\mu$ l de tampon A2 et mélanger par 6 à 8 retournements.
- Ajouter 300  $\mu$ l de tampon A3 et centrifuger 5 à 10 minutes à 11000 g.
- Charger le surnagent sur une colonne et ajouter 600  $\mu$ l de tampon A4. Centrifuger 1 minute à 11000 g. Eliminer le liquide du tube collecteur et centrifuger 2 minutes à 11000 g.
- Eluer l'ADN dans un nouveau tube en ajoutant 50  $\mu$ l d'eau désionisée et centrifuger 1 minute à 11000 g.

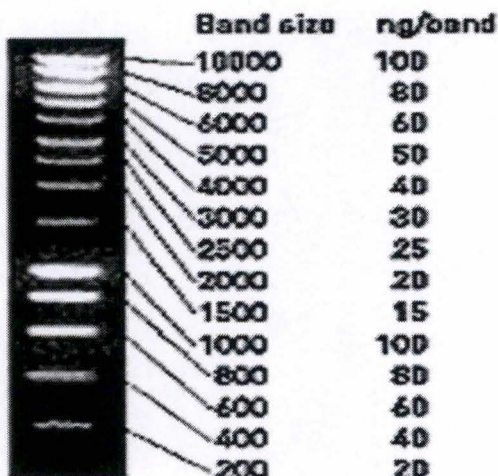
## 2.6. Restriction diagnostique et migration sur gel d'agarose 1%

La restriction diagnostique permet d'identifier des plasmides grâce à leur profil de restriction. Suivant les sites de restriction contenus sur le plasmide, la restriction donne des bandes d'une certaine taille identifiables grâce à un marqueur de poids moléculaire qui permet également de quantifier de façon relative l'ADN.

Protocole de restriction : - 1  $\mu$ l d'ADN plasmidique

- 1  $\mu$ l de tampon d'incubation de l'enzyme 1x
- 1  $\mu$ l d'enzyme de restriction (2-10 U)
- 1  $\mu$ l de Rnase (1mg/ml)
- 6  $\mu$ l d'eau désionisée

Incuber 1heure à 37°C ou à température ambiante en fonction de l'enzyme.



Après restriction, une fraction des échantillons sont déposés sur gel d'agarose 1% et la taille des fragments est évaluée à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire donnant la migration de molécules d'ADN d'une taille connue allant de 200 à 10000 pb. Ci-contre, le marqueur de poids moléculaire SmartLadder d'Eurogentec utilisé comme référence lors des expériences décrites dans ce mémoire.

Fabrication du gel d'agarose :

- Dissoudre 1 g d'agarose dans 100 ml de Tris acétate EDTA 1 x (Tableau 1). Couler la préparation dans une plaque de migration et ajouter 5 µl de bromure d'éthidium (Tableau 1).
- Laisser polymériser le gel et charger les échantillons accompagnés de 1/10 d'allourdisseur (Tableau 1) dans les puits.
- Migrer et ajouter dans un puit vide 5 µl de marqueur moléculaire.

BROMURE ETHIDIUM	TRIS ACETATE EDTA 50X	ALLOURDISSEUR
Solution de 2mg/ml H <sub>2</sub> O	Tris HCl (pH 8) 40 mM	Glycérol 50%
	EDTA 50 mM	EDTA 100 mM
	Acide acétique glacial 57,1 ml/l	SDS 1%
		Bleu de bromophénol ou méthyl orange

Tableau 1 : Composition du bromure d'éthidium, Tris acétate EDTA et d'un allourdisseur.

## 2.7. Réaction LR et transformation

La réaction LR fait appel à la technologie Gateway (Invitrogen) qui est une méthode de clonage basée sur les propriétés de recombinaison site spécifique du bactériophage lambda. La réaction LR est une réaction de recombinaison qui facilite le remplacement d'une séquence d'ADN entre des sites *attL* (situé sur un clone d'entrée) par une séquence entre des sites *attR* (située sur un vecteur de destination). La réaction est catalysée par l'enzyme LR clonase.

