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

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Caractérisation de trois protéines de la membrane externe de Brucella

Decelle, Béatrice

Award date:
1993

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

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

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

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

Download date: 02. May. 2026

FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTE DES SCIENCES

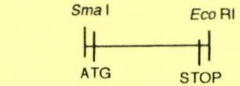
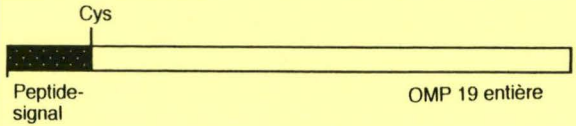
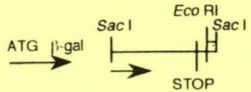
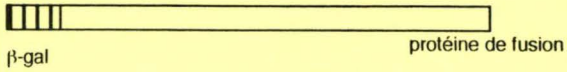
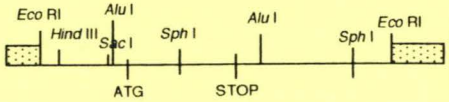
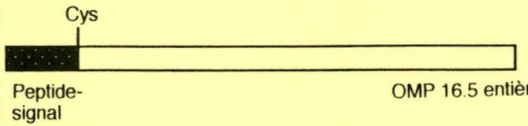
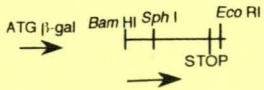
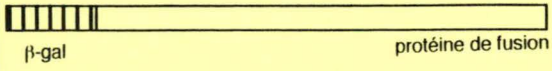
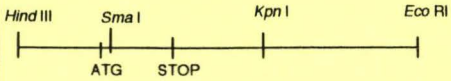
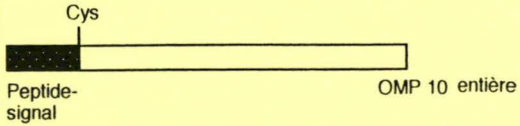
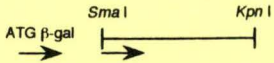
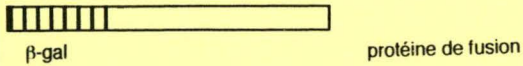
CARACTERISATION DE TROIS PROTEINES DE LA MEMBRANE EXTERNE DE *BRUCELLA*

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

Béatrice DECELLE

1993

Représentation des clones d'*Escherichia coli* recombinants et de leur produit d'expression.

Clone	Schéma de la construction	Produit d'expression avant maturation	Taille de la protéine détectée en Da
19.06			18680
19.05F			16316
16.18			18221
16.04F			18995
10.22			13844
10.07F			14138

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/72.44.20

Caractérisation de trois protéines de la membrane externe de *Brucella*

DECELLE Béatrice

Résumé

La brucellose, une zoonose d'importance économique et sanitaire mondiale, est causée par une bactérie Gram-négative du genre *Brucella*.

Parmi les antigènes de la paroi de *Brucella*, notre étude s'est portée sur la caractérisation de trois protéines mineures de la membrane externe: les OMPs (Outer Membrane Proteins) de 19-, 16.5- et 10-kDa.

La séquence protéique déduite de la séquence nucléotidique présente les caractéristiques propres aux lipoprotéines.

Les outils à notre disposition sont d'une part des anticorps monoclonaux spécifiques de chacune des trois OMPs et d'autre part des clones d'*Escherichia coli* recombinants exprimant ces OMPs, sous la forme entière ou sous la forme d'une protéine de fusion.

Des expériences visant à localiser les trois OMPs chez les bactéries recombinantes et à déterminer leur nature biochimique ont été menées.

Ces trois OMPs se localisent dans la phase détergente après extraction et partition de phases au Triton X-114. Le clivage de leur peptide-signal est inhibé par la globomycine. Ces deux propriétés caractérisent les lipoprotéines décrites chez d'autres microorganismes. La dernière preuve de la nature lipoprotéique des trois OMPs devra être fournie par leur marquage à l'acide palmitique.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)
Décembre 1993
Promoteur : J.-J. LETESSON

Ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans l'appui éclairé, actif et judicieux de toute une série de personnes.

Au terme de ce travail, je voudrais tout d'abord exprimer ma reconnaissance au Professeur Jean-Jacques Letesson pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire.

Que cette chère Anne Tibor trouve ici tous mes remerciements pour m'avoir guidé tout au long de cette année avec beaucoup de gentillesse, de disponibilité et une infinie patience.

Toute ma reconnaissance va à Madame S. Wattiaux-De Coninck et à Messieurs P. Lintermans, E. Feytmans et D. Delforge, pour avoir accepté de lire ce récit.

Je remercie tout particulièrement Pascale et Vincent pour les encouragements prodigués tout au long de ce travail; Philippe, un excellent professeur Mac, pour sa disponibilité et les nombreux conseils distillés avec beaucoup de gentillesse; Anne M. et Régine, pour leur calme réconfortant.

Je remercie également les autres membres du laboratoire pour leur collaboration efficace et spontanée et l'excellente ambiance qu'ils font régner dans ce haut lieu de travail. Je pense à Deborah, Isabelle, Bénédicte, Valérie, Dominique, Bernadette, Martine, Christian, Long, Karl, Daniel et Jean-Philippe, l'interlocuteur privilégié du lundi matin.

Je ne peux oublier mes compagnons; Stéphane, Fabrice et Marc avec qui j'ai partagé mes premiers pas dans la recherche.

Que Madame Françoise De Bosch-Kemper-Herphelin de l'Unité d'Histologie trouve ici tous mes remerciements pour l'aide technique apportée ainsi que l'Unité de Microscopie Electronique pour m'avoir permis de disposer de leur matériel.

Un grand merci aussi à Monsieur et Madame Delfosse pour avoir relu certaines parties de ce récit.

Merci à toutes les personnes qui, directement ou indirectement, m'ont aidé et encouragé durant ce mémoire.

Enfin, merci à mes parents et ma soeur pour leur présence et leurs encouragements au cours de ces cinq années et surtout pour avoir su user de beaucoup de compréhension et de patience (en particulier ces deux derniers mois...).

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I : INTRODUCTION 1

I. La brucellose 1

I.1. HISTORIQUE 1

I.2. MANIFESTATIONS CLINIQUES ET MODES DE CONTAMINATION 2

I.2.1. La brucellose humaine 2

I.2.2. Les brucelloses animales 3

I.3. APERCU de la PROBLEMATIQUE en BRUCELLOSE 4

I.4. LA BACTERIE 7

I.4.1. Caractères bactériologiques 7

1.4.1.1. Morphologie 7
I.4.1.2. Culture 7
I.4.1.3. Caractères biochimiques 8
I.4.1.4. Typage 8

I.4.2. Caractères génétiques 8

I.4.3. Ultrastructure 9

I.4.3.1. Le cytoplasme 9
I.4.3.2. La paroi bactérienne 9
I.4.3.3. La membrane cytoplasmique 9
I.4.3.4. L'espace périplasmique 9
I.4.3.5. Le peptidoglycane 10
I.4.3.6. La membrane externe 10

II. Les lipoprotéines de la membrane externe (ME) 14

II.1 CARACTERISTIQUES DES LIPOPROTEINES 14

II.2. BIOSYNTHESE DES LIPOPROTEINES 16

II.3. LA VOIE DE SECRETION 17

II.3.1. Translocation à travers la membrane cytoplasmique 17

II.3.2. Destination surface 19

II.4. FONCTIONS DES LIPOPROTEINES 21

II.5. INTERACTIONS AVEC LE SYSTEME IMMUNITAIRE 21

CHAPITRE 2 : BUT DU TRAVAIL 25

CHAPITRE 3 : MATERIEL ET METHODES 26

I. Matériel 26

I.1. SOUCHES BACTERIENNES 26

I.2. PLASMIDES 27

I.3. MILIEUX DE CULTURE 28

II. Techniques de génie génétique 30

II.1. EXTRACTION de l'ADN PLASMIDIQUE 30

II.1.1. Minipréparation d'ADN plasmidique 30

II.1.2. Midipréparation d'ADN plasmidique (Midiprep) 31

II.2. ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE 33

II.3. RESTRICTION DE L'ADN 35

II.4. REACTION DE LIGATION 36

II.5. TRANSFORMATION BACTERIENNE 37

II.6. AMPLIFICATION DE GENES PAR PCR 38

II.7. SEQUENCAGE 40

III. Techniques d'analyse des protéines 45

III.1. DOSAGE PROTEIQUE 45

III.2. ANALYSE DES PROTEINES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE SDS 46

III.3. WESTERN BLOT 49

III.4. MISE EN EVIDENCE D'UNE PROTEINE PAR DOT BLOT 53

III.5. ELISA indirect 54

III.6. DETECTION IMMUNOLOGIQUE A L'AIDE DE LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE 55

III.6.1. Le microscope à transmission (MET) 55

III.6.2. Préparation des échantillons pour l'examen au ME 56

III.6.3. Marquage de bactéries entières sur grilles de ME 56

III.6.4. Détection immunologique dans les plaques de Terasaki 57

III.7. FRACTIONNEMENT CELLULAIRE 59

III.8. REPARTITION AU TRITON X-114 60

III.9. TEST DE RADIOIMMUNOPRECIPITATION 62

CHAPITRE 4 : RESULTATS **65**

I. Présentation des E. coli recombinantes qui expriment les 3 OMPs mineures de Brucella. 65

I.1. Introduction 65

I.1.1. Rappels 65

I.1.2. Plasmides et bactéries recombinants : carte des inserts et expression de protéines recombinantes 66

I.2. Obtention d'une protéine de fusion sans peptide-signal pour l'OMP 16.5 68

I.2.1. Amplification PCR 68

I.2.1.1. Choix des oligos 68
I.2.1.2. Choix du plasmide 69
I.2.1.3. Amplification : réaction PCR 69

I.2.2. Clonage dans le plasmide pBluescript 70

I.2.3. Test de l'expression de l'OMP 16.5 par les bactéries E. coli transformées par le plasmide 16.04F 71

I.3. Effet du glucose sur l'expression de protéines de fusion 73

II. Localisation des OMPs chez les E. coli recombinantes 75

II.1. LOCALISATION DES OMPs PAR FRACTIONNEMENT 76

II.1.1. Cas de l'OMP 10 76

II.1.2. Cas des OMPs 19 et 16.5 76

II.2. EXPOSITION EN SURFACE des OMPs RECOMBINANTES 77

II.2.1. ELISA indirect sur bactéries entières immobilisées 77

II.2.2. Marquage de bactéries entières sur grilles 79

II.2.3. Coupe de bactéries marquées en plaques de Terasaki 79

II.2.4. Marquage sur coupe 80

III. Détermination de la nature lipoprotéique des OMPs 81

III.1. Extraction et partition de phases au Triton X-114 81

III.1.1. Partition d'extraits totaux de Brucella 82

III.1.2. Partition d'extraits totaux d'E. coli recombinantes 83

III.2. Effet de la globomycine 84

III.3. Marquage métabolique à l'acide palmitique tritié 85

III.3.1. Incorporation d'acide palmitique chez les E. coli recombinantes 86

III.3.2. Marquage métabolique des Brucella à l'acide palmitique tritié 88

IV. Test de l'effet du ß-mercaptoéthanol 90

CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET CONCLUSIONS 91

CHAPITRE 6 : PERSPECTIVES 99

CHAPITRE 7 : BIBLIOGRAPHIE 101

CHAPITRE 8 : ANNEXES I

LISTE DES ABREVIATIONS

Å	angström
ABTS	2,2'-azino-di-3-alkyl-benzathiozoniline-thionate
AcMo	anticorps monoclonal
ADN	acide désoxyribonucléique
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
APS	ammonium persulfate
ARN	acide ribonucléique
BCA	acide bicinchroninique
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-2-indolyl-phosphate
BSA	albumine de sérum bovin
CAP	Catabolite Activator Protein
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CRP	Cyclic AMP Receptor Protein
Da	dalton
DO	densité optique
DPM	désintégration par minute
DTT	dithiothréitol
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
IDR	intradermo réaction
Ig	immunoglobuline
IPTG	isopropyl-thio-ß-D-thiogalactoside
kb	kilopaires de bases
kDa	kilodalton
L_B	lymphocyte B
LB	milieu de Luria-Bertani
LP	lipoprotéine
LPS	lipopolysaccharide
LPS-R	lipopolysaccharide de souche "Rough" (rugueuse)
LPS-S	lipopolysaccharide de souche "Smooth" (lisse)
L_T	lymphocyte T
ME	membrane externe
MET	microscope électronique à transmission
µg	microgramme
µl	microlitre
µm	micromètre
mg	milligramme
ml	millilitre
midiprep	midipréparation d'ADN
miniprep	minipréparation d'ADN
nm	nanomètre
NTB	bleu de Nitrotetrazolium
oligo	oligonucléotide
OMP	protéine de la membrane externe
ORF	phase ouverte de lecture
PAL	lipoprotéine associée au peptidoglycane
pb	paires de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PG	peptidoglycane
PMF	force motrice fournie par les protons
RAM	anticorps de lapin anti-souris
RAM-phosphatase	anticorps de lapin anti-souris couplé à la phosphatase alcaline
RPM	tour par minute

SAM-PA	anticorps de mouton anti-souris couplé à la phosphatase alcaline
SDS	dodécyl sulfate de sodium
SDS- I	fraction des protéines insolubles dans le SDS
SDS-PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS
Sec	sécrétoire
SPase	peptidase signal
vol/vol	volume/volume
X-gal	5-Bromo, 4-Chloro, 3-indolyl-ß-D-galactopyrononide

INTRODUCTION

Figure I.1. : Quelques dates importantes. (Christie, 1980; Salata et al.., 1985; Verger, J.M.: communication, juin 1993)

- 1861 : Marston décrit cliniquement la fièvre de Malte: allure irrégulière de la courbe thermique, douleurs articulaires,... (Marston, 1861).

- 1877 : David Bruce isole l'agent pathogène responsable de cette fièvre, qu'il dénomma : *Micrococcus melitensis* (Bruce, 1887).

- 1895 : Bang isole *Bacterium abortus*.

- 1897 : Wright met au point le sérodiagnostic qui donne au clinicien l'outil pour discriminer le malade de personnes saines.

- 1905 : Horrocks montre la présence de bactéries, *Micrococcus melitensis* dans le lait de chèvre (corrélation établie entre la contamination de l'homme et la consommation du lait cru de chèvre)

- 1905 : Zammit comprend l'origine de la contamination en mettant en évidence des agglutinines anti-*M. melitensis* dans le sérum des chèvres.

- 1914 : Traum isole *B.suis* chez le porc, un autre agent infectieux pour l'homme.

- 1918 : Alice Evans a établi l'identité bactériologique et immunologique entre *B.melitensis* et *B.abortus*.

- 1920 : Tous ces agents infectieux sont regroupés sous le nom générique de *Brucella* par Meyer et Shaw.

- 1966 : *B.neotomae* est identifiée dans l'Utah (USA) et ne semble pas avoir de répercussions sur l'homme.

- 1968 : Carmich et Kenny ont isolé *B.canis*.

- 1970 : *B.ovis* est isolé en Australie dans les troupeaux de moutons.

Tableau I.1 : Les différentes espèces de *Brucella* pathogènes pour l'homme. (Berche et al., 1989)

	B. abortus	*B. melitensis*	*B. suis*	*B. canis*
Principal réservoir animal	Bovins Ovins	Caprins Ovins	Porc	Chiens
Brucellose animale en France	Incidence notable dans toutes les régions	Incidence notable en région méditerranéenne	Faible incidence	Cas isolés
Pathologie humaine	++ Infections peu sévères	++++ Infections sévères Complications fréquentes	+ Lésions suppuratives chroniques fréquentes	(+) Infections peu sévères
Brucellose humaine en France	5 à 10 p. 100	>90 p. 100	Non déterminé	Non déterminé

I. La brucellose

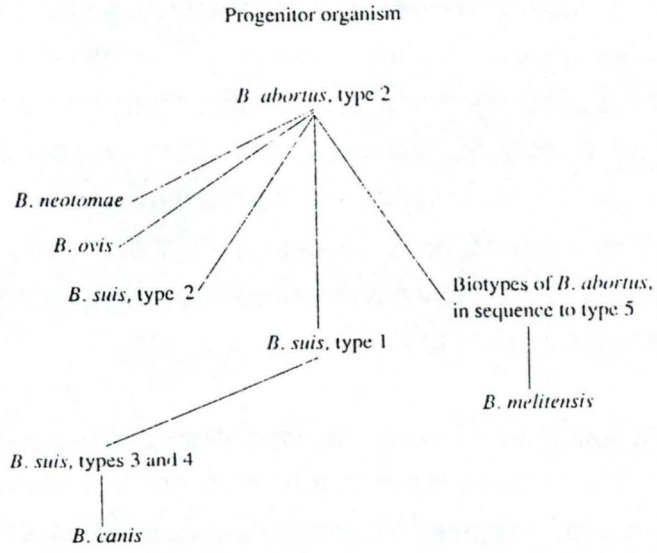
I.1. HISTORIQUE

Le terme "brucellose" regroupe des maladies contagieuses aigües ou chroniques, frappant l'homme ainsi que les animaux tant sauvages que domestiques; causées par des bactéries du genre *Brucella*. La brucellose est une maladie connue depuis très longtemps chez l'homme; en effet, en 450 avant Jésus-Christ, Hippocrate en décrivait déjà les symptômes (Anonyme, 1977). Cette maladie frappe encore plus particulièrement les animaux (bovins, ovins, caprins,...). Au fil des années et au prix de nombreuses recherches, on a commencé à mieux connaître et comprendre le germe responsable de cette maladie. **(figure I.1)**

Les bactéries *Brucella* sont de petits coccobacilles, Gram-négatifs, immobiles, asporulés, aérobies stricts et parasites intracellulaires facultatifs des macrophages. (Krieg et Holt,1984). Ces caractéristiques ont permis de classer le genre *Brucella* dans la famille des *Brucellaceae* (*Bordetella, Pasteurella*,...). Mais, depuis plusieurs années, la position phylogénétique du genre *Brucella* est controversée. Les études d'hybridation ADN/ADN et de détermination des pourcentages de bases G-C dans l'ADN ont montré que vraisemblablement ces genres sont moins apparentés qu'on avait pu le croire. Ainsi, dans la dernière édition du Bergey's Manual, ce germe est uniquement décrit comme une bactérie Gram-négative. De plus, en 1990, des études de l'ARN ribosomique 16S de *Brucella abortus* et du lipide A ont montré que le genre *Brucella* serait proche des parasites animaux et végétaux de la subdivision alpha-2 de la classe des Protéobactéries (*Rickettsiae, Agrobacteria, Rhizobiae*) (Moreno et al.,1990).

Le genre *Brucella* est subdivisé en 6 espèces (*B. abortus, B. melitensis, B. suis, B. ovis, B. neotomae, B. canis*), sur base de leurs propriétés biochimiques, des exigences de culture, des caractères de pathogénicité, de la spécificité d'hôte **(Tableau I.1)**. Les 3 premières espèces citées sont dites classiques: elles sont divisées en biovars, selon leurs différences métaboliques ou en sérovars, selon leurs variations antigéniques. Au vu de l'étroite relation génétique existante entre les espèces de *Brucella*, une hypothèse a été proposée : "Toutes les souches de *Brucella* sont des biovars d'une seule espèce, *B. melitensis*." (Verger et al.,1985).

Figure I.2 : Modèle de dérivation du genre *Brucella*. (Adams,1990)



Cependant, cette proposition est loin d'être acceptée par tous, même si elle présente une utilité pour la classification. Des analyses par restriction (en RFLP), utilisant comme sondes des fragments d'ADN aléatoires (Restriction Fragments Length Polymorphism) révèlent un polymorphisme dans la taille des fragments de l'ADN entre les espèces du genre *Brucella*. (O'Hara et al., 1985; Allardet-Servent et al., 1988). **(figure I.2)**.

I.2. MANIFESTATIONS CLINIQUES ET MODES DE CONTAMINATION

L'étude de facteurs déterminant la fréquence et la distribution des maladies dans les populations humaines n'est jamais une chose aisée et la brucellose n'échappe pas à la règle. C'est primitivement une maladie des animaux, qui s'est étendue à l'homme par la suite; mais d'un point de vue épidémiologique, celle-ci n'a que peu d'importance, car la transmission interhumaine n'a jamais été montrée. Par contre, la contamination des animaux est importante, par la propagation rapide du germe d'un animal à un autre. La présence de ces bactéries chez les animaux sauvages ne doit pas être mésestimée, car dans certaines régions, elle fait courir un risque plus important d'infection et rend l'éradication totale de la maladie plus difficile. Cependant, les animaux domestiques sont les plus atteints et ils constituent un réservoir de germes à partir duquel l'homme se contamine (Christie, 1980; Berche et al.,1989).

I.2.1. La brucellose humaine

Chaque souche de *Brucella* présente une virulence qui lui est propre et quatre d'entre elles représentent un danger pour l'homme ; on peut les classer en fonction de la gravité de l'infection : *B. melitensis, B. abortus, B. suis* et *B. canis*. L'infection des bovins, ovins et caprins est à la base de la quasi totalité des cas de brucellose humaine. L'homme s'infecte au contact des animaux malades ou à partir de leurs produits contaminés.

La contamination directe, par voie transcutanée, touche certaines catégories de personnes, plus particulièrement exposées par manipulations des animaux infectés, des cultures bactériennes ou des vaccins. On peut citer certaines professions à risques: vétérinaires, bouchers, personnel de laboratoire, éleveurs, éboueurs, ...

Quant à la contamination indirecte, elle se fait par voie digestive, surtout par consommation de produits contaminés, ingérés à l'état cru (lait ou crème non

Tableau I.2 : Typage des souches de *Brucella abortus* en Belgique.
(I.N.R.V, 1991)

Province	Biovar 1		Biovar 3		Biovar 9		B19 (souche vaccinale)	
	Nombre de souches	Nombre d'exploita-tions	Nombre de souches	Nombre d'exploita-tions	Nombre de souches	Nombre d'exploita-tions	Nombre de souches	Nombre d'exploita-tions
Flandre occidentale	0	0	48	36	20	5	0	0
Flandre orientale	0	0	77	32	29	18	0	0
Anvers	0	0	16	14	0	0	0	0
Limbourg	0	0	4	2	0	0	0	0
Brabant	0	0	5	3	0	0	0	0
Liège	0	0	85	59	8	5	1	1
Hainaut	0	0	25	10	1	1	0	0
Namur	0	0	58	28	0	0	0	0
Luxembourg	0	0	124	66	8	5	0	0
Total	0	0	442	250	66	33	1	1
%	-	-	86,84	-	12,97	-	0,19	-

pasteurisés), de légumes, fruits ou eaux souillés par l'environnement d'une ferme contaminée.

En effet, les *Brucella* sont présentes dans les urines et surtout dans le lait des animaux malades. Le placenta, les tissus foetaux et les lochies contiennent aussi de nombreux germes. De plus, les *Brucella* résistent assez longtemps dans l'environnement; à l'abri du soleil, elles survivent plusieurs semaines ou mois dans le sol, le fumier, le purin, ce qui favorise la propagation de la maladie parmi les animaux d'espèces différentes vivant dans une même ferme (bovins, ovins, caprins,...). Enfin, les *Brucella* peuvent rester viables pendant deux mois dans un fromage frais, mais résistent peu de temps dans un fromage fermenté ou sec.

La brucellose humaine ou fièvre ondulante, fièvre de Malte, maladie de Bang, présente une sémiologie polymorphe et peu de maladies infectieuses sont aussi trompeuses qu'elle. Elle peut se présenter sous différentes formes, qui peuvent parfois se succéder chez un même individu. **(Annexe 1 : les formes de brucellose humaine)**. (Christie, 1980; Salata et Ravdin,1985; Berche et al., 1989).

I.2.2. Les brucelloses animales

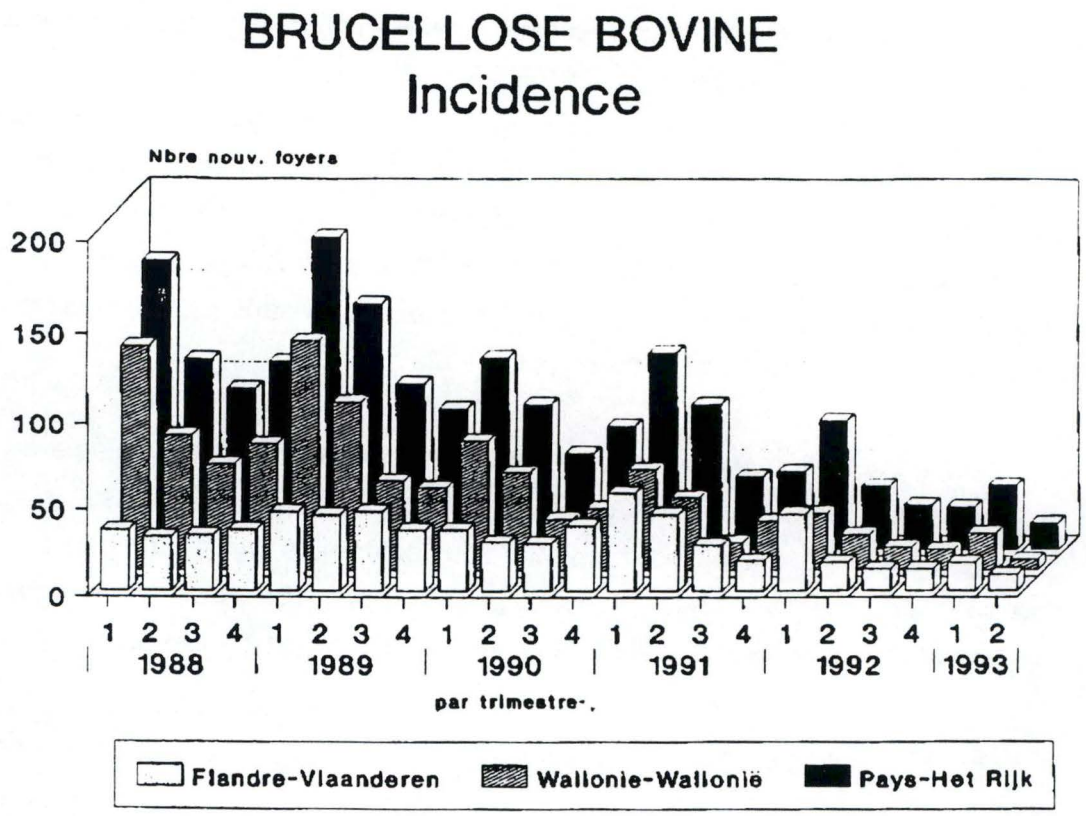
Beaucoup d'animaux peuvent être atteints par cette maladie, mais nous ne développerons que l'affection des bovins dans ce point. La brucellose observée chez d'autres animaux est présentée à l'**annexe 2**.

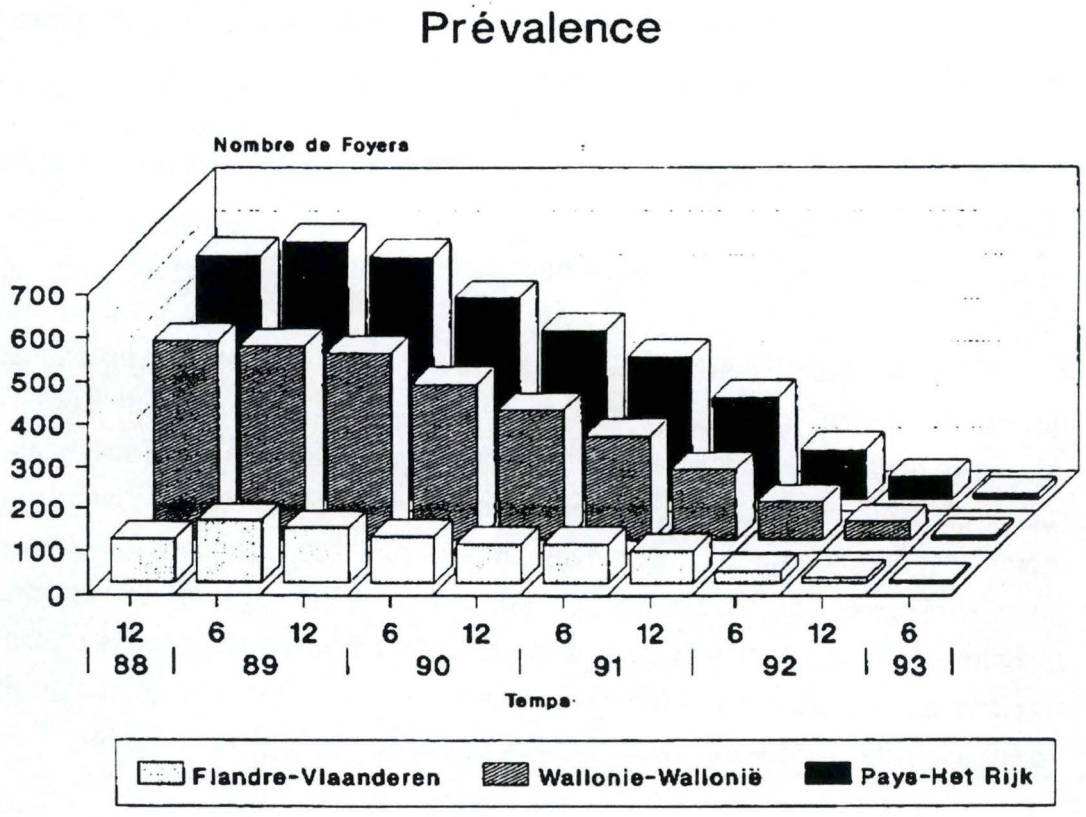
Dans la grande majorité des cas, la brucellose bovine est due à *B. abortus* et occasionnellement à *B. melitensis* et *B. suis*. Ainsi, en 1991, le typage des souches, isolées de foyers belges a donné les résultats repris dans le **tableau I.2**.

La dissémination des bactéries se réalise lors des avortements et accouchements (exsudats utérins, enveloppes et eaux foetales,...) et en dehors de ceux-ci, elle s'observe par le lait, les matières fécales, les sécrétions vaginales et la contamination *in utero*. La bactériémie conduit à une localisation des *Brucella* dans divers organes: mamelles, utérus, rate, foie, épididyme, möelle osseuse, ganglions lymphatiques,.... Mais, la réceptivité du bovin est influencée par l'âge et le sexe; ainsi, elle est maximale pour les vaches gestantes où l'utérus constitue un terrain de choix par la présence de l'érythritol, un sucre catabolisé par *Brucella* et qui jouerait un rôle important dans la localisation des bactéries en favorisant leur croissance (Keppie et al.,1965).

Figure I.3 : Etat de la brucellose en Belgique.

Incidence: nombre de nouveaux troupeaux infectés dans l'année par rapport au nombre total de troupeaux (%).
Prévalence: nombre d'animaux infectés à un moment donné par rapport au nombre total d'animaux (%).





L'avortement est dans 70 % des cas la conséquence de cette invasion bactérienne (Schoenaers et Kaeckenbeeck, 1972).

I.3. APERCU de la PROBLEMATIQUE en BRUCELLOSE

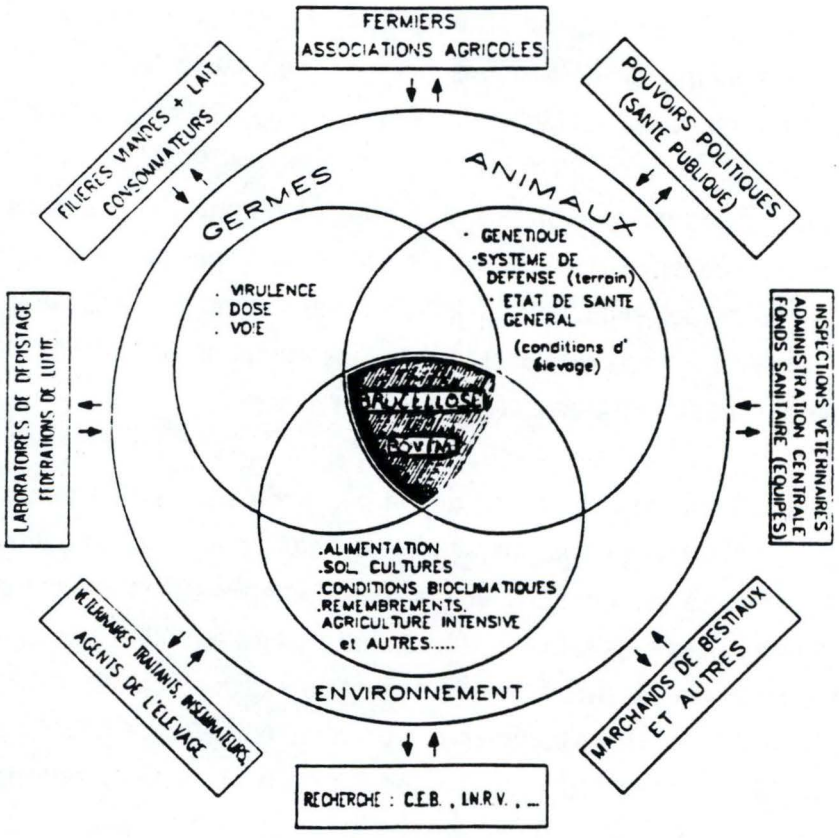
La brucellose reste, en cette fin du vingtième siècle, une zoonose d'importance économique et sanitaire mondiale. Relevons maintenant quelques chiffres.
Des informations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) indiquent en 1993 que, dans 6 des 25 pays du Moyen-Orient où sévit cette maladie, 90.000 cas de brucellose humaine sont rapportés chaque année, dus principalement à *B. melitensis* (WHO, 1993). Des études réalisées aux Etats-Unis ont montré que la mise sur pied d'un programme efficace d'éradication pour les animaux, spécialement pour le bétail, a permis de diminuer fortement le nombre de cas de brucellose humaine (6321 cas en 1947 pour 154 cas en 1982). (Salata et Ravdin, 1989).

Il est à présent intéressant de voir quelle est la situation en Belgique. En effet, notre pays, par sa position géographique et la grande concentration d'élevage qui y existe, est menacé en permanence par les maladies contagieuses touchant les animaux, dont la brucellose. Après plus de vingt ans de lutte, cette affection est en voie d'être éradiquée : la situation s'améliore très rapidement et depuis quelques années, l'évolution des mesures a suivi de très près la régression de la maladie **(figure I.3)**. Ceci a permis d'aboutir aux résultats actuels : un taux d'infection de 0,13 % au niveau national (95 foyers), répartis en 20 foyers en Flandres (0,05 %) et 75 en Wallonie (0,28 %). A titre de comparaison, ce taux de 0,28 % était celui de la Flandre en 1989. (Anonyme, 1992a).

Ces résultats témoignent de l'importance de cette maladie tant au niveau économique (pertes financières pour les éleveurs, restrictions dans les échanges internationaux des animaux et de leurs produits dérivés,...) qu'au niveau humain (dangers de contamination ,...). Tout ceci justifie donc les nombreux programmes de recherches développés à travers le monde en vue de l'éradication de cette affection.

Le risque d'infection humaine persistera tant que la maladie animale sera présente. Il est évident que toute une série de mesures d'hygiène doivent être prises par les personnes amenées à manipuler des animaux ou substances contaminés. De même, une grande prudence est requise lors de la consommation de produits laitiers frais.

Figure I.4 : Importance des hommes dans la lutte. (Limet et al. - CEB, 1991)



A ce jour, le problème du traitement n'est pas encore parfaitement résolu. Aucun protocole thérapeutique chez l'homme n'est totalement efficace (environ 15% de rechutes dans le meilleur des cas). Les antibiotiques utilisés dans le traitement (tétracycline, rifampicine et chloramphénicol) doivent être actifs sur les *Brucella* et pénétrer à l'intérieur des cellules de l'organisme, ces bactéries sont en effet des parasites intracellulaires **(annexe 3: protocole préconisé et action des différents antibiotiques)**. Mais, en dépit du succès appréciable de cette thérapeutique chez l'homme, elle est interdite chez les animaux (lois régissant le commerce du bétail), sauf éventuellement dans les troupeaux de haute valeur économique et est remplacée par des programmes d'éradication.

Ces programmes ont permis d'éliminer dans certains pays comme le Japon et la Scandinavie la maladie due à *B. abortus*. Mais, dans la plupart des pays, c'est loin d'être le cas et la brucellose cause des ravages énormes là où une prophylaxie stricte n'est pas appliquée (Afrique, Asie,...). Par conséquent, les responsables de chaque pays doivent prendre les mesures qui s'imposent en vue de l'éradication de la maladie sur leur territoire. Des programmes sont d'ailleurs établis par les grandes organisations internationales (FAO, OMS, CEE) pour tenter de coordonner les actions et donner une ligne de conduite à suivre. En Belgique, un réseau d'épidémio-surveillance très serré a été mis sur pied avec à sa disposition un laboratoire de diagnostic et de référence (I.N.R.V.), des sites provinciaux d'inspection, des plans d'action en cas d'urgence, la division du pays en trois territoires où des mesures particulières sont décrétées suivant les conditions (lutte zonale), l'octroi d'un statut sanitaire aux différents cheptels suite à la pratique de tests de dépistage fréquents. Le succès de tels programmes dépend bien sûr de leur acceptation par les premières personnes concernées, les éleveurs, les vétérinaires et les négociants **(figure I.4)**. Même si des indemnisations sont prévues par la CEE et le Ministère de l'Agriculture, l'abattage représente toujours pour l'exploitant une perte énorme qui sera difficilement comblée. (Berthot, 1985; FAO, 1986; Anonyme, 1988; Saegerman et al., 1991). Ainsi, en Belgique, quand les services d'inspection vétérinaire décrètent qu'un élevage est touché par la brucellose, les deux seules règles en application sont la quarantaine et l'abattage; elles sont sanctionnées par des Arrêtés Royaux, dont celui du 06 décembre 1978 qui prévoit que si la prévalence est inférieure à 2% tous les bovins d'un foyer de brucellose devront être abattus.

Devant ces conséquences dramatiques pour les éleveurs, disposer d'un diagnostic précoce, sensible, spécifique et facile à mettre en oeuvre est un élément indispensable pour une lutte épidémiologique efficace. Vu l'absence de symptômes

Tableau I.3 : Les différents vaccins anti-brucelliques

Vaccins	Caractéristiques	Applications	Utilisations	Restrictions
B. abortus B19	cellule vivante atténuée (phase S)	injection sous-cutanée *	bovins	1) pathogène pour l'homme 2) persistance des anticorps vaccinaux chez 1 à 2% des animaux
B. melitensis Rev1	cellule vivante atténuée (phase S); souche streptomycine dépendante	injection sous-cutanée	petits ruminants ovins caprins	1) virulence résiduelle (avortement si injection pendant la gestation) 2) persistance de la réponse en anticorps vaccinaux
B. suis souche 2	cellule vivante atténuée (phase S)	administration possible par voie orale dans l'eau de boisson	ovins caprins	1) virulence résiduelle plus faible 2) vaccination de rappels nécessaire
B. abortus souche 45/20	cellule tuée (phase R), inactivée par le formol et mélangée à un adjuvant huileux	voie sous-cutanée	bovins	faible protection
B. melitensis H38	cellule tuée adjuvantée	voie sous-cutanée	bovins ovins caprins	1) réactions sérologiques durables 2) réactions locales importantes au point d'inoculation

* Des essais d'injection de *B. abortus* B19 ont été réalisés par la voie conjonctivale, c'est-à-dire la voie naturelle d'infection (INRA; Limet, J.N.). Ceci a permis de montrer une diminution de la réponse anticorps post-vaccinale.

spécifiques et un développement insidieux de la maladie, il est très difficile de la mettre en évidence sur base du diagnostic clinique. Aussi, il existe une batterie de tests de dépistage: bactériologiques **(annexe 4)**, sérologiques **(annexe 5)** et allergiques **(annexe 6)**. Les premiers sont directs et mettent en évidence l'agent pathogène au niveau de l'organisme (sang, fluides corporels,.avortons et annexes foetales,...); les seconds sont indirects et s'intéressent aux anticorps spécifiques présents dans le sérum ou le lait.

Cependant, tous les tests actuels sont limitants:

- la discrimination entre la réponse sérologique post-vaccinale et la réponse sérologique provoquée par l'organisme infectieux n'est pas claire; ce qui complique la distinction animal vacciné-animal infecté.
- Des problèmes de réactions sérologiques atypiques se posent actuellement en Europe. Aucun des tests sérologiques disponibles n'est suffisamment spécifique pour permettre une distinction entre une brucellose et une infection croisée, par *Yersinia enterocolitica* O:9 par exemple.

La politique d'éradication (édictée par l'Organisation Mondiale de la Santé) prône une prophylaxie vaccinale dans les zones où la prévalence est supérieure à 2%, ce qui n'est plus le cas en Belgique. Elle consiste en une vaccination systématique de tous les animaux durant quelques années, suivi d'un arrêt de la vaccination et d'un remplacement par des mesures sanitaires strictes (diagnostic, abattage).

Trois types de vaccins ont été testés: les vaccins tués, les vaccins vivants, les vaccins acellulaires. Le **tableau I.3** reprend les différents vaccins anti-brucelliques.

Cependant, au même titre que le diagnostic, la vaccination pose problème:

1) A peine 60 à 70% des animaux vaccinés sont protégés contre l'avortement;
2) L'immunité induite par les souches vaccinales est proche de celle résultant de l'infection;
3) Suivant l'âge et la dose vaccinale, elle induit des sérologies vaccinales persistantes chez certains animaux;
4) La manipulation des vaccins représente un risque non négligeable de contamination pour l'homme.

Une possibilité de différencier les animaux infectés des animaux vaccinés est de détecter les anticorps spécifiques d'antigènes présents dans toutes les souches sauvages de *Brucella* et absents des souches vaccinales. Mais aucun des antigènes qui avaient été présentés comme intéressants n'offre toutes les garanties voulues en vue de son utilisation pour une discrimination animal infecté-animal vacciné.

Aujourd'hui, grâce au développement du génie génétique, on tend à développer des vaccins vivants manipulés qui devront induire une réponse clairement différentiable de la réponse infectieuse **(annexe 7: approches vaccinales envisagées)**.

Cette situation résume à elle seule la nécessité de mettre au point un vaccin et des tests de diagnostic compatibles. Les recherches actuelles vont dans cette voie et visent à:

- caractériser des antigènes protecteurs et analyser les mécanismes immunitaires de protection mis en jeu dans une infection par *Brucella*. Ces mécanismes restent encore assez mal connus, mais il est établi que les deux composantes immunitaires (humorale et cellulaire) interviennent.
- caractériser des antigènes différents des antigènes protecteurs, potentiellement utilisables pour le diagnostic et spécifiques des animaux infectés;
- étudier la structure et l'expression du génôme de *Brucella*.

I.4. LA BACTERIE

I.4.1. Caractères bactériologiques (Christie, 1980; Krieg et Holt,1984; Berche et al.,1989; Cloeckaert et al.,1992a).

1.4.1.1. Morphologie

Ce sont de petits coccobacilles de 0,5 à 0,7 µm de large et de 0,6 à 1,5 µm de long, Gram-négatifs.

Les espèces *B. abortus, B. melitensis, B. suis* et *B. neotomae* apparaissent normalement en phase lisse (S), alors que *B. canis* et *B. ovis* sont en phase rugueuse (R). L'observation en transillumination oblique fait apparaître les colonies rondes de type S, lisses avec une couleur de bleu à bleu-vert; elles ne prennent pas la coloration du cristal violet. Les colonies de type R apparaissent granuleuses et de couleur jaune; elles prennent la coloration du cristal violet. Cependant, les bactéries de type S peuvent se transformer lors des cultures en type R, amenant des changements de virulence et d'antigénicité.