Réaliser le mélange suivant :

- Clone d'entrée	100-300 ng/µl
- Vecteur de destination	150 ng/µl
- Tampon de la LR clonase	1 x
- LR clonase	1 µl
- Eau désionisée	qsp 10 µl

Incuber 1 heure à 25°C.

Transformer 2 µl de réaction LR avec 50 µl de cellules compétentes et incuber 1 heure à 37°C sous agitation. Ensuite étaler sur milieu sélectif.

## 2.8. Conjugaison

La conjugaison est un processus de transfert de matériel génétique tel que l'ADN plasmidique d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse qui nécessite le contact et l'appariement entre les bactéries. La conjugaison repose sur la présence dans la bactérie donneuse d'un facteur de sexualité ou de fertilité (facteur F) qui permet la synthèse d'un pili sexuel. Le transfert par ce pili est à sens unique et orienté c'est-à-dire d'une bactérie capable de faire la conjugaison (F+) à une bactérie qui n'en est pas capable (F-).

Protocole pour la conjugaison de *Brucella* :

- ensemencer une culture bactérienne (souche donneuse *E.coli* S17-1 et souche receveuse *Brucella*) dans 5 ml de milieu (+ antibiotique). Incuber toute la nuit à 37°C et sous agitation.
- Ajouter 1 ml de culture de *Brucella* à 50 µl de S17-1 dans un eppendorf stérile.
- Centrifuger 2 minutes à 7000 rpm et éliminer le surnagent.
- Resuspendre le culot dans 1 ml de 2YT et centrifuger 1 minute à 7000 rpm.
- Éliminer 950 µl de surnagent et resuspendre le culot.
- Déposer une goutte de 50 µl sur une petite boîte de 2YT et incuber 4 heures à 37°C dans le cas d'un plasmide répliatif et toute la nuit à température ambiante pour un plasmide répliatif.
- Strier la goutte sur une boîte 2YT Nal + antibiotique de sélection. Incuber quatre jours à 37°C. Ensuite repiquer une colonie sur une boîte 2YT + antibiotique de sélection.

## 2.9. Coloration au bleu de Coomassie

La coloration au bleu de Coomassie est une technique de coloration des protéines sur un gel. Le gel de polyacrilamide est trempé 1 heure dans une solution de bleu de Coomassie (R250) (Tableau 2) qui se lie aux protéines. Ensuite, l'utilisation d'un décolorant (Tableau 2) permet de faire apparaître les protéines qui retiennent la coloration bleue.

	BLEU DE COOMASSIE	DECOLORANT
Bleu de Coomassie	250 mg	-
Acide acétique 10%	10 ml	50 ml
Ethanol 30%	-	30 ml
Ethanol 50%	50ml	-
Eau désionisée	qsp 500 ml	qsp 500 ml

Tableau 2 : Composition du bleu de Coomassie et du décolorant.

## 2.10. Western blot

Le western blot est une technique qui permet de détecter spécifiquement une protéine dans un mélange à l'aide d'un anticorps spécifique pour cette protéine. La technique de détection comporte trois étapes : la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire dans un gel de polyacrylamide dénaturant, l'électrotransfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose et la détection immunologique de la protéine d'intérêt.

### 2.10.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) ou "SDS-PAGE" permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Le gel de migration comporte deux parties : le gel de concentration qui concentre les protéines et le gel de séparation (Tableau 3).

	GEL DE CONCENTRATION	GEL DE SEPARATION	
		10%	12%
Acrylamide r 38,5%	390 µl	2,6 ml	3,1 ml
Tris 1,5M pH 6,8	750 µl	-	-
Tris 1,5M pH 8,8	-	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10%	30 µl	100 µl	100 µl
Persulfate d'ammonium 10%	30 µl	100 µl	100 µl
Temed	3 µl	8 µl	8 µl
Eau désionisée	1,8 ml	4,7 ml	4,2 ml

Tableau 3 : Composition des gels de concentration et de séparation (10% et 12%).