I.4.1.2. Culture

La croissance des *Brucella* en culture est lente: les colonies apparaissent habituellement après 3 à 7 jours sur un milieu gélosé. Elles demandent de la biotine, de

Figure I.5 : Structure de l'érythritol. (Smith and Ficht, 1991)

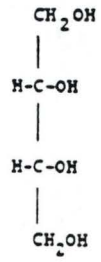


Tableau I.4 : Caractéristiques des espèces et biovars du genre *Brucella*. (Krieg and Holt,1984)

Species	Biovar	CO_2 for growth	H_2S produced	Growth on dyes[b] Thiomin A B C	Basic fuchsin A B C	Urea hydrolized	Lysis by[c] phage RTD	RTD × 10,000	Agglutination by monospecific antisera A	M	Growth on erythritol 1 mg/ml	2 mg/ml[d]	Thionine blue 1:500,000	Penicillin 5 U/ml
abortus	1	(+ −)[e]	+	− − −	+ + +	+ >1 h	+	+	+	−	+	+	+	+
(strain 19)	1	−	+	− − −	+ + +	+ >1 h	+	+	+	−	−	−	−	−
	2	(+ −)[e]	+	− − −	− − −	+ >1 h	+	+	+	−	+ −	+	−	−
	3	(+ −)[e]	+	+ + +	+ + +	+ >1 h	+	+	+	−	+	+	+	+
	4	(+ −)[e]	+	− − −	+ + +	+ >1 h	+	+	−	+	+	+	+	+
	5	−	−	− + +	+ + +	+ >1 h	+	+	−	+	+	+	+	+
	6	−	+ −	− + +	+ + +	+ >1 h	+	+	+	−	+	+	+	+
	7	−	+ −	− + +	+ + +	+ >1 h	+	+	+	+	+	+	+	+
	9	(+ −)[e]	+	− + +	+ + +	+ >1 h	+	+	−	+	+	+		
suis	1	−	+	+ + +	− − −	+ <30 min	—	(+ −)[e]	+	−	+	+	+ −	−
	2	−	+ −	− + +	− − −	+ <30 min	−	(+ −)[e]	+	−	+	+	−	−
	3	−	−	+ + +	− − +	+ <30 min	−	+ −	+	−	+	+	+	+ −
	4	−	−	+ + +	− − +	+ <30 min	−	+ −	+	+	+	+	−	−
	5	−	−	+ + +	− − −	+ <30 min	−	+	−	+				
melitensis	1	−	−	+ + +	+ + +	+ >1 h	−	−	−	+	+	+	+	+
	2	−	−	+ + +	+ + +	+ <30 min	−	−	+	−	+	+	+	+
	3	−	−	+ + +	+ + +	+ >1 h	−	−	+	+	+	+	+	+
neotomae		−	+	− − +	− − +	+ <30 min	−	+ −	+	−	+	+	+	−
canis		−	−	+ + +	− − ±	+ <30 min	−	−	−	−	+	+	+ −	−
ovis[f]		+	−	+ + +	+ + +	− >1 h	−	−	−	−	−	+	−	−

[a] Characteristics which currently serve as the basis for biotyping at the National Veterinary Services Laboratory.
[b] Concentration of dyes: A = 1:25,000, B = 1:50,000, C = 1:100,000.
[c] Tbilisi phage RTD: routine test dilution. See Alton et al.[6] for a description of this procedure.
[d] 5% serum added to medium.
[e] Positive is dominant characteristic, but negative strains occur.
[f] Requires added serum.

la thionine et du nicotinamide pour pousser. Ce sont des aérobies strictes qui sont en général cultivées à 37°C et qui ont certaines exigences vis-à-vis de la concentration en $C O_2$ (du moins quelques biovars de *B. abortus* et *B. ovis*)

I.4.1.3. Caractères biochimiques

Les *Brucella* présentent un métabolisme oxydatif. Elles possèdent toutes une catalase et, hormis quelques exceptions, elles sont uréase et oxydase positives. Elles semblent utiliser pour l'oxydation du glucose, la voie des pentoses phosphates (Robertson et Mc Cullough, 1981). Elles font également partie des rares bactéries pathogènes capables de métaboliser l'érythritol (Sperry et Robertson, 1984) **(Figure I.5)**. Elles sont aussi capables de réduire les nitrates en nitrites, sauf *B.ovis.*

I.4.1.4. Typage

La détermination des espèces et des biovars présente un intérêt épidémiologique. Ce typage est basé:

- sur des caractères biochimiques;
- sur l'agglutination avec les sérums spécifiques anti-A, anti-M [A et M étant 2 antigènes principaux (= épitopes du LPS-S) pour toutes les souches S de *Brucella*, mais présents en quantités différentes] et anti-R (anti-LPS-R);
- sur la sensibilité aux colorants (thionine, fuschine basique, méthyl-violet);
- sur la sensibilité à certains phages.

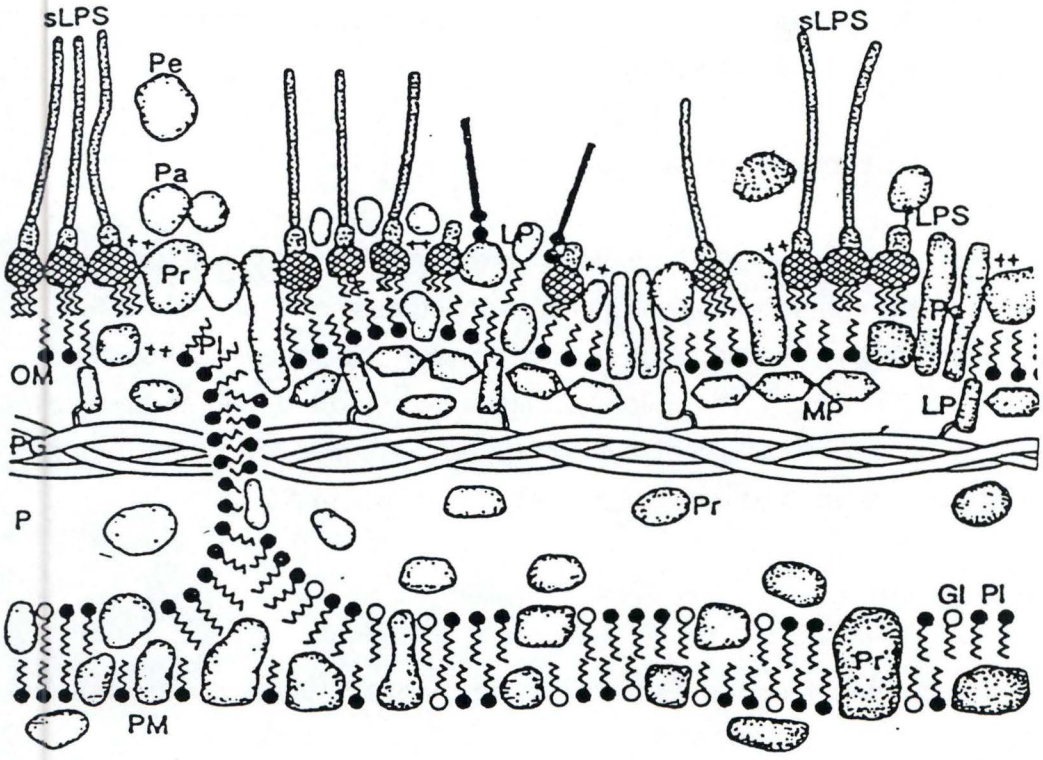
Le **tableau I.4** reprend les espèces et biovars actuellement reconnus. Il faut noter qu'on peut réaliser un typage moléculaire de *Brucella* avec des sondes d'ADN (Grimont et al.,1992).

I.4.2. Caractères génétiques

Toutes les études menées à ce jour établissent une relation génétique entre toutes les espèces du genre *Brucella*; ainsi, une homologie de l'ADN de plus de 90 % est signalée. Ceci semble confirmer l'hypothèse de Verger et al. qui propose de rassembler les différentes souches de *Brucella* en une seule espèce (Verger et al.,1985). De même, le contenu en G-C de l'ADN est de 56-58 % pour les différentes espèces.

La taille globale du génôme est plus faible que celle d' *Escherichia coli* (3,25. 10^6 paires de bases contre 4,7. 10^6 à *E.coli*) (Allardet-Servent et al.,1991). Michaux et ses

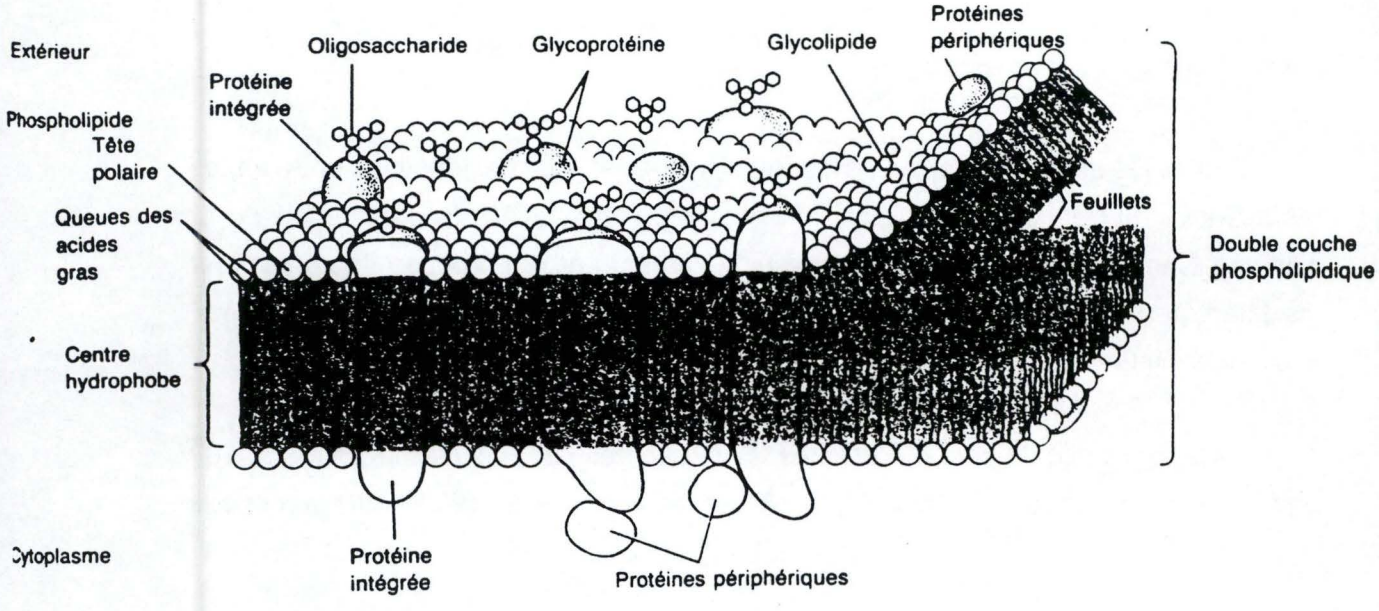
Figure I.6 : Caractéristiques de la paroi d'une bactérie Gram-négative.



OM : membrane externe
P : espace périplasmique
PM : membrane plasmique
Pl : phospholipides
sLPS : LPS en phase S
rLPS : LPS en phase R
PG : peptidoglycane
Pr : proteine
Gl : glycolipides
++ : cations divalents
LP : lipoprotéine
Po : porine
MP : protéine matricielle
Pa : protéine extrinsèque
Pe : protéine extracellulaire

Figure I.7 : Modèle général de la structure des membranes biologiques.

(Darnell et al.,1989)



collaborateurs ont montré que le génôme de l'espèce *B. melitensis* est constitué de deux réplicons indépendants d'environ 2100 et 1150 kb (Michaux et al., 1993). De plus, une séquence d'ADN répétée a été décrite, le nombre de copies répétées est très différent entre *B. abortus* et *B. ovis* (Halling and Zehn, 1990).

I.4.3. Ultrastructure

I.4.3.1. Le cytoplasme

Il se présente comme une masse homogène, parsemée de nombreux ribosomes. Plusieurs gènes ont été clonés, permettant d'identifier quelques protéines cytoplasmique; deux protéines de choc thermique (protéine produite par un microorganisme en condition de stress, induisant sans doute un caractère adaptatif), GroEl (57,5 kDa) et GroES (10 kDa) (Lin et al.,1992) et une protéine de 39 kDa (Vo Thi Kim Oanh et Limet, J., communication). On peut également noter qu'une autre protéine a été caractérisée : une phosphomonoestérase de 120 kDa (Saha et al., 1990).

I.4.3.2. La paroi bactérienne

La paroi des *Brucella,* comme celle des autres bactéries Gram-négatives, **(annexe 8 : comparaison Gram+-Gram-)** est formée d'une membrane externe, d'une couche dense ou peptidoglycane (PG), d'un espace périplasmique et d'une membrane cytoplasmique **(Figure I.6)** (Cummins, 1990).

L'étude de la paroi des *Brucella* a été retardée assez longtemps, car elle présente des différences morphologiques et biochimiques avec la paroi des Entérobactéries:

- Le peptidoglycane est fortement associé à la membrane externe (Dubray,1976).
- Elles ne forment pas de sphéroplastes dans les conditions standards déstabilisantes pour la paroi (Tris-EDTA-lysosyme) (Moriyon et Berman, 1982).
- Les détergents non ioniques sont moins efficaces pour extraire les protéines de la membrane externe de la paroi de *Brucella* (Dubray et Bézard, 1982; Nielsen et Duncan, 1990; Martin et Hancock,1990).

I.4.3.3. La membrane cytoplasmique

Elle présente l'aspect typique de toutes les membranes. **(figure I.7).**

Figure I.8 : Structure du peptidoglycane

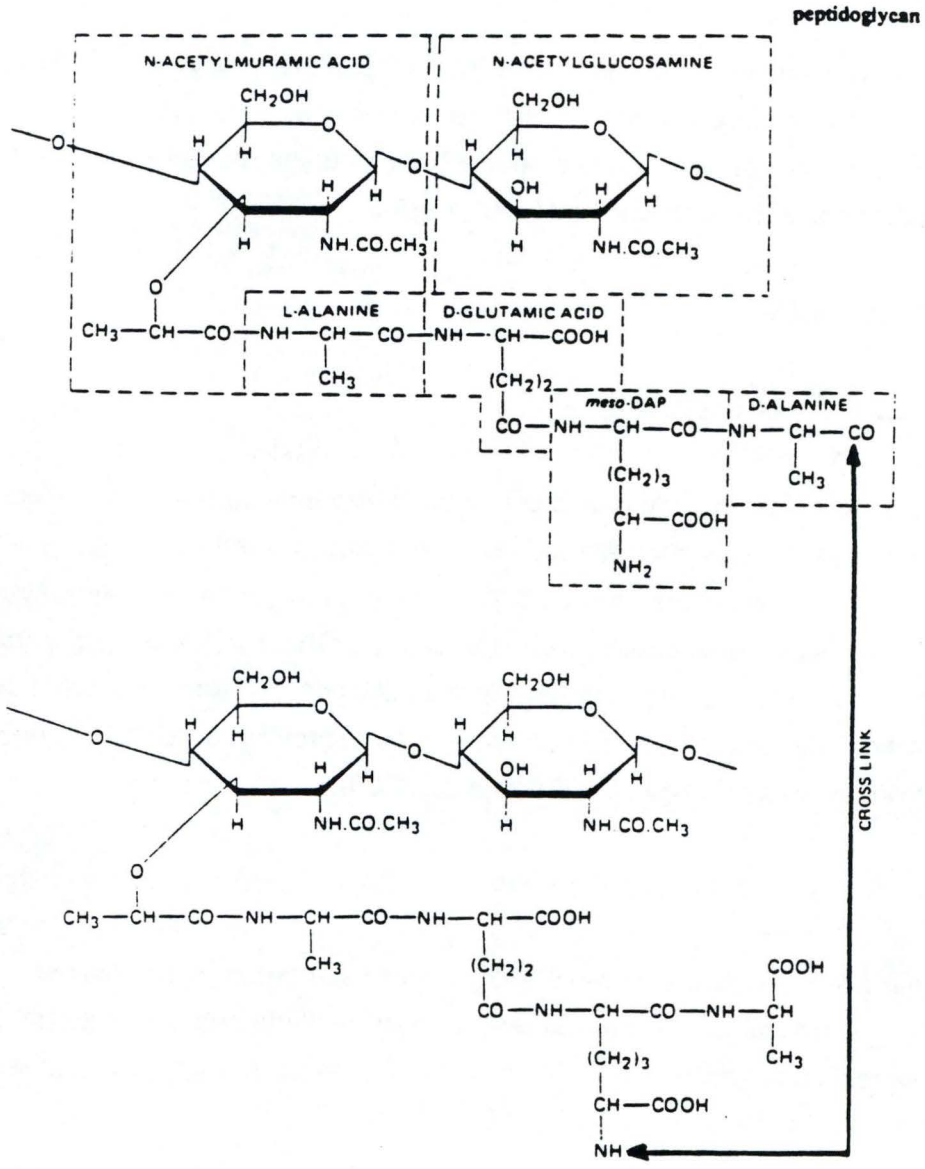
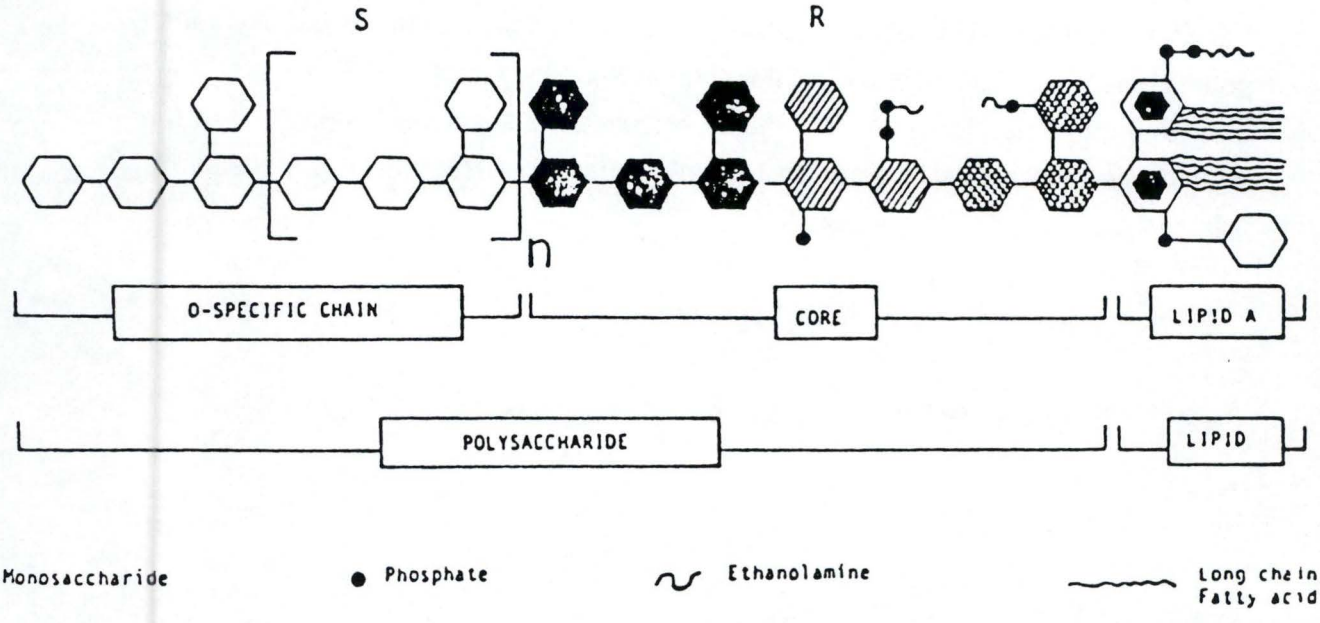


Figure I.9 : Structure du LPS.



I.4.3.4. L'espace périplasmique

Cet espace se caractérise par la présence d'enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation de la paroi lors de la division, dans la transformation des nutriments, leur transfert et d'autres fonctions encore (Krieg et Holt, 1984).

Deux protéines périplasmiques ont été identifiées: une protéine de 31 kDa dont la fonction reste inconnue, (Halling et al., 1991) et une Cu-Zn superoxyde dismutase de 20 kDa (Beck et al.,1990; Bricker et al.,1990). Ces 2 gènes sont clonés.

I.4.3.5. Le peptidoglycane

Il constitue le squelette de la bactérie en lui assurant sa forme et sa rigidité. Il est formé de filaments polysaccharidiques, composés de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétyl muramique. Ces filaments sont unis entre eux par des liens tétrapeptidiques composés d'un enchaînement de L-alanine, d'acide D-glutamique, d'acide méso-diaminopimélique et de D-alanine **(Figure I.8)**. On peut noter que chez *E. coli* une lipoprotéine associée au peptidoglycane a été très étudiée, c'est la lipoprotéine de Braun. Elle intervient dans la variation de la forme de la bactérie (Braun and Rehn, 1969; Braun,1975). Contrairement à la lipoprotéine de Braun, la lipoprotéine équivalente de *Brucella* est en partie exposée à la surface de la bactérie (Gomez-Miguel and Moriyon, 1986; Gomez-Miguel et al., 1987)

I.4.3.6. La membrane externe

Lipopolysaccharides, phospholipides et protéines sont les constituants majeurs de la membrane externe.

Le lipopolysaccharide (LPS) (Cherwonogrodsky et al.,1990; Perry and Bundle, 1990).

Il se compose de trois parties : le lipide A, le core et la chaîne O.
Les souches de *Brucella* peuvent être qualifiées de lisses "Smooth" (S) ou rugueuses "Rough" (R) selon la structure de leur LPS **(Figure I.9)**. Les bactéries dites en phase S sont pourvues de la chaîne O, les bactéries en phase R en sont dépourvues.