Avant migration, les échantillons sont mélangés à un tampon de chargement protéique (v/v) (Tableau 4) et bouillis 10 minutes à 100°C pour permettre l'action du  $\beta$ -mercaptoéthanol qui rompt les ponts disulfures dénaturant ainsi les protéines. Les échantillons peuvent éventuellement être soniqué avant utilisation notamment pour fragmenter l'ADN. Lors des manipulations réalisées dans ce mémoire, les échantillons sont concentrés dans du PBS 1x (Tableau 5) avant utilisation. La migration dure environ 2 heures à 20 mA/gel dans du tampon d'électrophorèse (Tableau 4).

### 2.10.2. Transfert sur membrane de nitrocellulose

Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est un transfert de type semi-sec (Tableau 4). Une différence de potentiel est appliquée entre le gel de polyacrylamide et une membrane de nitrocellulose (imprégnée du tampon de transfert semi-sec) permettant aux protéines chargées négativement d'être transférées sur la membrane. Le transfert est réalisé durant 1 heure à 3 mA/cm<sup>2</sup> de membrane de nitrocellulose.

TAMPON DE CHARGEMENT PROTEIQUE		TAMPON ELECTROPHORESE 5X		TAMPON DE TRANSFERT SEMI-SEC	
Glycérol 50%	1 ml	Tris 50 mM	38,28g	Tris 25 mM pH 8,3	3,027g
B-mercaptoéthanol 25%	0,3 ml	Glycine 380 mM	142,63g	Glycine 129 mM	9,68g
SDS 50%	1g	SDS 0,5%	2,5g	SDS 0,1%	1 ml
Tris 1,5M pH 6,8	378 mg	Eau désionisée	qsp 1l	Méthanol 10%	20 ml
Bleu de bromophénol 0,025%	0,5 mg			Eau désionisée	qsp 1l
Eau désionisée	qsp 2ml				

Tableau 4 : Composition des tampons de chargement protéique, d'électrophorèse et de transfert semi-sec.

### 2.10.3. Détection immunologique

Une fois le transfert terminé, la membrane est saturée 1 heure à température ambiante et sous agitation avec du TBST 0,05%-régilait 3% (Tableau 5). L'action saturante

des protéines du lait et l'action détergente du Tween20 préparent la membrane pour l'immunodétection. Ensuite, la membrane est lavée 2 fois 5 minutes avec du TBST 0,05% (Tableau 5) avant d'ajouter l'anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt dilué dans du TBST 0,05%. L'anticorps est incubé 1 heure à température ambiante et sous agitation avec la membrane. Celle-ci est ensuite lavée 10 fois 5 minutes au TBST 0,05% avant d'ajouter l'anticorps secondaire dilué dans du TBST 0,05%. Celui-ci est incubé 1 heure à température ambiante et sous agitation avec la membrane. L'anticorps secondaire est dirigé contre le domaine Fc de l'anticorps primaire et est conjugué à la Horseradish peroxydase. Avant d'être révélée la membrane est lavée 10 fois 5 minutes avec du TBST 0,05%.

TBS 10X		TBSTWEEN20 0,05%		TBST 0,05%-REGILAIT 3%		PBS 1X
Tris 0,5M pH 7,5	30,35g	TBS 10x	50ml	Régilait	2g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2mM
NaCl 2M	58,44g	Tween 20	11,5 gouttes	TBST 0,05%	65 ml	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10mm
Eau désionisée	qsp 500ml	Eau désionisée	qsp 500ml			KCl 2,7 mM
						NaCl 137 mM

Tableau 5 : Composition du TBS 10x, du TBSTween20 0,05%, du TBST0,05%-régilait 3% et du PBS 1x.

#### 2.10.4. Révélation ECL

La membrane est incubée 1 minute en présence de la solution de révélation ECL (électrochemiluminescence) et égoutée. Ensuite, elle sert à impressionner un film radiographique durant un temps variable qui sera par la suite révélé. La révélation peut également être réalisée à l'aide du kit "Western Chemiluminescence reagent Plus" (Perkin Elmer™).