Figure I.10 : Structures chimiques des chaînes O des souches A>M (A) et M>A (B). (Dubray, 1981)

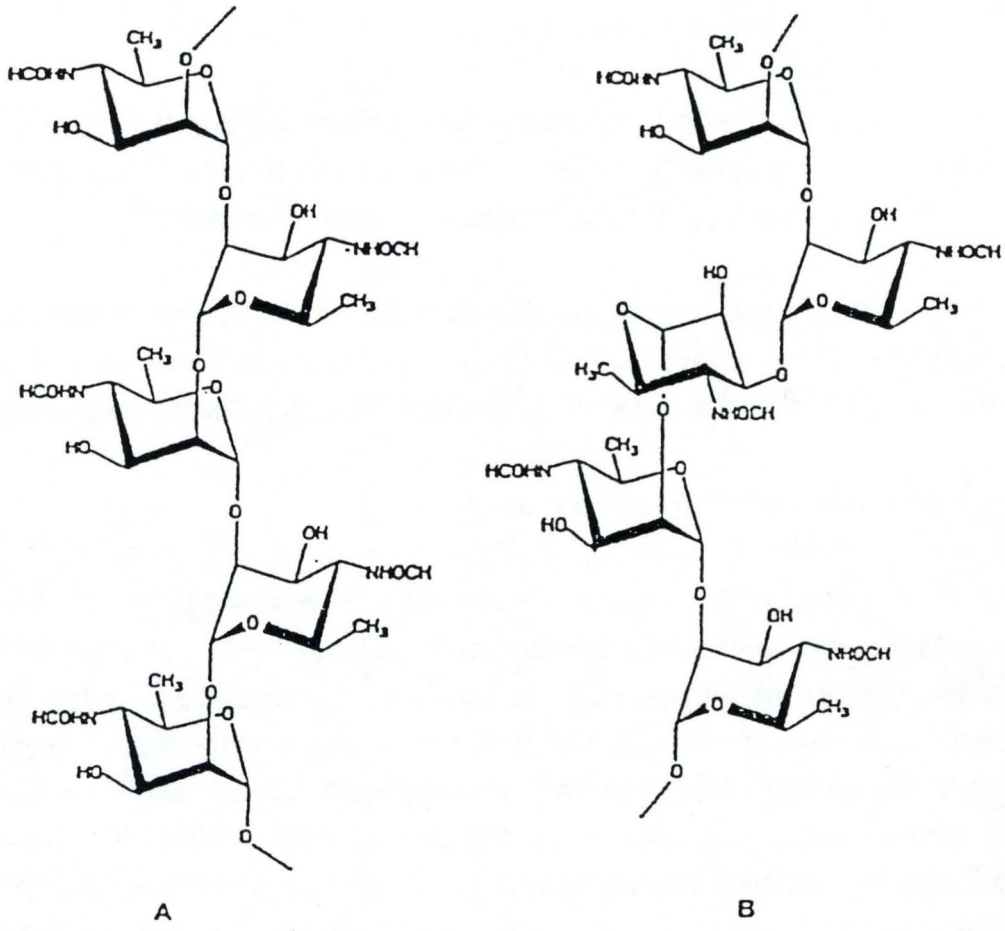
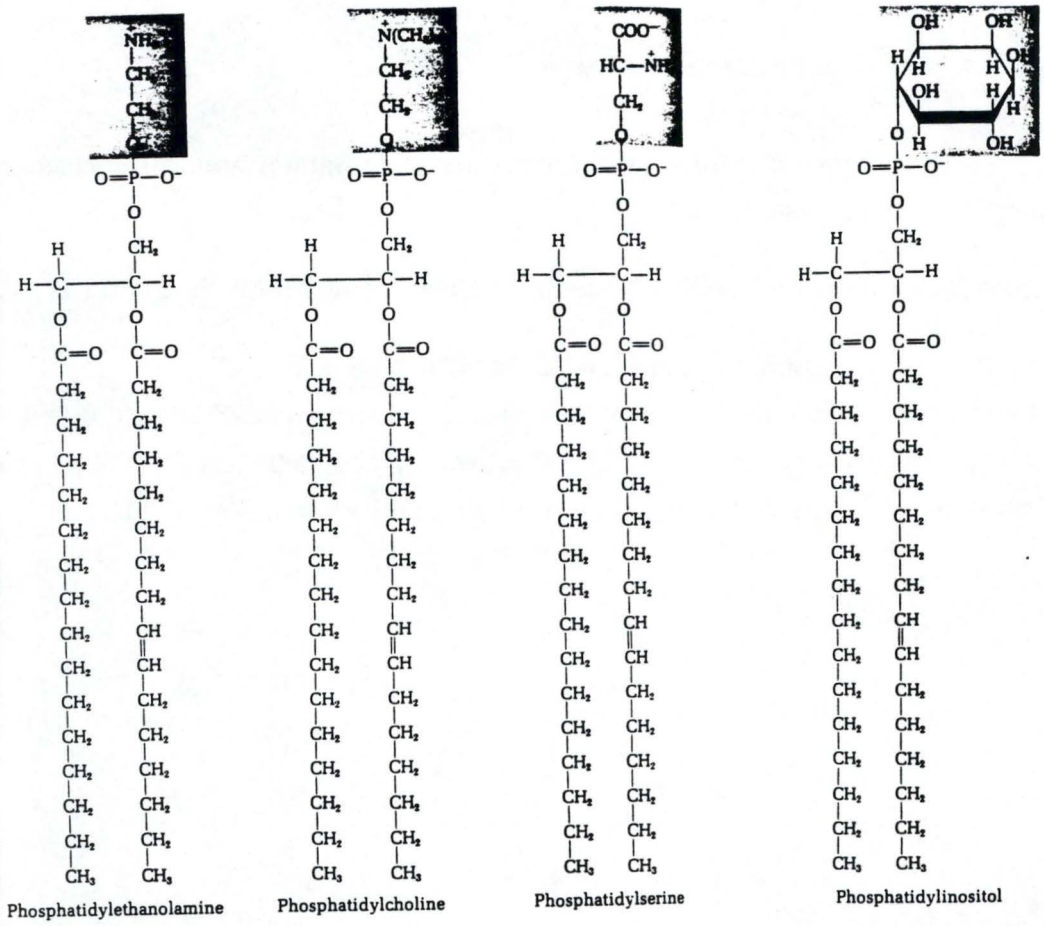


Figure I.11 : Structure des phospholipides de la membrane.



Le lipide A , glycolipide enchâssé dans la membrane et conférant la toxicité au LPS, a une structure bien conservée au sein des bactéries Gram-négatives. Celui de *Brucella* diffère significativement de celui d'*E. coli* par la présence des acides palmitique (C16), stéarique (C18) et 27-hydroxy-octacosanique au lieu des acides laurique, myristique et b-hydroxymyristique (Moreno et al.,1981). Il contient de la glucosamine et du diaminoglucose, ce qui suggère que ce lipide A est de type mixte dans le genre *Brucella* (Moreno et al.,1987).

Le core est constitué de D-glucose, D-mannose, et de 2-amino-2,6-didésoxy-D-glucose (quinovosamine) (Moreno et al.,1976). Le 2-céto-3-désoxyoctonate (KDO) relie le core au lipide A.

La chaîne O portant les antigènes A et M détermine la spécificité antigénique. La proportion de ceux-ci varie au sein des différents biovars : A>M (A^+M^-) chez *B. abortus* et *B. suis*, M>A (A^-M^+) chez *B.melitensis* (Garin-Bastuji et al.,1990). Mais, avec des sérums mono-spécifiques anti-A et d'autres anti-M, des spécificités A>M et M>A ont été retrouvées aussi bien chez *B. abortus* que chez *B. melitensis* **(Figure I.10)**. (Cherwonogrodsky,1987). Cette structure présente certains épitopes communs avec d'autres espèces bactériennes, ce qui engendre des réactions croisées en sérologie, nous y reviendrons dans l'annexe diagnostic. Il faut aussi noter la description de plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes A, M ou contre des épitopes communs (C) (Limet et al.,1987; Limet et al.,1989).

Les phospholipides.

Phosphatidyléthanolamine, phosphatidylcholine et cardiolipine sont les phospholipides majeurs retrouvés dans les membranes externe et interne **(Figure I.11)**. Mais, la membrane externe est plus riche en phosphatidylcholine et possède moins de cardiolipine (Gamazo and Moriyon,1987). Les membranes des Entérobactéries sont par contre majoritairement composées de phosphatidyléthanolamine (Moriyon,1987).

Tableau I.5 : Synopsis des protéines de la membrane externe de *Brucella* au cours des 10 dernières années. (Adams, 1990)

Author	group 1	band I group 2	band II group 3	band III low MW
Dubray '80		37k*	25k*	15k*
Verstreate '82	94k	43,* 41k*	30k*	
Moriyon '82	88k	38k	30k	
Moriyon '83	88k	38k*		
Dubray '83	94k	43k, 38,* 37,* 36k*	31,* 27,* 26,* 25k*	
Douglass '84		37-42k*	26k*	
Santos '84	94-88k*	39-35k*	31-25k*	
Verstreate '84	94-88k*	40-38*	30-25*	
Gómez-Miguel '86				8k*§
Mayfield '88			31k†	
Ficht '88		36k		

*released from protein-peptidoglycan sacculi by lysozyme
§tryptic fragment
†salt extracted, most likely periplasmic

Les protéines de la membrane externe (OMPs) (Sowa,1990).

Elles peuvent être extraites par Zwittergent ou SDS sans utilisation de lysozyme à partir de bactéries non inactivées avant l'extraction, ou par utilisation de lysozyme à partir de bactéries inactivées par le formol ou la chaleur.

Le **Tableau I.5** présente succintement les recherches menées sur les OMPs ces dernières années. Ces protéines de *Brucella* ont ainsi pu être classées en plusieurs groupes, qui montrent des masses moléculaires de 88-94 kDa (groupe 1), 36-43 kDa (groupe 2) et 25-31 kDa (groupe 3). Trois protéines majeures de 25-27 kDa, 36-38 kDa et 43 kDa ont été identifiées après solubilisation des membranes de *B.abortus* dans le SDS et élution des protéines après SDS-PAGE (Dubray and Charriaut,1983). La caractérisation des gènes révèle que l'OMP 36 (groupe 2) est une porine et que l'OMP 25 (groupe 3) serait l'équivalent de l'OmpA d'*Escherichia coli*.

Les protéines dites mineures (10-, 16,5-, 19-, 31-34- et 89- kDa) ont été individualisées au moyen d' anticorps monoclonaux (Cloeckaert et al.,1990). L'étude du gène de l'OMP 89 est toujours en cours; mais il semble que un ou plusieurs de ses épitopes ne soient pas spécifiques de *Brucella* spp.
A l'aide d'AcMo, une banque génomique de *B. abortus* **(annexe 9 : construction d'une banque génomique)** a été criblée **(annexe 10)** et les gènes de 3 protéines mineures, les OMPs de 19-, 16.5- et 10-kDa ont été isolés. Le séquençage des gènes a alors été réalisé selon la méthode de Sanger. Les résultats du séquençage sont donnés aux pages suivantes.
Sur base de la séquence nucléotidique, une phase ouverte de lecture (ORF = open reading frame, la partie du gène qui code effectivement pour la protéine) a été localisée sur chaque gène et la séquence en acides aminés de la protéine correspondante a été déduite. La séquence nucléotidique a également permis l'élaboration de la stratégie d'expression de ces protéines dans *E. coli* en vue d'une production en grande quantité. La surexpression et la purification des protéines recombinantes ont été réalisées par n.v. Innogenetics (Ghent).

Des comparaisons de séquences ont alors été réalisées dans les banques de données en biologie moléculaire qui constituent la mémoire des données produites dans les laboratoires.

Séquence de l'OMP 19

La séquence nucléotidique est représentée à la ligne supérieure et la ligne inférieure représente la séquence en acides aminés déduite. Le peptide signal est souligné dans la séquence en acides aminés. La séquence consensus, caractéristique d'une lipoprotéine est encadrée et le résidu cystéine, siège du processing des lipoprotéines est indiqué en gras.

ATG AGA AAT GCG CAA ATG GAG AAC CTG ATG GGA ATT TCA AAA GCA AGT CTG
met arg asn ala gln met glu asn leu met gly ile ser lys ala ser leu

CTC AGC CTC GCG GCG GCT GGC ATT GTC CTG GCC GGG TGC CAG AGC TCC CGG
leu ser leu ala ala ala gly ile val leu ala gly **cys** gln ser ser arg

CTT GGT AAT CTC GAT AAT GTT TCG CCT CCG CCG CCG CCT GCA CCG GTC AAT
leu gly asn leu asp asn val ser pro pro pro pro pro ala pro val asn

GCT GTT CCG GCA GGC ACG GTG CAG AAA GGC AAT CTT GAT TCT CCC ACA CAA
ala val pro ala gly thr val gln lys gly asn leu asp ser pro thr gln

TTC CCC AAT GCG CCC TCC ACG GAT ATG AGC GCG CAA TCC GGC ACA CAG GTC
phe pro asn ala pro ser thr asp met ser ala gln ser gly thr gln val

GCA AGC CTG CCG CCT GCA TCC GCA CCG GAC CTG ACG CCC GGC GCC GTG GCT
ala ser leu pro pro ala ser ala pro asp leu thr pro gly ala val ala

GGC GTC TGG AAC GCC TCG CTT GGT GGT CAG AGC TGC AAG ATC GCG ACG CCG
gly val trp asn ala ser leu gly gly gln ser cys lys ile ala thr pro

CAG ACC AAA TAT GGC CAG GGC TAT CGC GCA GGC CCG CTG CGC TGC CCC GGT
gln thr lys tyr gly gln gly tyr arg ala gly pro leu arg cys pro gly

GAA CTG GCT AAT CTT GCC TCC TGG GCC GTC AAT GGC AAG CAA CTC GTC CTT
glu leu ala asn leu ala ser trp ala val asn gly lys gln leu val leu

TAC GAT GCG AAC GGC GGT ACG GTT GCC TCG CTC TAT TCT TCA GGA CAG GGC
tyr asp ala asn gly gly thr val ala ser leu tyr ser ser gly gln gly

CGC TTC GAT GGC CAG ACC ACC GGC GGG CAG GCC GTG ACG CTG TCG CGC TGA
arg phe asp gly gln thr thr gly gly gln ala val thr leu ser arg OPA

Séquence de l'OMP 16.5

La séquence nucléotidique est représentée à la ligne supérieure et la ligne inférieure représente la séquence en acides aminés déduite. Le peptide signal est souligné dans la séquence en acides aminés. La séquence consensus, caractéristique d'une lipoprotéine est encadrée et le résidu cystéine, siège du processing des lipoprotéines est inscrit en gras.

```
ATG CGC CGT ATC CAG TCG ATT GCA CGT AGC CCG ATC GCT ATT GCG CTT TTC
Met arg arg ile gln ser ile ala arg ser pro ile ala ile ala leu phe

ATG TCG CTC GCC GTT GCC GGC TGT GCG TCA AAG AAG AAC CTT CCG AAT AAT
met ser leu ala val ala gly cys ala ser lys lys asn leu pro asn asn

GCC GGT GAT CTG GGT CTC GGT GCA GGC GCT GCA ACG CCG GGC TCC TCG CAG
ala gly asp leu gly leu gly ala gly ala ala thr pro gly ser ser gln

GAC TTC ACC GTT AAT GTC GGC GAC CGC ATC TTC TTC GAT CTC GAT TCG TCG
asp phe thr val asn val gly asp arg ile phe phe asp leu asp ser ser

CTG ATC CGC GCC GAT GCG CAG CAG ACG CTT TCC AAG CAG GCC CAG TGG TTG
leu ile arg ala asp ala gln gln thr leu ser lys gln ala gln trp leu

CAG CGT TAT CCG CAG TAT TCG ATC ACG ATC GAA GGC CAT GCC GAC GAG CGC
gln arg tyr pro gln tyr ser ile thr ile glu gly his ala asp glu arg

GGC ACG CGT GAG TAC AAC CTC GCC CTT GGC CAG CGC CGT GCT GCC GCC ACC
gly thr arg glu tyr asn leu ala leu gly gln arg arg ala ala ala thr

CGC GAC TTC CTC GCT TCG CGC GGT GTG CCG ACC AAC CGC ATG CGC ACC ATT
arg asp phe leu ala ser arg gly val pro thr asn arg met arg thr ile

TCC TAC GGT AAT GAG CGC CCG GTT GCC GTC TGC GAT GCC GAC ACA TGC TGG
ser tyr gly asn glu arg pro val ala val cys asp ala asp thr cys trp

TCG CAG AAC CGT CGC GCC GTC ACC GTT CTC AAC GGG GCC GGA CGG TAA
ser gln asn arg arg ala val thr val leu asn gly ala gly arg OCH
```

Séquence de l'OMP 10

La séquence nucléotidique est représentée à la ligne supérieure et la ligne inférieure représente la séquence en acides aminés déduite. Le peptide signal est souligné dans la séquence en acides aminés. La séquence consensus , caractéristique d'une lipoprotéine est encadrée et le résidu cysteine, siège du processing de la prolipoprotéine est inscrit en gras.

ATG GAG AGC ATG GAC ATG AAA CGC TTC CGC ATC GTT GCC CCC CTC GCA CTC
Met glu ser met asp met lys arg phe arg ile val ala pro leu ala leu

ATG TCG CTT GCG CTG GCT GCT TGC GAA ACA ACA GGC CCG GGC AGC GGC AAT
met ser leu ala leu ala ala **cys** glu thr thr gly pro gly ser gly asn

GCC CCG ATC ATA GCC CAT ACC CCT GCC GGC ATA GAA GGA AGC TGG GTC GAT
ala pro ile ile ala his thr pro ala gly ile glu gly ser trp val asp

CCG AAT GGC ATC GCT TCC TCA TTC AAT GGC GGC ATC TTT GAA ACC CGC ACC
pro asn gly ile ala ser ser phe asn gly gly ile phe glu thr arg thr

ACC GAC ACC AAC GAA AAG CTG GCG GAG GGC AAC TAT CTC TAC CTG TCG CCG
thr asp thr asn glu lys leu ala glu gly asn tyr leu tyr leu ser pro

CAA CTC GTT GAA ATC AAC ATG CGG TCC ATC GTG CGC GGC ACC ACC TCG AAG
gln leu val glu ile asn met arg ser ile val arg gly thr thr ser lys

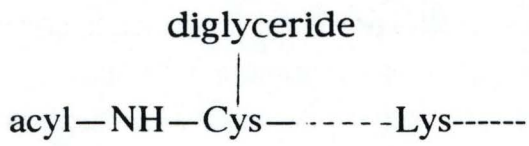
GTA AAT TGC GCA CTG GTT TCG CCG ACG CAA CTT AAC TGC ACC TCC TCG GCC
val asn cys ala leu val ser pro thr gln leu asn cys thr ser ser ala

GGT TCG CGC TTC TCG CTC ACC CGC CGC AAC GCC GGC TGA
gly ser arg phe ser leu thr arg arg asn ala gly OPA

La recherche dans ce cas a été menée dans les Banques de Séquences Swiss-Prot, GenBank et EMBL. Les logiciels utilisés étaient Fast A et TFast A (GCG: Genetic Computer Group Software Package).
Pour les OMP-10 et -19, aucune similarité significative aves les séquences contenues dans la banque n'a pu être montrée. Par contre, trois protéines montrent une similarité importante avec l'OMP 16.5. Ces protéines sont des précurseurs de lipoprotéines fortement associées au peptidoglycane: PAL (Peptidoglycan associated lipoprotein); l'une d'*Haemophilus influenzae*, l'autre d'*Escherichia coli* et la troisième de *Legionella pneumophila*. Cette observation de l'association au peptidoglycane a été possible par fractionnement de ces bactéries, mais la fonction de ces PALs n'est pas connue.

De plus, une recherche de motifs protéiques caractéristiques a également été réalisée avec le logiciel Motifs de GCG pour ces 3 OMPs. L'analyse des 3 séquences montre la présence dans chacune d'elle d'un tétrapeptide consensus, caractéristique du site de modification et de maturation des lipoprotéines bactériennes. De plus, nous pouvons signaler que ces 3 OMPs sont exposées en surface de *Brucella*. Ainsi, l'exposition en surface de ces OMPs a pu être montrée avec utilisation d'anticorps monoclonaux, à l'aide de la microscopie électronique (détection immunologique à l'or colloïdal) et du test ELISA, utilisant les *Brucella* entières comme antigènes de coating. Nous reviendrons au motif de cette séquence et aux lipoprotéines en général au point suivant.

Figure I.12 : Représentation schématique d'une lipoprotéine



II. Les lipoprotéines de la membrane externe (ME)

Comme décrit précédemment, il semble que les trois protéines de la membrane externe de *Brucella* soient des lipoprotéines. Ainsi, dans la suite, nous allons nous intéresser principalement aux lipoprotéines des bactéries Gram-négatives en général.

II.1 CARACTERISTIQUES DES LIPOPROTEINES

(Wu and Tokunaga, 1986; Hayashi and Wu, 1990; Pugsley, 1993)

La modification des lipoprotéines représente la voie de maturation majeure des protéines excrétées par les bactéries. Toutes les lipoprotéines sécrétées sont probablement modifiées de la même manière que la lipoprotéine archétype, c'est-à-dire la lipoprotéine de Braun chez *E. coli* (lipoprotéine la plus abondante, liée au peptidoglycane et jouant un rôle dans la structure de la paroi) (Braun et Rehn, 1969). Son étude a permis de mieux comprendre la biogenèse des lipoprotéines chez les bactéries, étant entendu que ce n'est pas la seule protéine de membrane liée de manière covalente à un lipide. Les lipoprotéines procaryotes se caractérisent par un diacylglycéride lié à un thiol, un groupe monoacyl lié à l'amine de la cystéine, qui devient le résidu amino-terminal après le clivage du peptide signal par la peptidase signal II (ou LspA). **(figure I.12)**

La voie de maturation des lipoprotéines est conservée parmi les différents groupes de bactéries; beaucoup ont été identifiées chez *E. coli* et chez d'autres bactéries Gram-négatives, mais aussi chez certaines bactéries Gram-positives.

Cette voie de synthèse est absente chez les eucaryotes. Ainsi, une dichotomie existe entre les lipoprotéines eucaryotes et procaryotes au vu des structures des parties lipidiques et de leur site de liaison à la chaîne peptidique. En effet, dans les cellules eucaryotes, les protéines sont modifiées par N-myristoylation de la glycine N-terminale par la N-myristoyl transférase, enzyme essentielle pour la levure (Towler et al., 1987; Duronio et al., 1989); par O- ou S-acylation des protéines de membranes (le palmitate étant attaché à la thréonine/sérine ou à la cystéine) (Magee et Schlesinger, 1982); par attachement du glycophospholipide préformé à la partie C-terminale des

Figure I.13 : Représentation schématique du peptide-signal des lipoprotéines. (Pugsley, 1993)

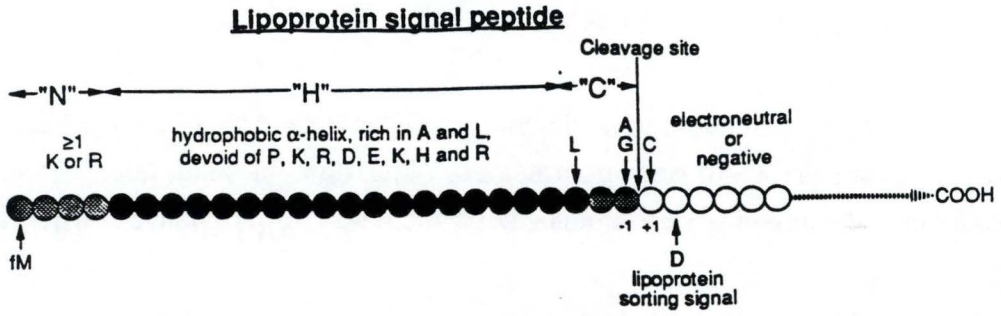
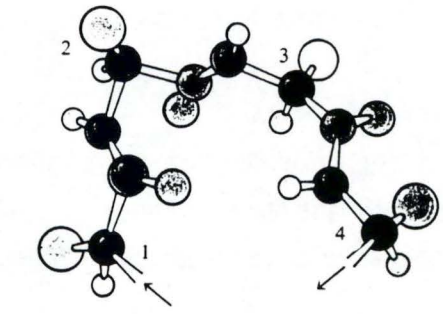


Figure I.14 : Schéma d'une structure ß turn.

Les flèches indiquent le sens de la chaîne peptidique.
Il faut noter que 3 voire 4 acides aminés sont impliqués dans cette structure.



Carbone α
Carbone
Hydrogène
Azote
Oxygène
Chaîne latérale

protéines de membrane par une transpeptidase (Ferguson and Williams, 1988) ou par attachement d'une partie farnésyl au groupement SH de la cystéine à la séquence C-terminale via un lien thioéther (Anderegg et al., 1988). Chez les procaryotes, la modification des protéines de la membrane avec le diacylglycérol se réalise via un lien thioéther à la cystéine et avec le palmitate par un lien amide unique.

Une des avancées les plus importantes dans la compréhension des mécanismes de biogenèse des lipoprotéines procaryotes a été l'identification d'une forme précurseur de la lipoprotéine, la prolipoprotéine. A l'extrémité NH_2-terminale, elle contient un bras de 20 résidus supplémentaires, le peptide-signal, reconnu comme l'élément permettant de passer la membrane cytoplasmique.