Solution maison de révélation ECL : Tampon ECL (Tableau 6) 10 ml  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% 3µl  
 Luminol (Tableau 6) 50 µl  
 Acide coumarique (Tableau 6) 25 µl

TAMPON ECL	LUMINOL	ACIDE COUMARIQUE
12,2 g Tris 100mM pH 8,5	0,886 g 3-Aminophthathydrazide	0,148 g Acide coumarique
Eau désionisée qsp 11	20 ml Diméthyl sulfoxide	10 ml Diméthyl sulfoxide

Tableau 6 : Composition du tampon ECL, du luminol et de l'acide coumarique.

Les bandes impressionnées sur le film radiographique sont analysées à l'aide du marqueur de poids moléculaire Low range (Biorad) dont voici les protéines standards accompagnées de leur poids moléculaire en Dalton (Tableau 7) :

	POIDS MOLECULAIRE (KILODALTONS)
Phosphorylase B	106,488
Bovine Serum Albumine	97,599
Ovalbumine	50,238
Carbonic Anhydrase	36,899
Soybean Trypsin Inhibitor	28,878
Lysozyme	19,893

Tableau 7 : Marqueur de poids moléculaire Low range (Biorad).

### 2.11. Détection d'AMP cyclique

La détection *in vitro* d'AMP cyclique peut se réaliser à l'aide du kit "cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) System" d'Amersham Biosciences.

Procédure standard sur une culture cellulaire (Assay method) :

- 100 µl d'échantillons à tester sont déposés dans une plaque multipuits où des anticorps de singe anti-IgG de lapin sont attachés aux fonds des puits.
- 100µl d'antisérum (anticorps de lapin anti-CyaA') y sont déposés et incubés exactement 2 heures à 3-5°C.
- 50 µl de peroxydase conjuguée à de l'AMPc sont ajoutés aux puits et incubés exactement 60 minutes à 3-5°C.
- Les puits sont lavés 4 fois avec 400 µl de tampon de lavage.
- 150 µl du substrat de l'enzyme sont ajoutés aux puits et incubés exactement 60 minutes à température ambiante. Une couleur bleue se développe en fonction de la quantité de conjugué lié et peut-être lue à 630 nm.

2

# *Bibliographie*

- Ackermann, M.R., Cheville, N.F. and Deyoe, B.L. (1988) Bovine ileal dome lymphoepithelial cells: endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. *Vet Pathol*, 25, 28-35.
- Anderson, T. D. and Cheville F. (1986) Ultrastructural morphometric analysis of *Brucella abortus*-infected trophoblasts in experimental placentitis. *Am J Pathol*, 124, 226-237.
- Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A.E., Ugalde, R., Moreno, E., Moriyon, I. and Gorvel, J.P. (2005) Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol*, 6, 618-625.
- Arenas, G.N., Staskevich, A.S., Aballay, A. and Mayorga, L.S. (2000) Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect Immun*, 68, 4255-4263.
- Backert, S. and Meyer, T.F. (2006) Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 9, 207-217.
- Barry, E.M., Weiss, A.A., Ehrmann, I.E., Gray, M.C., Hewlett, E.L. and Goodwin, M.S. (1991) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation. *J Bacteriol*, 173, 720-726.
- Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A. and Sebo, P. (1994) Adenylate cyclase toxin (*CyaA*) of *Bordetella pertussis*. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with *HlyA* of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 269, 27231-27239.
- Beveridge, T.J. (1999) Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol*, 181, 4725-4733.
- Botsford, J.L. and Harman, J.G. (1992) Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev*, 56, 100-122.
- Briones, G., Inon de Iannino, N., Roset, M., Vigliocco, A., Paulo, P.S. and Ugalde, R.A. (2001) *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect Immun*, 69, 4528-4535.
- Celli, J. (2006) Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res Microbiol*, 157, 93-98.
- Celli, J. and Gorvel, J.P. (2004) Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Microbiol*, 7, 93-97.
- Celli, J., Salcedo, S.P. and Gorvel, J.P. (2005) *Brucella* coopts the small GTPase *Sar1* for intracellular replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 1673-1678.
- Chaves-Olarte, E., Guzman-Verri, C., Meresse, S., Desjardins, M., Pizarro-Cerda, J., Badilla, J., Gorvel, J.P. and Moreno, E. (2002) Activation of Rho and Rab GTPases dissociates *Brucella abortus* internalization from intracellular trafficking. *Cell Microbiol*, 4, 663-676.
- Comerci, D.J., Martinez-Lorenzo, M.J., Sieira, R., Gorvel, J.P. and Ugalde, R.A. (2001) Essential role of the *VirB* machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol*, 3, 159-168.
- Dalet, K., Weber, C., Guillemot, L., Njamkepo, E. and Guiso, N. (2004) Characterization of adenylate cyclase-hemolysin gene duplication in a *Bordetella pertussis* isolate. *Infect Immun*, 72, 4874-4877.
- Delrue, R.M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J.P. and Letesson, J.J. (2001) Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol*, 3, 487-497.

- DelVecchio, V.G., Kapatral, V., Redkar, R.J., Patra, G., Mujer, C., Los, T., Ivanova, N., Anderson, I., Bhattacharyya, A., Lykidis, A., Reznik, G., Jablonski, L., Larsen, N., D'Souza, M., Bernal, A., Mazur, M., Goltsman, E., Selkov, E., Elzer, P.H., Hagijs, S., O'Callaghan, D., Letesson, J.J., Haselkorn, R., Kyrpides, N. and Overbeek, R. (2002) The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 443-448.
- Dricot, A., Rual, J.F., Lamesch, P., Bertin, N., Dupuy, D., Hao, T., Lambert, C., Hallez, R., Delroisse, J.M., Vandenhoute, J., Lopez-Goni, I., Moriyon, I., Garcia-Lobo, J.M., Sangari, F.J., Macmillan, A.P., Cutler, S.J., Whatmore, A.M., Bozak, S., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., Vidal, M., Hill, D.E., Letesson, J.J. and De Bolle, X. (2004) Generation of the *Brucella melitensis* ORFeome version 1.1. *Genome Res*, 14, 2201-2206.
- Enninga, J., Mounier, J., Sansonetti, P. and Tran Van Nhieu, G. (2005) Secretion of type III effectors into host cells in real time. *Nat Methods*, 2, 959-965.
- Fernandez-Prada, C.M., Zelazowska, E.B., Nikolich, M., Hadfield, T.L., Roop, R.M., 2nd, Robertson, G.L. and Hoover, D.L. (2003) Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infect Immun*, 71, 2110-2119.
- Gamazo, C. and Moriyon, I. (1987) Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. *Infect Immun*, 55, 609-615.
- Garcia-del Portillo, F. and Alonso, A. (2004) Hijacking eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *Int Microbiol*, 7, 181-191.
- Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J.F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C. and Desjardins, M. (2001) The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol*, 152, 165-180.
- Gorvel, J.P. and Moreno, E. (2002) *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol*, 90, 281-297.
- Gregory, D.S. (2006) Pertussis: a disease affecting all ages. *Am Fam Physician*, 74, 420-426.
- Guzman-Verri, C., Chaves-Olarte, E., von Eichel-Streiber, C., Lopez-Goni, I., Thelestam, M., Arvidson, S., Gorvel, J.P. and Moreno, E. (2001) GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes: direct activation of Cdc42. *J Biol Chem*, 276, 44435-44443.
- Kuehn, M.J. and Kesty, N.C. (2005) Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev*, 19, 2645-2655.
- Ladant, D., Michelson, S., Sarfati, R., Gilles, A.M., Predeleanu, R. and Barzu, O. (1989) Characterization of the calmodulin-binding and of the catalytic domains of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *J Biol Chem*, 264, 4015-4020.
- Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E. and Gorvel, J.P. (2005) *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol*, 8, 60-66.
- Maurin, M. (2005) [Brucellosis at the dawn of the 21st century]. *Med Mal Infect*, 35, 6-16.
- Meyer, D.H. and Fives-Taylor, P.M. (1994) Characteristics of adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infect Immun*, 62, 928-935.
- Moreno, E., Cloeckert, A. and Moriyon, I. (2002) *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol*, 90, 209-227.
- Nagai, H., Cambronne, E.D., Kagan, J.C., Amor, J.C., Kahn, R.A. and Roy, C.R. (2005) A C-terminal translocation signal required for Dot/Icm-dependent delivery of the *Legionella* RalF protein to host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 826-831.