Sur base de comparaison d'un grand nombre de lipoprotéines, les caractéristiques essentielles d'un peptide-signal ont été définies:

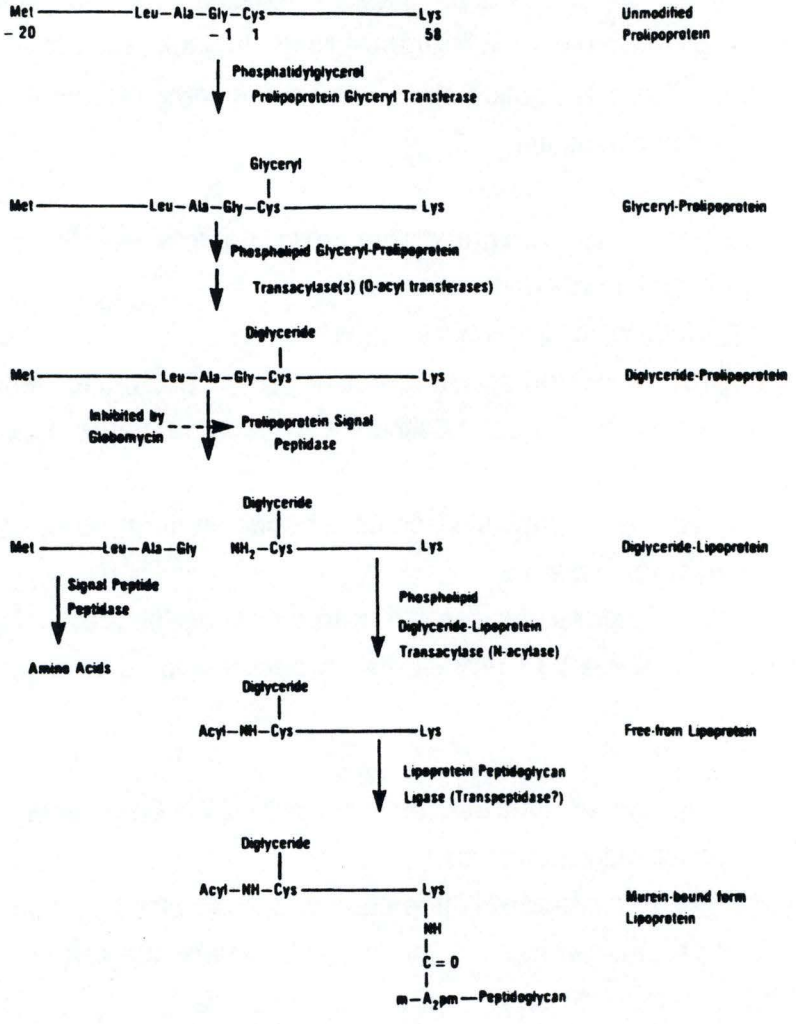
- Il est exclusivement localisé à l'extrémité NH_2-terminale.
- Il contient une longue région hydrophobe (domaine H), qui est habituellement précédé par un ou plusieurs résidus chargés positivement dans une courte région hydrophile (domaine N).
- Une région apolaire carboxy-terminale (région C) spécifie le site de clivage entre le peptide signal et la protéine mature.

Le peptide-signal semble posséder ces structures caractéristiques chez toutes les bactéries étudiées. La **figure I.13** représente un peptide-signal caractéristique d'une lipoprotéine.

Des études comparatives avec des nonlipoprotéines ont également permis à leurs auteurs de tirer les conclusions suivantes :

- Le peptide-signal des précurseurs de lipoprotéines semble être plus court (16 résidus environ contre 18,1), plus hydrophobe et plus volumineux que celui de précurseurs nonlipoprotéiques. Cette différence pourrait refléter la topologie différente des peptidases signal (SPase); SPase I pour les précurseurs des nonlipoprotéines et SPase II pour les lipoprotéines.
- Les précurseurs des lipoprotéines semblent posséder une structure secondaire ß turn immédiatement après le site de clivage aux positions +2 et +3 **(Figure I.14)**.
- La différence importante entre ces deux classes de protéines exportées se situe au niveau du site de clivage par la peptidase signal; une région apolaire avec la séquence (Leu, Val, Ile)-(Ala, Ser, Thr, Gly)-(Gly,Ala)-Cys [séquence consensus Leu-Ala (Ser)-Gly (Ala)-Cys basée sur l'analyse de peptide signal de plus de 90

Figure I.15 : Voie de biosynthèse de la lipoprotéine muréique chez *E.coli* (lipoprotéine de Braun). (Wu and Tokunaga, 1986)



précurseurs de lipoprotéines], qui définit un site de clivage entre Gly et Cys et de modification de la cystéine (diglycéride-cystéine), alors que de petits résidus neutres aux positions -3 et -2 définissent le site de clivage des précurseurs nonlipoprotéiques (von Heijne, 1989).

Mais, le peptide-signal des lipoprotéines ne diffèrent pas uniquement par le résidu cystéine. En effet, si ce résidu est remplacé par un autre, cela n'entraîne pourtant pas un clivage efficace par la SPase I.

II.2. BIOSYNTHESE DES LIPOPROTEINES

Des études *in vitro* et *in vivo* chez *E. coli* ont permis de définir la voie de synthèse des lipoprotéines pour la lipoprotéine de Braun **(Figure I.15)**. Nous pouvons rappeler qu'une lipoprotéine homologue existe chez *Brucella* (Gomez-Miguel and Moryion, 1986).

La protéine est d'abord synthétisée sous la forme d'une prolipoprotéine qui subit d'importantes modifications avant d'être transloquée vers la ME. Ainsi, le développement d'un système *in vitro* pour la modification et la maturation des prolipoprotéines dans *E. coli* a permis de montrer qu'au moins 4 activités enzymatiques interviennent dans la maturation des lipoprotéines (Tokunaga et al., 1982) :

- glycéryl transférase
- O-acyl transférase
- peptidase signal II (SPase II)
- N-acyl transférase

La découverte de la globomycine, antibiotique produit par 4 espèces de l'actinomycète *Streptomyces* représente un pas majeur dans les études biochimiques de la maturation des lipoprotéines. Elle fournit la preuve qu'au moins 2 peptidases signal distinctes existent chez *E. coli*, Spase I et SPase II, pour les précurseurs des nonlipoprotéines et des lipoprotéines, respectivement. En effet, la globomycine inhibe spécifiquement la SPase II (Wu et al., 1982).

La SPase II est une protéine de la membrane cytoplasmique qui clive seulement les précurseurs protéiques modifiés contenant un résidu cystéine immédiatement après le site de clivage. En outre, le résidu cystéine doit être converti en diacylglycérylcystéine avant que le clivage ne se produise. Ainsi, la situation avec les prolipoprotéines est assez complexe, car elles sont processées par la SPase II seulement après avoir été

Figure I.16 : Topologie proposée pour la SPase II. (Hayashi and Wu, 1990)

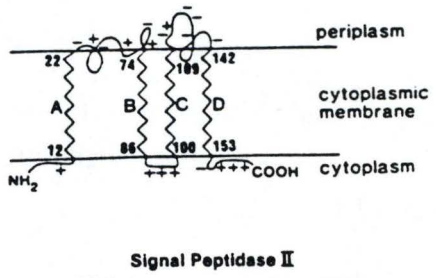


Figure I.17 : Translocation des protéines chez les bactéries. (Pugsley, 1993)

La voie de synthèse de base et ses ramifications sont indiquées par des flèches. Les protéines sécrétées (totalement extracellulaires) suivent la voie montrée par les flèches noires et ombrées; les protéines exportées (extracytoplasmiques mais non extracellulaires) suivent les voies indiquées par les flèches plus claires. La figure ne montre pas comment les protéines traversent la membrane avant d'atteindre leur site cible.

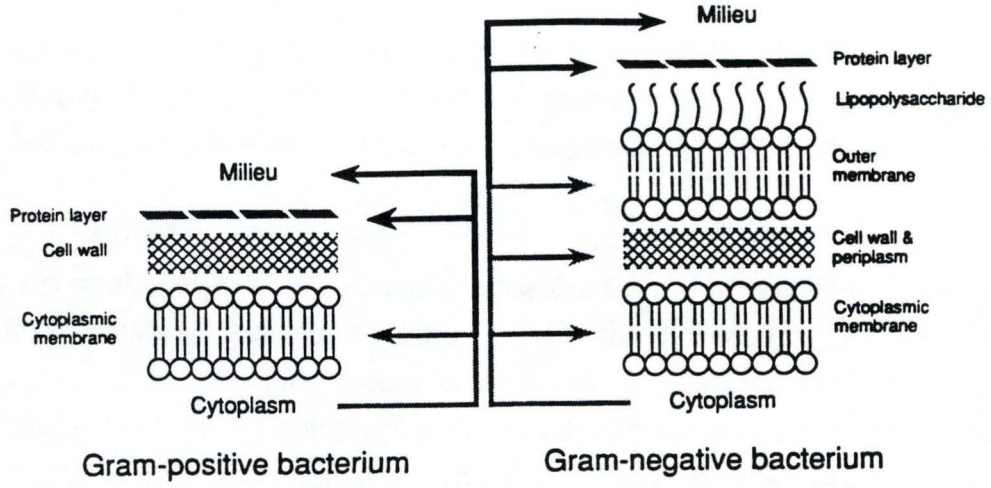
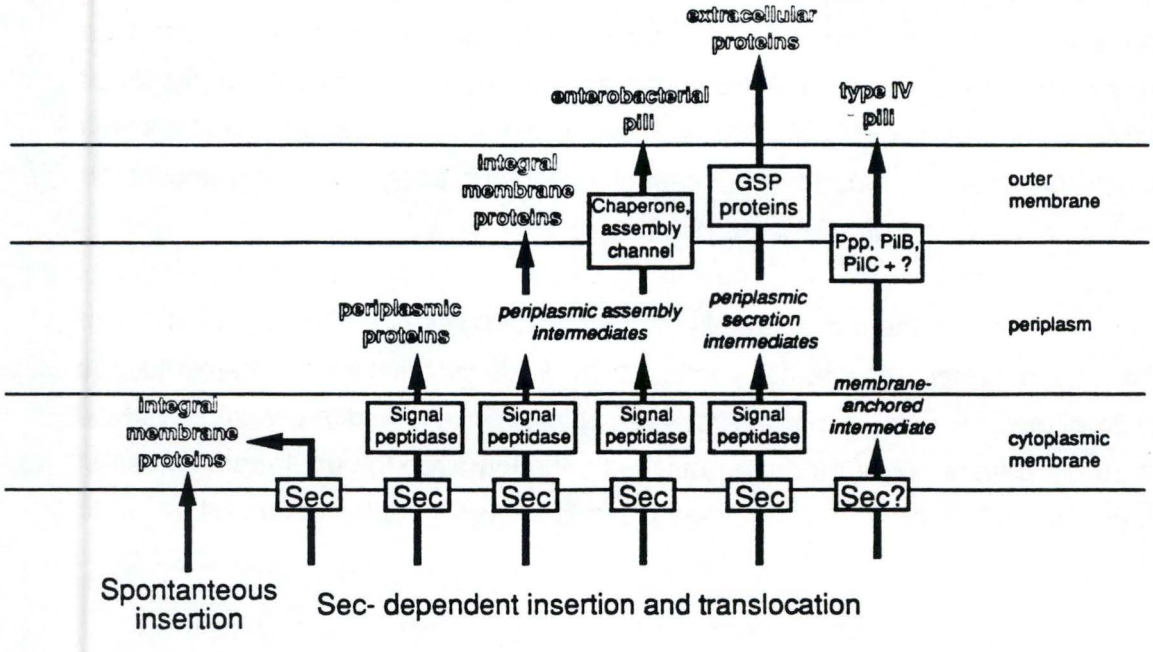


Figure I.18 : Principales branches du GSP chez les bactéries Gram-négatives. (Pugsley, 1993)

Les sites où les protéines s'accumulent à la fin de ces voies sont montrés par des caractères en relief. Les étapes interméfiaires sont montrées en italique, et les protéines impliquées dans leur exportation et dans leur tri sont encadrées. Sec indique les protéines qui sont codées par les gènes *sec* et qui sont nécessaires aux étapes initiales du GSP.



modifiées par la glycéryltransférase, ceci implique que les deux enzymes soient associées. Elle a été caractérisée dans un système *in vitro* utilisant une prolipoprotéine comme substrat (Tokunaga et al., 1984).

Le gène de cette SPase II a été cloné et séquencé. La topologie proposée pour la SPase II est exposée à la **figure I.16**. Cette enzyme se localise dans la membrane interne et la séquence en acides aminés déduite présente un caractère hydrophobe très marqué. Ce modèle présente 4 domaines majeurs hydrophobes (A-D), possédant une conformation en feuillet ß et qui sont les 4 segments transmembranaires; ses extrémités amino- et carboxy-terminales se trouvant dans le cytoplasme.

II.3. LA VOIE DE SECRETION

(Pugsley, 1993)

Environ 20% des polypeptides synthétisés par les bactéries sont localisés partiellement ou complètement en dehors du cytoplasme; or celui-ci est le siège de la synthèse des protéines. La plupart des protéines atteignent leur destination finale via la voie générale de sécrétion (GSP).
Chez les bactéries Gram-positives, les protéines totalement transloquées sont libérées dans le milieu extérieur; alors que dans les bactéries Gram-négatives, elles sont libérées dans le périplasme ou sont intégrées ou transportées à travers la membrane externe **(figure I.17)** par une des branches du GSP **(Figure I.18)**.

II.3.1. Translocation à travers la membrane cytoplasmique

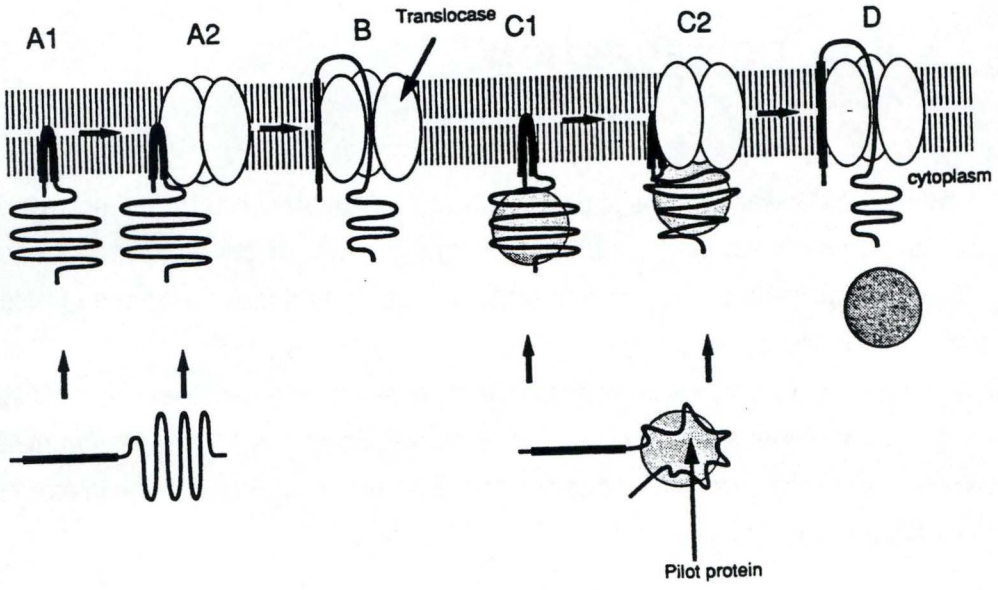
(Pugsley, 1993)

Toutes les protéines sécrétées ont un peptide-signal, dont la fonction première est de les diriger vers la membrane cytoplasmique, cette séquence signal étant clivée par une peptidase signal. Plusieurs gènes codant pour des protéines aux fonctions essentielles pour la sécrétion protéique en général, ont été identifiés.
On peut citer les protéines Sec (pour Sécrétoire) :

- La protéine SecA est cytosolique, mais on la retrouve aussi associée à la membrane cytoplasmique. Elle semble essentielle pour la viabilité; elle pourrait intéragir avec les protéines à sécréter quand elles émergent des ribosomes. Elle interviendrait dans la translocation en hydrolysant l'ATP, générant ainsi l'énergie nécessaire pour les premières étapes de l'insertion membranaire du précurseur protéique. Différentes études suggèrent mais ne prouvent pas que SecA se lie au

Figure I.19 : Modèles pour l'ancrage dépendant du récepteur et l'insertion des précurseurs protéiques, portant le peptide-signal, dans la membrane cytoplasmique à des sites de translocation spécifiques. (Pugsley, 1993)

Le modèle sur la gauche (A ou B) montre l'insertion spontanée (A1) d'un peptide-signal tournant (ligne en gras), qui diffuse dans le plan de la membrane jusqu'à ce qu'il rencontre son récepteur dans la translocase (A1 et A2) ou qui se lie directement à un récepteur de la translocase (A2), lequel peut alors s'ouvrir latéralement pour engloutir le domaine d'initiation de l'exportation (B). Dans le modèle de droite (C et D), une protéine pilote liée à la forme mature de la protéine sécrétée se lie à un récepteur spécifique dans la translocase (C1 ou C2) et peut alors faciliter un contact direct entre le peptide-signal et son récepteur avant ou après l'insertion dans la phase lipidique de la membrane (D).



peptide signal. Elle est présentée comme une ATPase sécrétoire, peut-être peut-on aussi la considérer comme une protéine pilote (=protéine impliquée dans le ciblage des précurseurs protéiques aux sites de translocation de la membrane cytoplasmique). La question reste ouverte.

- La protéine SecB est une protéine du cytosol; c'est probablement un tétramère, qui fait partie d'un complexe protéique qui se lie spécifiquement aux protéines sécrétées. SecB est considéré comme une protéine chaperone qui stabilise les précurseurs protéiques dans une conformation compatible avec la translocation. Des expériences menées par l'équipe de Watanabe semblent montrer, par mutation de SecB, que la plupart des lipoprotéines chez les bactéries sont dépendantes de la protéine SecB pour leur exportation (Watanabe et al., 1988). En effet, il est très important pour l'exportation des protéines que les premières étapes du repliement protéique soient retardées afin de permettre le passage de la membrane cytoplasmique.
- Les protéines intégrales de membrane Sec : SecY, Sec E, Sec D et SecF. Ces protéines sont vues comme composant la translocase en s'associant en complexe.

L'exportation des protéines exige bien sûr de l'énergie. L'hydrolyse de l'ATP par SecA induirait les premières étapes d'insertion et de translocation et la PMF (force motrice fournie par les protons) achèverait ce processus. La PMF influencerait également le diamètre du canal de translocation.

Quelles sont les hypothèses concernant le mécanisme de translocation ? Il est probable que les événements initiaux dans la sécrétion protéique soient communs pour les lipoprotéines et les nonlipoprotéines (Wu and Tokunaga, 1986).

Chez les eucaryotes, les protéines destinées à être exportées se distinguent seulement par leur peptide-signal; chaque lieu de destination ayant un ou plusieurs récepteurs qui reconnaissent spécifiquement le peptide-signal ou une protéine pilote liée à lui. Par contre, chez les procaryotes, cette diversité des membranes cibles potentielles et les récepteurs des protéines pilotes ne sont pas nécessaires, à condition que le peptide-signal s'insère spontanément dans la membrane cytoplasmique au niveau des sites de translocation. L'intéraction entre le peptide-signal et les lipides membranaires pourraient initier l'exportation des protéines. En réalité, l'idée proposée est que le peptide-signal interagit avec les protéines de translocation (SecE ou SecY) à l'interface avec les lipides membranaires. Les protéines pilotes liées ailleurs sur la protéine pourraient assurer un contact entre la protéine et la translocase, avant ou après l'insertion du peptide-signal dans la bicouche lipidique **(figure I.19)**. Des études ont montré que le peptide-signal se

Figure I.20 : Insertion du peptide-signal avec l'orientation dépendante de la charge (Pugsley, 1993)

Le peptide-signal a normalement une extrémité N-terminale avec un résidu chargé positivement (+) et s'insère dans une orientation "tail-first", probablement à cause d'intéractions électrostatiques avec les groupements des phospholipides chargés négativement. Un renversement de la distribution des charges aux extrémités du peptide le convertit en un signal d'insertion, causant une insertion "head-first".

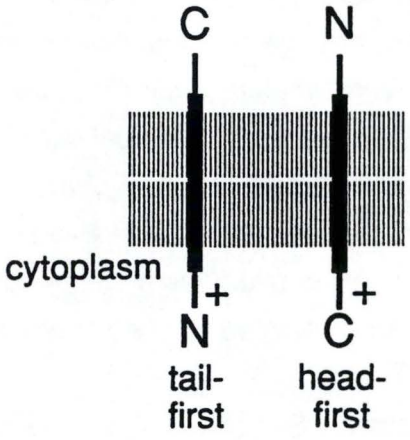
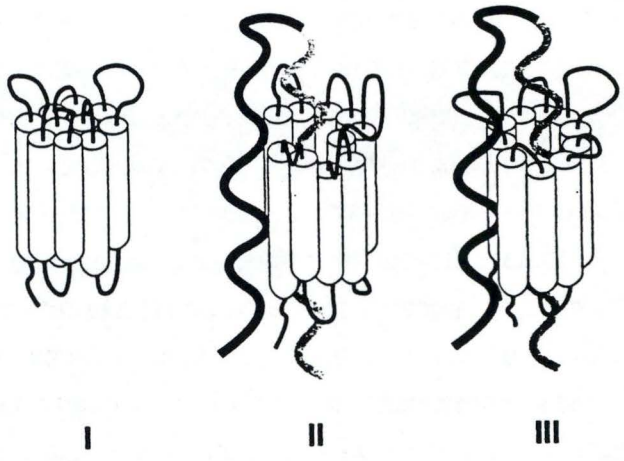


Figure I.21 : Représentation schématique d'un modèle montrant l'ouverture latérale du canal de translocation , induite par le peptide-signal du côté périplasmique de la membrane cytoplasmique (Pugsley, 1993)

Le canal aplati est représenté comme composé d'un polypeptide unique qui traverse la membrane via 10 segments hydrophobes antiparallèles (tonneaux) reliés par des boucles hydrophiles (lignes). Dans un état fermé, le canal qui est perpendiculaire à la membrane est obstrué parce que les segments transmembranaires sont emmêlés ensemble (I). Le contact avec un peptide-signal (ligne épaisse) ou avec un domaine d'initiation à l'exportation (ligne ombrée) induit une ouverture latérale du canal permettant l'entrée du reste de la protéine alors que l'entrée des phospholipides est bloquée (II). L'ouverture latérale se ferme alors sous la forme d'un canal avec le domaine d'initiation à l'exportation dans sa lumière (III).



fixe dans la membrane avec une orientation "tail-first" **(figure I.20)**. On imagine mal comment le reste de la protéine (qui n'est pas hydrophobe) traverse la membrane en étant en contact avec les lipides. Actuellement, on croit que les protéines peuvent traverser la membrane cytoplasmique bactérienne via un canal spécifique, formé par une ou plusieurs protéines Sec de membrane. Un parallèle a été établi avec les perméases de la membrane cytoplasmique bactérienne qui permettent le passage de solutés d'un côté à l'autre de la membrane. Pour expliquer comment les protéines sécrétées ont accès à l'intérieur de la translocase, Simon et Blobel (1992) proposent que le canal s'ouvre latéralement pour permettre l'exportation des protéines. Cependant, il doit aussi exister un mécanisme de régulation de l'ouverture du canal sans quoi les solutés quitteraient la bactérie constamment. La **figure I.21** représente schématiquement l'événement. Les protéines seraient ainsi complètement protégées du contact avec l'environnement hydrophobe de la bicouche lipidique; ceci réduirait fortement les coûts énergétiques nécessaires à un tel passage.

Des études de fractionnement et de microscopie électronique suggèrent que la translocation se produit à un nombre limité d'endroits de la membrane cytoplasmique qui contiendraient une translocase préassemblée. Ils pourraient correspondre à des régions de contact avec la membrane externe. L'existence de tels sites est controversée.
(Wu and Tokunaga, 1986; Hayashi and Wu, 1990; Pugsley, 1993).

II.3.2. Destination surface

La question la plus intéressante est de savoir comment les lipoprotéines atteignent leur destination finale. Dans les bactéries Gram-positives, elles sont certainement dans le feuillet externe de la membrane cytoplasmique, où beaucoup jouent les mêmes fonctions que les protéines périplasmiques diffusant librement chez les bactéries Gram-négatives. Les lipoprotéines peuvent s'insérer à un des 3 sites distincts des membranes de bactéries Gram-négatives: feuillet périplasmique de la membrane cytoplasmique, feuillet périplasmique de la membrane externe et feuillet externe de la membrane externe **(Figure I.22)**.

Les expériences majeures sur le processing des lipoprotéines viennent du groupe de Inouye, qui note qu'une lipoprotéine de la membrane cytoplasmique chez *E. coli* a un résidu aspartate à la position +2, immédiatement après le résidu cystéine, alors que la plupart des lipoprotéines de la membrane externe ont d'autres acides aminés à cette position. Ainsi, pour établir une corrélation entre l'absence du résidu Asp au site +2 et

Figure I.22 : Topologies possibles des lipoprotéines chez les bactéries Gram-positives et les bactéries Gram-négatives. (Pugsley, 1993)

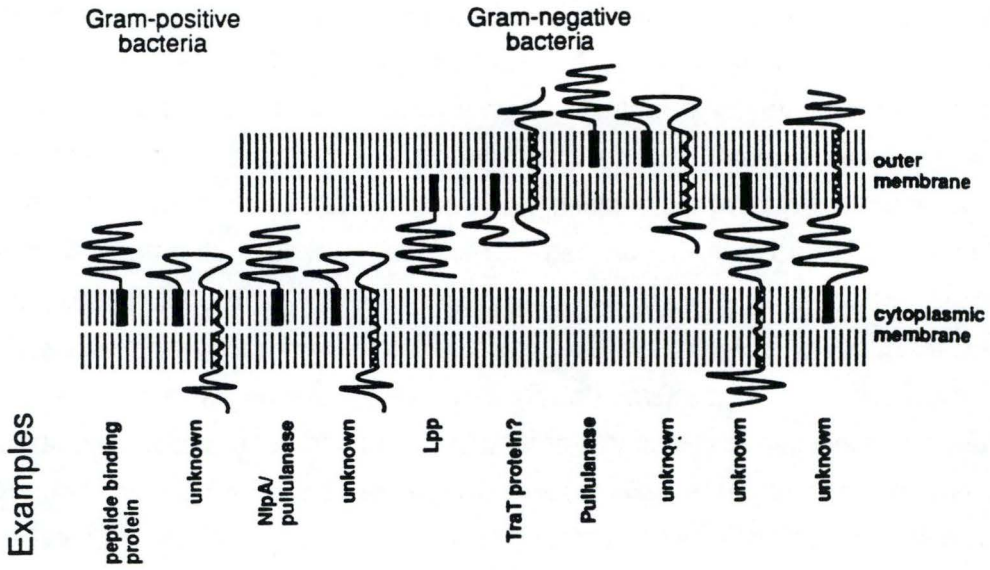


Figure I.23 : Mécanismes possibles du tri des lipoprotéines déterminé par Asp2 dans l'enveloppe cellulaire des bactéries Gram-négatives.(Pugsley, 1993)

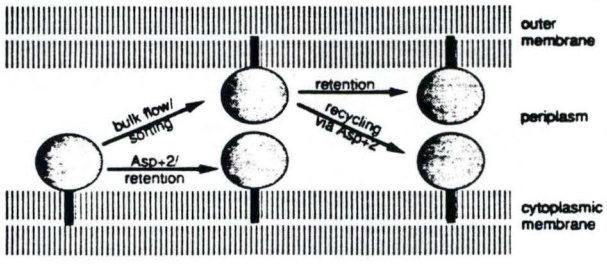
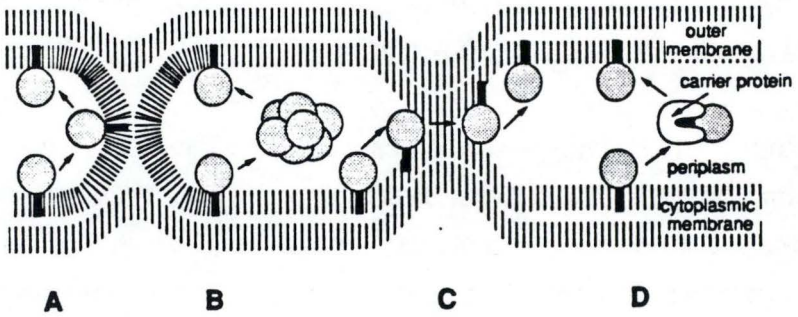


Figure I.24 : Voies possibles pour le tri des lipoprotéines de la ME des bactéries Gram-négatives. (Pugsley, 1993)



l'association à la membrane externe, des études de lipoprotéines hybrides ont été menées avec mutation de l'Asp au site +2 **(Figure I.23)**. Ceci a permis aux auteurs de suggérer qu'un signal de tri des lipoprotéines pourrait activement les diriger vers la ME ou les empêcher de retourner à la membrane cytoplasmique. Alternativement, le signal du tri (aspartate) peut conduire à ce que les lipoprotéines restent ancrées à la membrane cytoplasmique au lieu de rejoindre le flux de lipoprotéines allant vers la membrane externe. Ce modèle pour le tri des protéines implique l'existence d'un transporteur hypothétique qui reconnaîtrait le signal de rétention/ tri. Chez les 3 OMPs de *Brucella* qui feront l'objet de ce travail, on ne retrouve pas ce résidu aspartate en position +2. Le signal du tri pourrait aussi faire partie du domaine de reconnaissance des acyl-transférases; auquel cas, les lipoprotéines avec l'Asp en position +2 seraient modifiées différemment des autres lipoprotéines.

Le transport des lipoprotéines de la membrane interne vers la membrane externe pose des problèmes mécaniques. Les acides gras des lipoprotéines peuvent:

- rester emmêlés dans les lipides membranaires avec fusion des membranes externe et interne **(figure I.24 : A et C)**;
- être associés avec d'autres acides gras dans des micelles de lipoprotéines **(B)**;
- être protégés du périplasme aqueux par des protéines transporteuses **(D)**.

La taille des pores observés dans le réseau du peptidoglycane semble insuffisante pour permettre des points de fusion membranaire ou de passages de micelles (Pugsley, 1993).

Il faut noter que les protéines, indépendamment de leur destination finale, sont transloquées dans le périplasme, où elles adoptent leurs structures tertiaire et quaternaire (Pugsley, 1993).

La dernière étape menant à l'exposition en surface de la membrane externe de boucles peptidiques (épitopes spécifiques) des lipoprotéines pose encore de multiples questions. Plusieurs cas peuvent être envisagés quant à l'insertion des protéines dans la membrane externe:

- soit l'ancrage en membrane se réalise seulement par la portion lipidique, n'impliquant pas de zones transmembranaires de la protéine. La partie protéique flotte donc à la surface de la bactérie. Mais, cette hypothèse pose différentes questions: comment la tête lipidique arrive-t-elle à s'ancrer au niveau du feuillet externe de la membrane externe et comment le corps protéique non hydrophobe parvient-il à traverser la membrane ?

- soit l'ancrage en membrane par le lipide se produit avec en plus formation de segments transmembranaires amphipatiques de la protéine, comprenant des boucles externes qui forment des épitopes.

Devant cette question, plusieurs hypothèses peuvent être posées:

1) L'insertion nécessiterait une association au LPS (comme cela a été proposé pour les protéines intégrales de la membrane externe);
2) L'insertion demanderait un canal plus ou moins spécifique formé d'un complexe protéique (cela a été décrit pour la lipoprotéine pullulanase de *Klebsiella pneumoniae*);
3) Une autosécrétion peut aussi être envisagée: une partie de la protéine formerait un canal (tonneau avec feuillet ß) et l'autre partie traverserait ce canal et se trouverait exposée en surface (décrit pour l'IgA protéase de *Neisseria gonorrhea*).

II.4. FONCTIONS DES LIPOPROTEINES

La liste croissante des protéines modifiées par les lipides dans les procaryotes et les eucaryotes indique que les lipoprotéines comprennent un groupe diversifié de protéines, structurellement et fonctionnellement distinctes. Certaines sont des enzymes extracellulaires, jouant un rôle dans le métabolisme bactérien: ß-lactamases de *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*; pullulanases de *Klebsiella pneumoniae* et *K. aerogenes*; chitobiase de *Vibrio harverjii* et ß-1,4 endoglycanase de *Pseudomonas solanacearum.* Une lipoprotéine, MsmE semble être impliquée dans le transport du sucre (melibiose, raffinose et isomaltosaccharides) chez *Streptococcus mutans* (Sutcliffe et al., 1993). Il subsiste un grand nombre de lipoprotéines chez *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*,... dont la fonction reste inconnue.

Mais, beaucoup d'études montrent que les lipoprotéines exposées en membrane sont des antigènes majeurs de surface; et ils ont donc un rôle important dans la reconnaissance par le système immunitaire.

II.5. INTERACTIONS AVEC LE SYSTEME IMMUNITAIRE

Un nombre croissant d'antigènes bactériens sont classés parmi les lipoprotéines (LP's). Leur localisation dans l'enveloppe cellulaire les expose au système immunitaire de l'hôte. Toutefois, les caractéristiques immunitaires des LP's soulèvent la question suivante: la nature lipoprotéique de ces antigènes est-elle déterminante dans leur

intéraction avec le système immunitaire? Les quelques exemples qui suivent illustrent le répertoire des études sur les LP's bactériennes.

Les immunogènes majeurs de *Treponema pallidum* (agent de la syphilis) et de *Borrelia burgdorferi* (responsable de la maladie de Lyme) sont des LP's (Brandt et al., 1990; Chamberlain et al., 1990). En comparant les formes native et recombinante (non modifiée par des acides gras) d'une LP de 17 kDa, Akins et al. (1993) concluent que la modification lipidique de cet antigène de *T. pallidum* est essentielle à son pouvoir stimulant sur la production de TNFα par les macrophages. Les mêmes conclusions sont présentées pour une autre LP de 15 kDa ainsi que pour des LP's de *B. burgdorferi* (Margolis and Rosa, 1993; Brandt et al., 1990). Par contre, une LP de 47 kDa de *T. pallidum* obtenue sous une forme non acylée conserve son antigénicité vis-à-vis de sérums d'individus infectés (Weigel et al., 1992).
Des analogues lipopeptidiques reproduisant exactement la séquence N-terminale de ces LP's (15 et 17 kDa) possèdent l'activité immunomodulatrice des LP's natives. Cette activité est d'ailleurs conservée après protéolyse poussée. Cette observation amène les auteurs à penser que les LP's pourraient exercer leur activité biologique même après dégradation dans les cellules phagocytaires de l'hôte (Purcell et al., 1989).

Les LP's des mycobactéries sont des cibles importantes des réponses immunitaires de l'hôte. Les LP's de 19- et 30-kDa de *Mycobacterium tuberculosis* activent les lymphocytes T humains *in vitro* et stimulent la production d'anticorps chez des patients atteints de tuberculose. Deux autres LP's de cet organisme réagissent avec des sérums d'individus infectés et induisent une réaction d'hypersensibilité retardée chez des cobayes sensibilisés (Hirschfield et al., 1990; Booth et al., 1993; Nair et al., 1993). De même, la LP de 17 kDa de *Francisella tularensis* (TUL4) stimule les lymphocytes T *in vitro* et est reconnue par les anticorps sériques d'individus infectés (Sjöstedt et al., 1992). Des peptides synthétiques se chevauchant et recouvrant la totalité de la séquence protéique de TUL4 donnent lieu à une réponse plus faible que la protéine native. Les auteurs suggèrent que la portion lipidique pourrait être nécessaire à l'obtention d'une réponse T optimale (Sjöstedt et al., 1990).

L'utilisation des LP's de plusieurs microorganismes est souvent proposée comme outil diagnostic ou vaccinal. Plusieurs LP's d'*Haemophilus influenzae* ou d'*H. somnus* ont ainsi été étudiées. Les anticorps dirigés contre une LP de 16 kDa (16 PAL) ont des propriétés bactéricides et induisent une protection (Murphy et al., 1985). Green et al. en 1990 ont montré que du polysérum anti-16PAL recombinante (non acylée) possède ces

mêmes caractéristiques. Dans ce cas, le composant lipidique n'est pas nécessaire à l'immunogénicité de la protéine ni même à l'obtention d'anticorps biologiquement actifs.
En ce qui concerne les OMPs de *Brucella*, suite à l'infection avec des bactéries vivantes ou des *Brucella* entières tuées ou à l'immunisation de souris avec des parois de *Brucella*, des Ac Mo ont été obtenus contre 7 OMPs exposées à la surface externe. Parmi ces 7 protéines, on sait déjà que les protéines majeures (OMP 25 et OMP 36) ne sont pas des LP's. Par contre les données disponibles pour 3 des protéines mineures (présentées au paragraphe traitant des protéines de la membrane externe) suggèrent leur nature lipoprotéique. Ainsi, 3 antigènes sur 7 identifiés seraient des LP's. Cette proportion élevée de LP's est-elle le fruit du hasard ? Traduit-elle simplement l'abondance des LP's au sein des protéines d'enveloppe de *Brucella* ou trahit-elle le caractère immunogène de ces protéines conférée par leur portion lipidique ? La question reste ouverte.

Les conclusions semblent donc différentes en fonction de la protéine, du microorganisme ou de l'aspect de la réponse immunitaire étudié. Signalons par exemple que *T. pallidum,* chez qui les acides gras liés de façon covalente aux protéines sont au moins en partie responsables de la forte réponse immunitaire dirigée contre les LP's, ne possède pas de LPS (Purcell et al., 1989). A titre de comparaison, l'antigène dominant de *Brucella* en réponse humorale est précisément le LPS.

A côté de l'impact des lipoprotéines naturelles sur le système immunitaire, le couplage artificiel de groupements lipidiques à des protéines ou des peptides influence aussi la réponse immune. Ainsi, on a récemment montré que des lipopeptides synthétiques activaient *in vivo* des L_T cytotoxiques spécifiques du virus de l'influenzae (réponse cellulaire T restreinte aux molécules du CMH de classe I) (Green et al., 1987; Deich et al., 1988; Green et al., 1990). L'acylation des protéines a un effet d'adjuvant pour la réponse humorale. Elle peut aussi augmenter la capacité à induire une réponse d'HSR ou une protection face à une infection bactérienne (par *S. typhimurium* par exemple) (Nair et al., 1993).

Les mécanismes par lesquels la liaison de lipides aux protéines accroît les réponses de L_T et/ou de L_B à ces protéines restent obscurs.
Une hypothèse a pu être proposée suite aux nombreux travaux réalisés sur la LP de Braun (*E. coli*). Cette LP est un mitogène pour les lymphocytes B (L_B) de diverses espèces et elle stimule la différenciation des L_B au repos en plasmocytes sécréteurs d'Ig (d'une façon T indépendante). La portion N-terminale de la protéine contenant les 3

acides gras liés à 1 à 4 acides aminés conserve les capacités mitogéniques. Un analogue synthétique de cette portion (un tripalmitoyl pentapeptide) a une action égale ou supérieure à celle de la molécule native, la partie lipidique étant indispensable à l'activité du lipopeptide.
Les mécanismes moléculaires de l'activation lymphocytaire sont inconnus. Ils pourraient impliquer l'intéraction de la partie hydrophobe des LP's avec la membrane plasmique lymphocytaire, présentant la partie hydrophile à une protéine spécifique. La capacité des lipopeptides à activer spécifiquement une sous-population de L_B suggère l'existence de récepteurs spécifiques. Des preuves expérimentales ont été obtenues quant à l'existence de protéines réceptrices spécifiques des LP's. Sur base de son affinité pour le lipopeptide, une protéine ligand de 35 kDa a été isolée à partir de splénocytes murins (Biesert et al., 1987). D'autres études ont montré que les protéines liant les LP's impliquent aussi les structures du CMH. Le récepteur des LP's serait associé en membrane avec un système enzymatique assurant la transmission du signal du côté cytoplasmique de la membrane (Janson et al., 1992).

Le lipide pourrait aussi faciliter l'association de l'épitope peptidique avec les molécules du CMH des cellules présentatrices de l'antigène (ce qui a été décrit pour les L_T interagissant avec les molécules du CMH de classe II) (Sjöstedt et al., 1990).

En définitive, l'explication du mode d'action des LP's sera certainement importante pour comprendre les intéractions moléculaires entre les composants de la surface bactérienne et les cellules du système immunitaire ainsi que leur rôle dans l'évolution de l'infection bactérienne.

BUT du TRAVAIL

Notre travail ne vise pas une application diagnostique ou vaccinale directe, mais s'inscrit plutôt dans une approche fondamentale de l'étude de *Brucella*, bactérie Gram-négative responsable de la brucellose.

Des travaux antérieurs ont conduit à l'obtention d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de la paroi de *Brucella*. Ce mémoire sera centré sur l'étude de trois de ces antigènes, des protéines mineures de la membrane externe, les OMPs (Outer Membrane Proteins) de 10-, 16.5- et 19-kDa. Ces OMPs sont présentes dans toutes les espèces et biovars de *Brucella* et les épitopes détectés sont spécifiques.

Le criblage immunologique d'une banque génomique de *Brucella abortus* a mené au clonage des gènes des trois OMPs. Leur séquence nucléotidique a été déterminée. Sur base de leur séquence en acides aminés déduite (de la séquence d'ADN), on peut poser l'hypothèse suivante: ces trois OMPs seraient des lipoprotéines.

Nous tenterons de vérifier cette hypothèse à l'aide des outils à notre disposition: des anticorps monoclonaux et des clones d'*E. coli* recombinants qui expriment ces OMPs.

Dans un premier temps, nous allons vérifier si ces trois OMPs sont également exposées à la surface des *E. coli* recombinantes comme elles le sont chez *Brucella*, par deux techniques: la microscopie électronique et le test ELISA.

Ensuite, nous nous attacherons à déterminer la nature lipoprotéique de ces trois OMPs par différentes approches:

1) Extraction et partition de phase en présence de Triton X-114;
2) Test de l'effet de la globomycine, un antibiotique décrit comme un inhibiteur spécifique de la peptidase signal II, qui intervient dans la maturation des lipoprotéines;
3) Marquage métabolique des protéines avec de l'acide palmitique tritié dans les *E. coli* recombinantes et les *Brucella*; suivi d'une radioimmunoprécipitation avec des Ac Mo dirigés contre ces 3 OMPs.

MATERIEL et METHODES

Figure III.25 : Représentation schématique d'une bactérie *E. coli*, souche XL1-blue

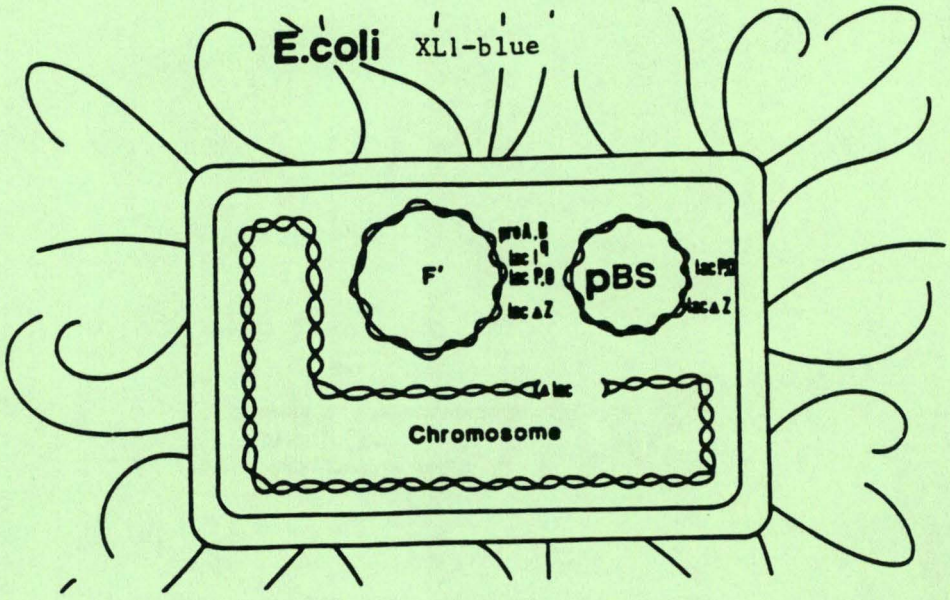
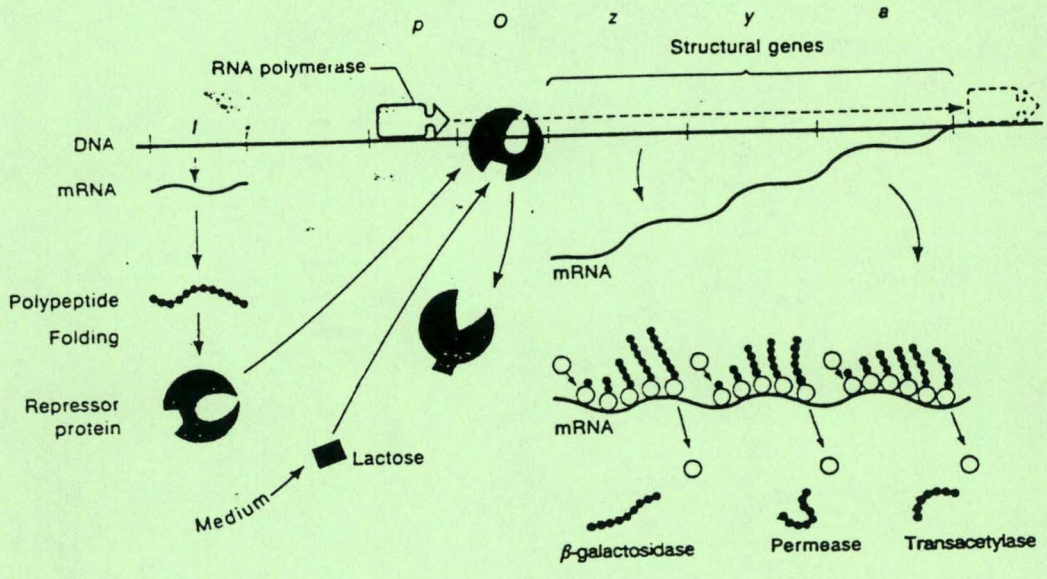


Figure III.26 : Schéma de la régulation de l'opéron lactose

Le gène I exprime constitutivement le répresseur qui s'attache à la région O (opérateur) en empêchant l'ARN polymérase, liée au promoteur P, de transcrire les gènes adjacents. L'inducteur (lactose ou IPTG) se fixe au répresseur et change sa conformation, de telle sorte qu'il ne puisse plus se lier au site O. L'ARN polymérase est alors capable de transcrire les gènes Z, Y et A; les trois enzymes sont alors produites. (Suzuki et al., 1989).