- Naroeni, A. and Porte, F. (2002) Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infect Immun*, 70, 1640-1644.
- Ogawa, M. and Sasakawa, C. (2006) Intracellular survival of *Shigella*. *Cell Microbiol*, 8, 177-184.
- Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N. and Sasakawa, C. (2005) Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science*, 307, 727-731.
- Pizarro-Cerda, J., Meresse, S., Parton, R.G., van der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goni, I., Moreno, E. and Gorvel, J.P. (1998) *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun*, 66, 5711-5724.
- Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. and Gorvel, J.P. (2000) Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microbes Infect*, 2, 829-835.
- Rittig, M.G., Alvarez-Martinez, M.T., Porte, F., Liautard, J.P. and Rouot, B. (2001) Intracellular survival of *Brucella* spp. in human monocytes involves conventional uptake but special phagosomes. *Infect Immun*, 69, 3995-4006.
- Rosqvist, R., Forsberg, A. and Wolf-Watz, H. (1991) Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect Immun*, 59, 4562-4569.
- Rouot, B., Alvarez-Martinez, M.T., Marius, C., Menanteau, P., Guilloteau, L., Boigegrain, R.A., Zumbihl, R., O'Callaghan, D., Domke, N. and Baron, C. (2003) Production of the type IV secretion system differs among *Brucella* species as revealed with VirB5- and VirB8-specific antisera. *Infect Immun*, 71, 1075-1082.
- Roy, C.R., Berger, K.H. and Isberg, R.R. (1998) *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Mol Microbiol*, 28, 663-674.
- Sallstrom, B. and Andersson, S.G. (2005) Genome reduction in the  $\alpha$ -Proteobacteria. *Curr Opin Microbiol*, 8, 579-585.
- Schrammeijer, B., den Dulk-Ras, A., Vergunst, A.C., Jurado Jacome, E. and Hooykaas, P.J. (2003) Analysis of Vir protein translocation from *Agrobacterium tumefaciens* using *Saccharomyces cerevisiae* as a model: evidence for transport of a novel effector protein VirE3. *Nucleic Acids Res*, 31, 860-868.
- Schulein, R., Guye, P., Rhomberg, T.A., Schmid, M.C., Schroder, G., Vergunst, A.C., Carena, I. and Dehio, C. (2005) A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of *Bartonella henselae* into human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 856-861.
- Shin, J.S. and Abraham, S.N. (2001) Caveolae as portals of entry for microbes. *Microbes Infect*, 3, 755-761.
- Shin, J.S., Gao, Z. and Abraham, S.N. (2000) Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science*, 289, 785-788.
- Shohdy, N., Efe, J.A., Emr, S.D. and Shuman, H.A. (2005) Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 4866-4871.
- Sory, M.P., Boland, A., Lambermont, I. and Cornelis, G.R. (1995) Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 11998-12002.
- Sory, M.P. and Cornelis, G.R. (1994) Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol Microbiol*, 14, 583-594.

- Spink, W.W., Hall, J.W., 3rd, Finstad, J. and Mallet, E. (1962) Immunization with viable Brucella organisms. Results of a safety test in humans. Bull World Health Organ, 26, 409-419.*
- Thanassi, D.G. and Hultgren, S.J. (2000) Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. Curr Opin Cell Biol, 12, 420-430.*
- Tumurkhuu, G., Koide, N., Takahashi, K., Hassan, F., Islam, S., Ito, H., Mori, I., Yoshida, T. and Yokochi, T. (2006) Characterization of biological activities of Brucella melitensis lipopolysaccharide. Microbiol Immunol, 50, 421-427.*
- Uchiya, K., Barbieri, M.A., Funato, K., Shah, A.H., Stahl, P.D. and Groisman, E.A. (1999) A Salmonella virulence protein that inhibits cellular trafficking. Embo J, 18, 3924-3933.*
- Wolff, J., Cook, G.H., Goldhammer, A.R. and Berkowitz, S.A. (1980) Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase. Proc Natl Acad Sci U S A, 77, 3841-3844.*