I. Matériel

I.1. SOUCHES BACTERIENNES

I.1.1. Souches d'Escherichia coli (Maniatis et al., 1989)

La souche XL1-blue a été utilisée **(figure III.25)**. Son génotype est le suivant:

rec A1 réduit au millième le taux de recombinaison entre l'ADN exogène et l'ADN endogène;

end A1 entraîne une diminution du taux d'endonucléases, réduisant les risques de dégradation lors de l'extraction d'ADN plasmidique;

gyr A96 est une mutation affectant la sous-unité A de l'ADN gyrase;

thi-1, ces mutants requièrent de la vitamine B1 dans le milieu de culture;

hsd R-17, mutation dans les gènes codant pour des endonucléases de restriction. L'absence de cette activité facilite le maintien d' ADN exogène;

sup E44 est un suppresseur de la mutation ambre;

rel A1 permet la synthèse d'ARN en absence de synthèse protéique;

Δlac, délétion de l'opéron lactose qui rend la bactérie incapable de métaboliser le lactose.

L'épisome F' est un facteur génétique bactérien qui peut exister sous forme d'élément libre dans le cytoplasme ou comme partie intégrante du chromosome bactérien. Il code pour les pili sexuels présents en surface des bactéries et il porte les caractères suivants:

Tn10: résistance à la tétracycline;

pro AB signifie que la souche a besoin de proline dans son milieu de culture;

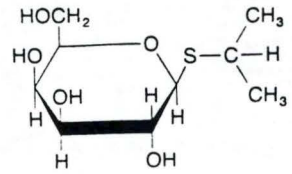
lac I^{q} est une mutation renforçant la production du répresseur de l'opéron lactose;

lac zΔM15 est synonyme d'une délétion du gène de la ß-galactosidase dans sa partie N-terminale, produisant une protéine inactive.

L'opéron lactose est une unité génétique d'expression coordonnée, constituée de trois gènes, codant respectivement pour une ß-galactosidase (*lac Z*), une perméase (*lac Y*) et une transacétylase (*lac A*), responsables du métabolisme du lactose. **(figure III.26)**

Figure III.27 : Structure de l'IPTG, l'inducteur de l'opéron lactose

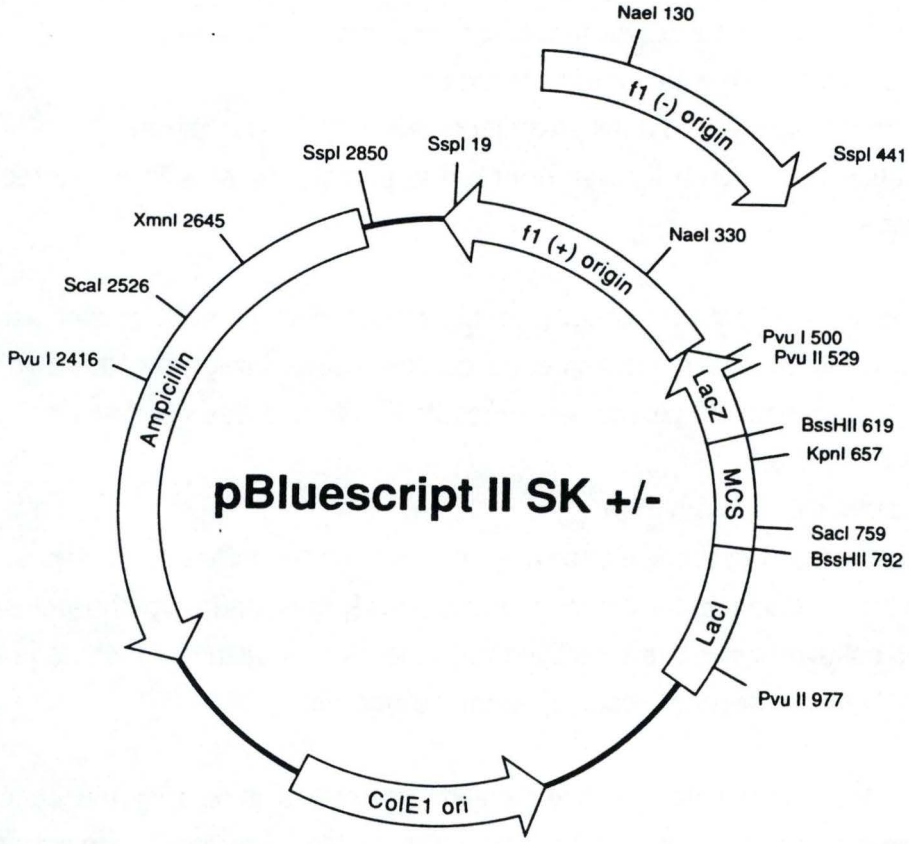
La liaison ß,D-thiogalactosidique n'est pas clivée par la ß-galactosidase. (Suzuki et al., 1989).

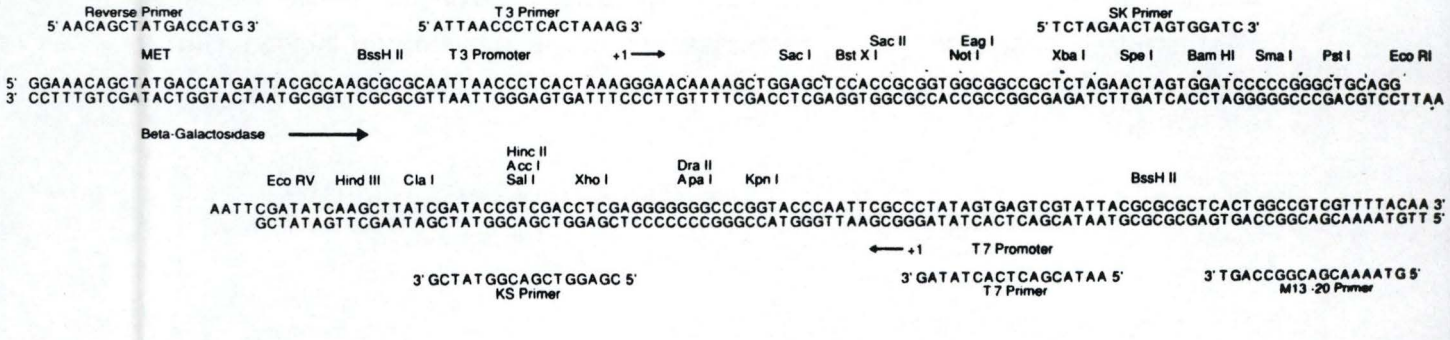


isopropyl-β,D-thiogalactoside
(IPTG)

Figure III.28 : Représentation du plasmide Bluescript (Stratagene)

Le pBluescript se présente sous deux formes suivant l'orientation du polylinker par rapport à la transcription du gène *lac Z*.. Celles-ci sont dénommées KS (la transcription va de *Kpn* I à *Sac* I) ou SK (la tanscription se déroule de *Sac* I à *Kpn* I). Le symbole + ou - indique l'orientation de l'origine de réplication phagienne F1.





Le gène *lac I* code pour la protéine répresseur qui assure le contrôle négatif de l'opéron. Ce répresseur se lie à l'ADN au niveau de l'opérateur et empêche l'initiation de la transcription de l'opéron. Le gène lac I^q, porté par l'épisome F', est caractérisé par la force de son promoteur, qui augmente d'un facteur dix la synthèse du répresseur. Il n'y a donc pas expression des gènes de l'opéron.
La répression est levée par la présence dans le milieu d'un inducteur naturel, le lactose, ou artificiel, comme l'isopropyl-ß-D-thiogalactoside (IPTG). **(figure III.27)**.
Les particularités de la régulation de l'opéron lactose sont à l'origine d'un test coloré d'identification des recombinants appelé la sélection blanc-bleu.

I.1.2. Souches de *Brucella*

La souche de *Brucella melitensis* B115 nous a été fournie par J.M. Verger de l' Institut National de Recherches Agronomiques, Pathologies infectieuses et Immunologie, Nouzilly (France).

I.2. PLASMIDES (Suzuki et al., 1989; Maniatis et al., 1989)

Les plasmides sont des éléments génétiques extrachromosomiques, trouvés dans un grand nombre d'espèces bactériennes. Ce sont des molécules d'ADN circulaire double brin, d'une taille de 1 à 200 kb, qui contiennent des gènes codant pour des enzymes dont les fonctions peuvent être avantageuses pour l'hôte bactérien, comme la résistance aux antibiotiques ou la dégradation de composés organiques complexes.

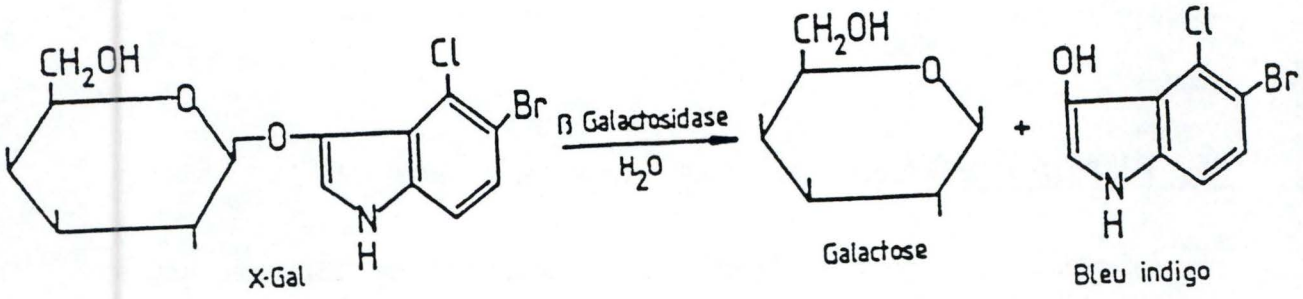
Le plasmide pBluescript est un phagemide [c'est un hybride entre un plasmide (il contient l'origine de réplication Col E1 d'*E. coli*) et un phage (il a l'origine de réplication F1 du phage M13)] de 2958 paires de bases **(figure III.28)**.

Ce plasmide possède un gène de résistance à l'ampicilline, permettant de sélectionner les colonies contenant le plasmide (= colonies transformantes); un fragment non opérationnel du gène de régulation de l'opéron lactose *lac I* et un fragment du gène *lac Z*, dit *lac Z'* qui code pour la partie N-terminale de la ß-galactosidase. Quand ce vecteur transforme une bactérie XL1-blue, la complémentation intragénique entre lac Z' codé par le plasmide et le gène *lac zΔM15*, porté par l'épisome, permet d'obtenir une activité ß-galactosidase mise en évidence par un test coloré.

Figure III.29 : Dégradation du X-gal, un analogue du lactose, en conditions inductrices (IPTG).

Le X-gal (ou le 5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl, ß-D-galactoside) est un analogue du lactose: le glucose est remplacé par le 5-bromo, 4-chloro, 3-indole. L'hydrolyse du X-gal par la ß-galactosidase libère le galactose et un composé de couleur bleue, le 5-bromo, 4-chloro, 3-indole.

Ainsi, lorsque le plasmide Bluescript, possédant le gène *lac Z'* qui code pour l'α-peptide de la ß-galactosidase, transforme une bactérie XL1-blue; la complémentation intragénique entre l'α-peptide, codé par le plasmide, et le gène *lac* zΔM15, porté par l'épisome, permet d'obtenir une activité ß-galactosidase mise en évidence par un test coloré. Une série de sites de restriction uniques (polylinker = MCS) a été introduite à l'extrémité N-terminale du gène *lac Z'*, sans altérer la capacité de complémentation de l'α-peptide. Cependant, lors du clonage d'un fragment d'ADN dans un des sites de restriction, il y a disruption du gène *lac Z'* et la complémentation n'a pas lieu. Les colonies de bactéries transformées par ce plasmide recombinant restent blanches alors que les colonies transformantes contenant le pBluescript natif sont bleues. Ce test permet donc de repérer les colonies contenant un plasmide recombinant.



En conditions inductrices (IPTG), un analogue du lactose, le X-gal (ou le 5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl-b-D-galactopyrononide) est ajouté au milieu de culture et il est dégradé par l'enzyme en galactose et en 5-bromo, 4-chloro, 3-indole, un composé responsable de la couleur bleue des colonies transformantes. **(figure III.29)**

I.3. MILIEUX DE CULTURE

- milieu Luria-Bertani (LB) pour *E. coli*: tryptone (Difco) 10 g/l
  extrait de levure (Gibco BRL) 5 g/l
  NaCl 5 g/l
  milieu solide: + agar 20 g/l

  Porter à volume avec de l'eau distillée.
- milieu minimum M9 : dans 1000 ml d'eau distillée, mettre -12 g de Na_2HPO_4
  -6 g de KH_2PO_4
  -2 g de NH_4Cl
  -1 g de NaCl

  Ajouter 1 ml de $MgSO_4$ 1M, 2 g de glucose, 0.1 ml de $CaCl_2$ 1M et 0.34 g de thiamine (porter à 10 ml avec du milieu M9) et filtrer.

Les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage (20 minutes à 120°C).
Après autoclavage, ajouter au LB de l'ampicilline (concentration finale de 100 µg/ml) et de la tétracycline (concentration finale de 12.5 µg/ml). Les cultures bactériennes se font dans l'incubateur à 37°C.

* Solutions stocks, filtrées sur 0.22 µm et les aliquots sont stockés à -20°C.
- Solution d'ampicilline (Boerhinger): 100 mg/ml.
- Solution de tétracycline: 12.5 mg/ml.
- Solution d'isopropyl-ß-D-thiogalactoside (IPTG): 100 mM dans de l'eau distillée.
- Solution de 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galactopyranoside (X gal): 2% dans N,N, diméthylformamide.

- Milieu de culture pour *Brucella*:
  solide: *Brucella* agar (Gibco BRL) 44 g/l
  agar 10 g/l
  liquide: Tryptic Soy broth (DIFCO) 30 g/l.

- Coloration de Gram:

Elle permet de distinguer les bactéries Gram-négatives des bactéries Gram-positives, car leur réponse à cette double coloration est différente, à cause des variations au niveau des propriétés fonctionnelles de leur membrane cytoplasmique et de leur paroi.

1) Réalisation du frottis

-Déposer une goutte de NaCl 7.5% sur une lame porte-objet.

-Toucher la colonie à examiner avec l'anse de platine et en déposer un fragment à côté de la goutte.

- Homogénéiser en étalant sur la lame le mélange bactéries/eau.
- Laisser sécher à l'air.
- Couvrir le frottis d'alcool et flamber.
- Laisser refroidir.

2) Coloration de la coupe

- Couvrir le frottis d'un colorant basique, le Violet de Gentiane (1 min.).
- Eliminer l'excès de colorant et couvrir de lugol (30 sec.) pour qu'il y ait formation de complexes, qui colorent intensément le cytoplasme en violet foncé.
- Rincer à l'eau de ville.
- Décolorer prudemment à l'alcool; les bactéries Gram-positives restent colorées après l'action de l'alcool alors que les bactéries Gram-négatives ne le sont plus.
- Contre-colorer à la safranine (colorant rouge) afin que les bactéries décolorées à l'alcool apparaissent rouge sur la préparation finale (= bactéries Gram-négatives).
- Rincer à l'eau de ville.
- Sécher et observer au microscope à immersion.

II. Techniques de génie génétique

II.1. EXTRACTION de l'ADN PLASMIDIQUE

Les deux méthodes décrites sont celles préconisées par la firme QIAGEN pour extraire de l'ADN plasmidique à partir d'*E. coli*.

On choisira une méthode plutôt que l'autre selon la quantité d'ADN désirée et l'usage auquel il est destiné. Les minipreps permettent la récupération de quelques μg d'ADN, alors que les midipreps donnent plusieurs dizaines de μg d'ADN, d'une pureté supérieure.

II.1.1. Minipréparation d'ADN plasmidique (Miniprep)

II.1.1.1. Solutions, Tampons

- RNAse A (Boerhinger), stock à 5mg/l: dissoudre la RNAse A à raison de 5mg par litre d'eau distillée, porter à ébullition durant 20 minutes, laisser refroidir et répartir en aliquots, stocker à -20°C.
- Tampon P1:

  RNAse A 400 μg/ml
  Tris-HCl 50 mM pH 8.0
  EDTA 10 mM
- Tampon P2:

  NaOH 200 mM
  SDS 1%
- Tampon P3:

  KAc 3 M pH 8.0
- Solution d'éthanol 70%

II.1.1.2. Protocole

— Inoculer 5 ml de milieu liquide (LB + ampicilline + tétracycline) avec une colonie isolée de bactéries transformantes.
— Incuber une nuit à 37°C sous forte agitation.
— Récupérer 1.5 ml de bactéries en culture dans un eppendorf.

— Centrifuger 5 minutes à 12000 rpm (Hermle Z229).
— Resuspendre le culot bactérien dans 300 µl de P1.
— Ajouter 300 µl de P2 et mélanger lentement.
— Incuber 5 minutes à température ambiante.
— Ajouter 300 µl de P3 et agiter doucement.
— Laisser 10 minutes sur glace.
— Centrifuger à 4°C durant 15 minutes et récupérer le surnageant.
— Précipiter l'ADN du surnageant avec 0.7 volume d'isopropanol. Mélanger.
— Centrifuger 15 minutes à température ambiante. Eliminer le surnageant.
— Laver deux fois l'ADN à l'éthanol 70%, c'est-à-dire déposer 400 µl et centrifuger 3 minutes. Eliminer l'éthanol.
— Sécher sous vide quelques minutes.
— Resuspendre dans 40 µl d'H_2O distillée stérile.

II.1.2. Midipréparation d'ADN plasmidique (Midiprep)

II.1.2.1. Principe

Cette technique utilise le principe d'une chromatographie échangeuse d'ions (anions) qui permet de séparer l'ADN plasmidique des protéines et de l'ARN. Par un procédé spécial, les colonnes Qiagen sont formées d'un silicagel macroporeux, avec des particules d'une taille voisine de 100 nm, qui est recouvert d'une substance hydrophile qui empêche les fixations non spécifiques. Le traitement subi par la résine lui permet de présenter une densité maximale de charges en surface, ce qui offre une capacité de séparation très grande, jusqu'à 1.4 M en sel, qui est le point d'élution de l'ADN double brin.

II.1.2.2. Solutions, Tampons, Fournitures

- Nous avons utilisé les colonnes TIPS 100 (Qiagen).
- La composition des tampons P1, P2 et P3 a été présentée au point II.7.1.2 (Miniprep).
- Tampon d'équilibration de la colonne (QBT):

NaCl 50 mM
MOPS (3-N-Morpholinopropan-sulfonic acid) (Sigma) 50 mM
Ethanol 15%
Triton X-100 0.15%

pH 7.0

- Tampon de lavage (QC):

NaCl 1 M
MOPS 50 mM
Ethanol 15%
pH 7.0

- Tampon d'élution (QF):

NaCl 1.25 M
Tris-HCl 50 mM
Ethanol 15%
pH 8.2

II.1.2.3. Protocole

— Inoculer 50 à 150 ml de milieu liquide (LB + ampicilline + tétracycline) avec une colonie de bactéries transformantes.
— Incuber une nuit à 37°C sous forte agitation.
— Centrifuger les bactéries à 5000 rpm (Sorvall, rotor SS34), 5 minutes.
— Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 4 ml de tampon P1 froid.
— Ajouter ensuite 4 ml de tampon de lyse P2. Mélanger doucement.
— Incuber 5 minutes à température ambiante.
— Ajouter 4 ml de tampon de neutralisation P3. Homogénéiser avec douceur.
— Incuber 15 minutes sur glace.
— Centrifuger 15 minutes à 12000 rpm (Sorvall, rotor SS34), 4°C.
— Récupérer le surnageant (répéter la centrifugation si des particules visibles sont encore en suspension dans le surnageant).
— Equilibrer la colonne Qiagen Tip 100 avec 5 ml de tampon QBT (laisser entrer par gravité).
— Déposer le surnageant sur la colonne et laisser pénétrer.
— Laver la colonne avec 2 X 10 ml de tampon QC.
— Eluer l'ADN avec 5 ml de tampon QF.
— Récupérer les fractions éluées en eppendorfs.
— Précipiter l'ADN avec 0.7 volume d'isopropanol. Homogénéiser.
— Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm (Hermle Z229) à température ambiante.
— Laver 2 fois le culot d'ADN avec 1 ml d'éthanol 70% glacé.
— Sécher le culot quelques minutes sous vide.
— Resuspendre le culot d'ADN dans 20 μl d'H_2O distillée stérile.

Figure III.30 : Etalons de taille II et VII pour gel d'agarose (Boerhinger).

Les valeurs sont exprimées en paires de bases (pb).

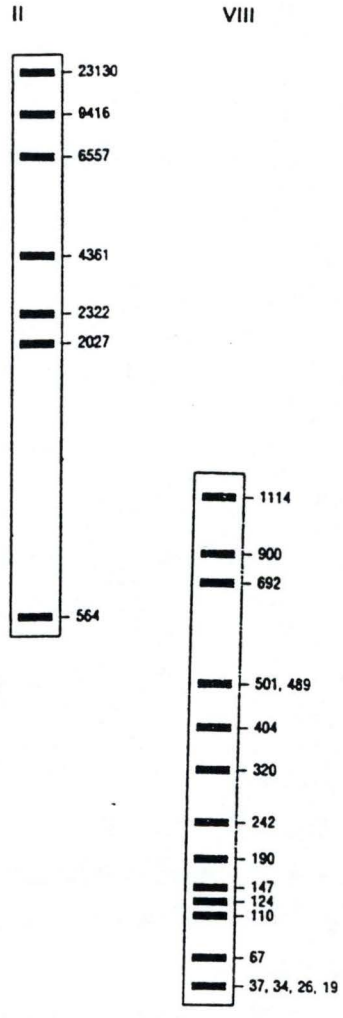
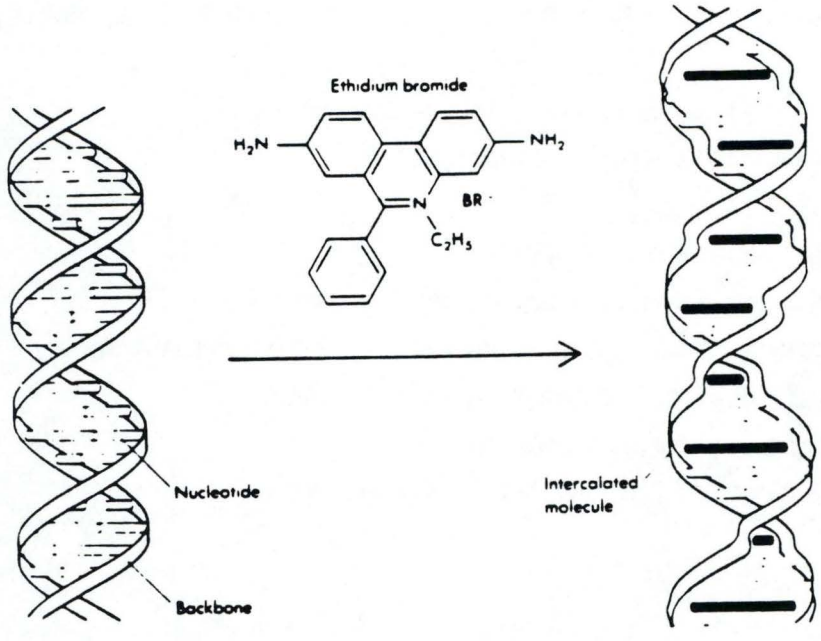


Figure III.31 : Représentation schématique montrant les molécules de bromure d'éthidium, s'intercalant entre les bases azotées de l'ADN



— Rassembler le contenu des différents eppendorfs.
— Vérifier la pureté de l'ADN obtenu par dépôt d'un échantillon sur un gel d'agarose.

II.2. ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE

II.2.1. Principe (Maniatis et al., 1989)

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le pourcentage en agarose sera donc inversément proportionnel aux tailles respectives des fragments à séparer; il varie le plus souvent entre 0.8 et 2%.

La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Nous avons utilisé deux étalons, commercialisés par Boerhinger: l'ADN du phage λ coupé par *Hind* III (étalon II) et l'ADN du pUCBM21 coupé par *Hpa* II, *Dra* I et *Hind* III. **(figure III.30)**

Les fragments sont alors visualisés au moyen du bromure d'éthidium. Celui-ci se lie à l'ADN double brin en s'intercalant entre les bases de la double hélice **(figure III.31)**. Etant fluorescente, cette molécule marque l'ADN et celui-ci est donc visible sous illumination UV. Il faut cependant noter que la fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille , mais aussi à la quantité d'ADN présente; ainsi, en connaissant la quantité d'ADN des étalons, on peut estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison de l'intensité de la fluorescence.

II.2.2. Solutions, Tampons et Fournitures

- Solution de bromure d'éthidium (Sigma) : 2 mg/ml.
- Solution d'alourdisseur :

sucrose	50%
EDTA	100 mM
SDS	1%
Bleu de bromophénol	0.1%

- Tampon TAE (50 fois concentré):

Tris-HCl, pH 8.0, 0.04 mM
EDTA 0.002 M
Acide acétique glacial 57.1 ml

- Agarose

II.2.3. Méthode

— Préparer un gel d'agarose dans un volume approprié de tampon TAE.
— Porter à ébullition jusqu'à obtention d'une solution limpide.
— Couler la solution sur le support *ad hoc* muni d'un peigne, quand elle est refroidie aux environs de 50°C.
— Les échantillons sont préparés dans une solution d'alourdisseur.
— Immerger le gel dans une cuve d'électrophorèse (Gibco) remplie de TAE, auquel on a ajouté quelques μl de bromure d'éthidium.
— Déposer les échantillons dans les puits et effectuer la migration.
— Visualiser le gel sous illumination UV (Transilluminateur longueur d'onde à 302 nm).

II.2.4. Extraction de l'ADN à partir d'un gel

II.2.4.1. Principe

On peut extraire un fragment d'ADN intéressant du gel d'agarose préparatif et le purifier grâce au kit "Gene Clean II ^{TM}"(Westburg).
Il utilise la propriété que possède une résine formée de billes de silicate, d'adsorber spécifiquement l'ADN dans certaines conditions de salinité.

II.2.4.2. Méthode

Nous avons donc utilisé le kit "Gene Clean II ^{TM} (Westburg) et nous avons suivi le protocole préconisé par la firme.

— Séparer les fragments d'ADN restreints par électrophorèse en gel d'agarose.
— Visualiser la bande intéressante sous UV et exciser le gel d'agarose à cet endroit.
— Placer le morceau d'agarose dans un eppendorf et déterminer la masse de gel récupéré.
— Ajouter 3 volumes (soit 3 ml/g d'agarose) d'une solution de NaI 6M.
— Incuber 5 minutes à 55°C pour faire fondre l'agarose et libérer l'ADN.
— Ajouter 5 μl de la solution Glass-Milk^{TM} (résine) et homogénéiser.
— Laisser 5 minutes à température ambiante.
— Centrifuger quelques secondes pour récupérer le complexe silice/ADN.

— Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 700 µl d'une solution de lavage "New"(Solution Kit, 7 ml; Ethanol absolu, 165 ml; Eau distillée, 140 ml).
— Centrifuger quelques secondes.
— Répéter cette opération deux fois.
— Resuspendre le dernier culot dans 10 à 40 µl d'H_2O distillée stérile.
— Placer l'eppendorf 5 minutes à 55°C pour améliorer la dissociation ADN/silice.
— Centrifuger 30 secondes.
— Répéter cette étape.
— Analyser quelques microlitres de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose afin de quantifier la récupération.

II.3. RESTRICTION DE L'ADN

III.3.1. Principe (Maniatis et al., 1989)

Les endonucléases de restriction sont des endo-déoxyribonucléases qui digèrent l'ADN double brin, après reconnaissance de séquences nucléotidiques spécifiques par clivage de deux liens phosphodiesters. Ces enzymes de restriction font partie du système de modification-restriction des bactéries, apportant ainsi une protection contre l'invasion d'ADN exogène.

L'activité catalytique des enzymes de restriction est influencée par la structure et la méthylation de l'ADN, la température et le tampon. Leur activité est mesurée en unité enzymatique: une unité enzymatique correspondant à l'activité d'une enzyme qui coupe complètement un microgramme d'un ADN donné en une heure à la température appropriée et dans les conditions optimales préconisées par les producteurs.

La quasi totalité des enzymes utilisés reconnaissent des sites spécifiques, qui sont des séquences palindromiques. Ces enzymes coupent pour générer une extrémité 5' ou 3' protrudante (bouts collants) ou des bouts francs.

II.3.2. Protocole

Les enzymes de resriction utilisés sont fournis par la firme Boerhinger, de même que les tampons adéquats.

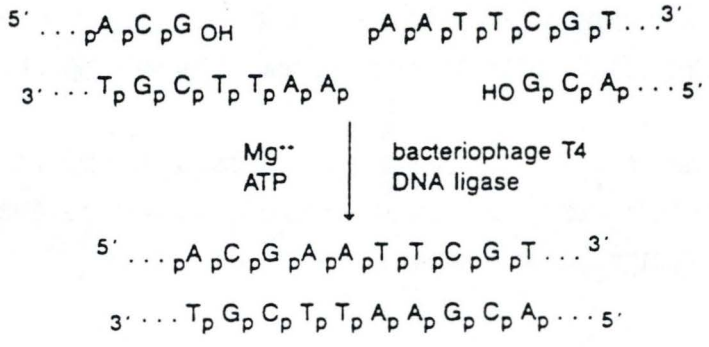
Tableau III.6 : Caractéristiques des enzymes de restriction utilisés dans ce travail.

Enzymes de restriction	site de clivage	tampon	température
Bam HI	G*GATCC	B	37°C
Eco RI	G*AATTC	H	37°C
Hind III	A*AGCTT	B	37°C
Kpn I	GGTAC*C	L	37°C
Sac I	GAGCT*C	A	37°C
Sma I	CCC*GGG	A	25°C
Sph I	GCATG*C	M	37°C

Les doubles restrictions *Bam* HI/*Hind* III se font dans le tampon B, *Bam* HI/*Eco* RI dans le tampon H, *Bam* HI/*Sph* I dans le tampon M et *Eco* RI/*Hind* III dans le tampon A.

Figure III.32 : Réaction de l'ADN ligase du phage T4

L'ADN ligase du phage T4 crée des liens covalents entre les extrémités 3'-hydroxyl et 5'-phosphate, en présence d'ATP et d'ions Mg^{++} (Maniatis et al., 1989).



Les caractéristiques des enzymes et des restrictions menées dans ce travail sont données au **tableau III.6**.

— Déposer dans un eppendorf stérile :
  ADN à restreindre
  tampon adéquat 10 fois concentré (1/10 du volume final)
  enzyme (environ 10 U/μg d'ADN)(maximum 1/10 du volume final)
  H_2O distillée stérile pour amener à volume
— Incuber 2 heures à la température prévue pour l'enzyme.
— Vérifier l'efficacité de la restriction par analyse d'un aliquot d'ADN par électrophorèse en gel d'agarose.

II.4. REACTION DE LIGATION

II.4.1. Principe (Maniatis et al., 1989)

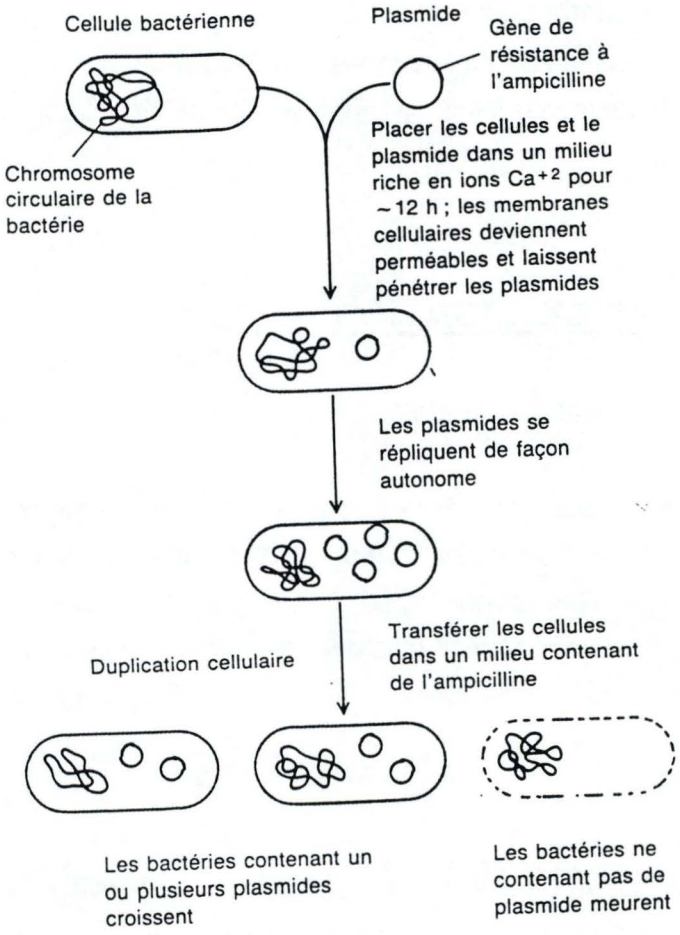
Cette étape consiste à créer des liens covalents entre deux fragments d'ADN, permettant par exemple d'introduire un insert d'ADN dans un plasmide préalablement linéarisé par restriction. Nous avons utilisé la DNA ligase (Boerhinger) du phage T4. Elle catalyse la formation de liens phosphodiesters entre l'hydroxyle 3' d'une extrémité et le phosphate de l'extrémité 5', en présence d'ATP et d'ions Mg^{++}. **(figure III.32)**

II.4.2. Méthode

— Mélanger les deux ADN à liguer: le plasmide linéarisé et purifié et l'insert purifié.
— Ajouter alors un 1/10 du volume final de tampon de ligation 10 fois concentré (Boerhinger) et 1 μl de T4 DNA ligase (1U).
— Incuber une nuit à 16°C (dans le cas d'une ligation à bouts collants).
— Quand la réaction de ligation est terminée, conserver le mélange à –20°C jusqu'au moment de la transformation bactérienne.

Figure III.33 : Transformation bactérienne

Un plasmide porteur d'un gène de résistance à l'ampicilline peut pénétrer par choc thermique dans une bactérie, perméabilisée au chlorure de calcium (cellule compétente). Les bactéries transformées sont sélectionnées par leur capacité à croître en présence d'ampicilline (Suzuki et al., 1989).



II.5. TRANSFORMATION BACTERIENNE

II.5.1. Principe (Suzuki et al., 1989)

La transformation consiste à faire entrer de l'ADN exogène (dans notre cas, un plasmide) dans une bactérie. Mais, pour y parvenir, il faut que la paroi et la membrane bactériennes soient devenues perméables à l'ADN: la bactérie est alors dite compétente. La bactérie Gram-négatives, *E. coli*, doit être rendue compétente artificiellement par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium ($CaCl_2$), qui déstabilise la paroi et la membrane, provoquant un gonflement de la bactérie. Après l'addition d'ADN, celui-ci forme avec le calcium un complexe résistant aux désoxyribonucléases. Lors du choc thermique à 37°C, ce complexe peut entrer dans la cellule. **(figure III.33)**

Un temps d'incubation de 30 minutes minimum en milieu riche, est nécessaire aux bactéries pour régénérer une paroi normale et pour permettre aux gènes de résistance introduits de s'exprimer.

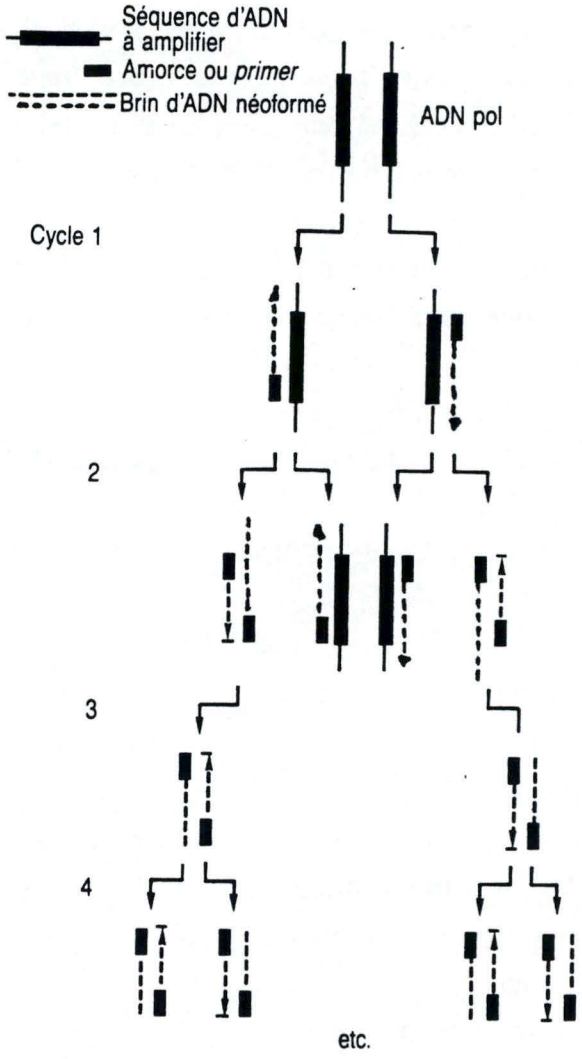
Les bactéries transformantes sont isolées par culture sur boîte de milieu sélectif contenant l'antibiotique dont le gène de résistance est apporté par le plasmide.

II.5.2. Préparation des cellules compétentes

- Centrifuger une culture de 100 ml d'*E. coli* XL1-blue en phase exponentielle de croissance (DO= 0.4) dans du LB + tétracycline, 5 minutes à 4000 rpm et à 4°C (Sorvall, rotor SS34).
- Eliminer le surnageant.
- Laver les bactéries dans la moitié du volume initial avec du $CaCl_2$.
- Resuspendre le culot dans un volume de $CaCl_2$ 50 mM équivalent à la moitié du volume initial.
- Incuber 20 minutes sur glace.
- Centrifuger dans les mêmes conditions.
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de $CaCl_2$ 50 mM + glycérol 15%, égal au dixième du volume initial.
- Répartir la solution en aliquots et stocker à –80°C.

Figure III.34 : L'amplification PCR

Cette méthode demande deux oligonucléotides complémentaires d'une courte séquence située aux extrémités des brins du fragment d'ADN à amplifier, qui sont mis à hybrider; ces oligonucléotides servent d'amorce à une ADN polymérase, chaque brin sert de matrice à l'enzyme qui synthétise le brin complémentaire; les produits issus de ce premier cycle sont dénaturés par la chaleur; les amorces sont à nouveau hybridées avec les brins d'ADN provenant du premier cycle d'amplification, chaque brin servant de matrice à l'ADN polymérase.



II.5.3. Protocole de transformation

— Ajouter à 100 µl de cellules compétentes soit 100 ng (maximum) de plasmide
soit 10 µl de mélange de ligation.
— Incuber 30 minutes sur glace.
— Réaliser un choc thermique en plaçant 2 minutes à 37°C.
— Ajouter 0.5 ml de LB liquide.
— Incuber 30 minutes à 37°C.
— Etaler 100 µl sur boîtes de milieu sélectif avec les antibiotiques :
ampicilline (100 µg/ml) pour sélectionner les bactéries transformantes (contenant le plasmide portant le gène de résistance à l'ampicilline).
tétracycline (12.5 µg/ml) pour s'assurer que ce sont bien des cellules XL1-blue.

Parallèlement à cette expérience, des témoins de transformation sont réalisés suivant le même protocole:
- témoin de viabilité: des cellules compétentes non transformées sont étalées sur boîte de LB.
- témoin de compétence: des bactéries transformées avec un plasmide non restreint, sont étalées sur boîte de LB + antibiotiques.
- témoin de sensibilité à l'ampicilline: des bactéries non transformées sont étalées sur boîte de LB + ampicilline.

II.6. AMPLIFICATION DE GENES PAR PCR

II.6.1. L'amplification PCR

II.6.1.1. Principe (Maniatis et al., 1989; Gibbs, 1990)

Cette technique permet l'amplification de certaines portions d'ADN.

La préparation d'ADN doit être dénaturée. Des amorces oligonucléotidiques de 20 paires de bases, complémentaires des séquences se trouvant de chaque côté de la région-cible, s'hybrident l'une au brin "sens" et l'autre au brin "anti-sens". La longueur de la séquence-cible est déterminée par la distance entre les 2 amorces. **(figure III.34)**

Une ADN polymérase, dénommée Taq pour *Thermophilus aquaticus* est alors utilisée pour synthétiser à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque *primer* un simple brin d'ADN. Le cycle peut ainsi se répéter en dénaturant la préparation et le nombre de copies de la séquence-cible augmente de façon exponentielle.

Les amorces typiques ont généralement une longueur de 18 à 28 nucléotides et elles sont composées de 50 à 60% de bases G et C. Il faut noter que la température d'hybridation utilisée pour l'amplification est inférieure à la température de melting (Tm) des amorces.
Ce Tm se calcule de la façon suivante: Tm = aX4 + bX2 (où a = G+C et b = A+T). On enlève de cette somme 1 à 1.5°C par mismatch pour obtenir la T° d'hybridation. Des Tm entre 55 et 80°C sont exigés et ce sont les températures d'hybridation comprises entre 55 et 72°C qui donnent les meilleurs résultats.
Enfin, il faut veiller à ce que les amorces ne présentent pas de complémentarité pour ne pas avoir formation de dimères entre les amorces.

II.6.1.2. Méthode

— Mélange de réaction réalisé dans un microtube de type 1 (0.5/500 µl):
- Tampon Taq (Boerhinger) 10 µl.
- dNTP 10mM (mélange) 1 µl.
- Primer 1 (100 pmole/µl) 1 µl.
- Primer 2 (100 pmole/µl) 1 µl.
- Template 1 µg.
- Porter à 100 µl avec H_2O distillée.
- Ajouter la Taq polymérase (Boerhinger) à raison de 2.5 unités, soit 0.5 µl.

— Déposer 100 µl d'huile minérale ultra-pure (Promega) au-dessus du mélange de réaction afin d'éviter toute évaporation.

— Programmer l'appareil à PCR (Techne Thermal Cycler PHC-3) pour tous les cycles réactionnels:
- Incuber 10 minutes à 95°C.
- Incuber 36 cycles présentés comme suit:
  1 minute à 95°C pour la dénaturation
  1 minute à 58°C pour l'hybridation
  30 secondes à 72°C pour la polymérisation
- Incuber enfin 10 minutes à 72°C pour l'étape d'élongation finale.

— Eliminer l'huile de paraffine.

I.6.2. Purification des séquences amplifiées

Il est souvent nécessaire de purifier les séquences amplifiées, à partir du mélange réactionnel. Nous avons suivi le protocole de purification préconisé par Promega dans "Kit Magic PCR PREPS purification system for rapid purification of DNA fragments". On estime le rendement de la purification à environ 97-98%.

- Transférer la phase aqueuse dans un eppendorf propre stérile, car la présence de l'huile de paraffine peut entraîner une diminution du rendement de la purification.
- Déposer 100 µl de "Direct purification Buffer" dans un eppendorf. Ajouter 100 µl d'ADN amplifié. Vortexer.
- Ajouter 1 ml de résine "Magic PCR Preps" et vortexer 3 fois 20 secondes.
- Préparer une minicolonne "Magic" pour chaque produit PCR. Retirer le piston d'une seringue de 3 ml et y attacher la minicolonne.
- Injecter le mélange ADN/tampon/résine dans la minicolonne à l'aide du piston, mais pousser très lentement.
- Détacher la seringue de la minicolonne et retirer le piston. Réajuster le corps de la seringue à la minicolonne et injecter 2 ml de la solution de lavage (isopropanol 80%).
- Transférer la minicolonne sur un eppendorf. Centrifuger le tout 20 secondes à 12000 rpm pour éliminer la solution de lavage et sécher la résine.
- Placer la minicolonne sur un nouvel eppendorf et ajouter 50 µl d'H_2O distillée.
- Centrifuger 20 secondes à 12000 rpm pour éluer l'ADN.
- Stocker l'ADN purifié à –20°C.

II.7. SEQUENCAGE

II.7.1. Principe de la méthode utilisée (Maniatis et al., 1989)

La technique de séquençage s'apparente à la méthode des terminateurs de chaîne décrite par Sanger et al. (1977).

La manipulation consiste à faire synthétiser à une polymérase le brin que l'on veut séquencer. Le vecteur recombinant contenant le fragment à séquencer est dénaturé: les deux brins de l'ADN complémentaire sont séparés. Une amorce oligonucléotidique est hybridée à une séquence située juste en amont de la région à

Figure III.35 : Structure des 2', 3'-didéoxy-nucléotides qui sont utilisés dans la méthode de séquençage de l'ADN mise au point par Sanger

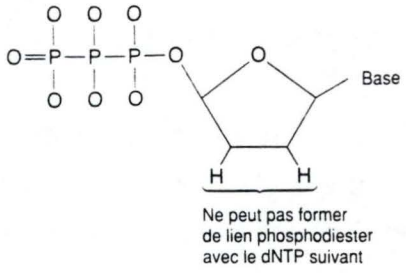
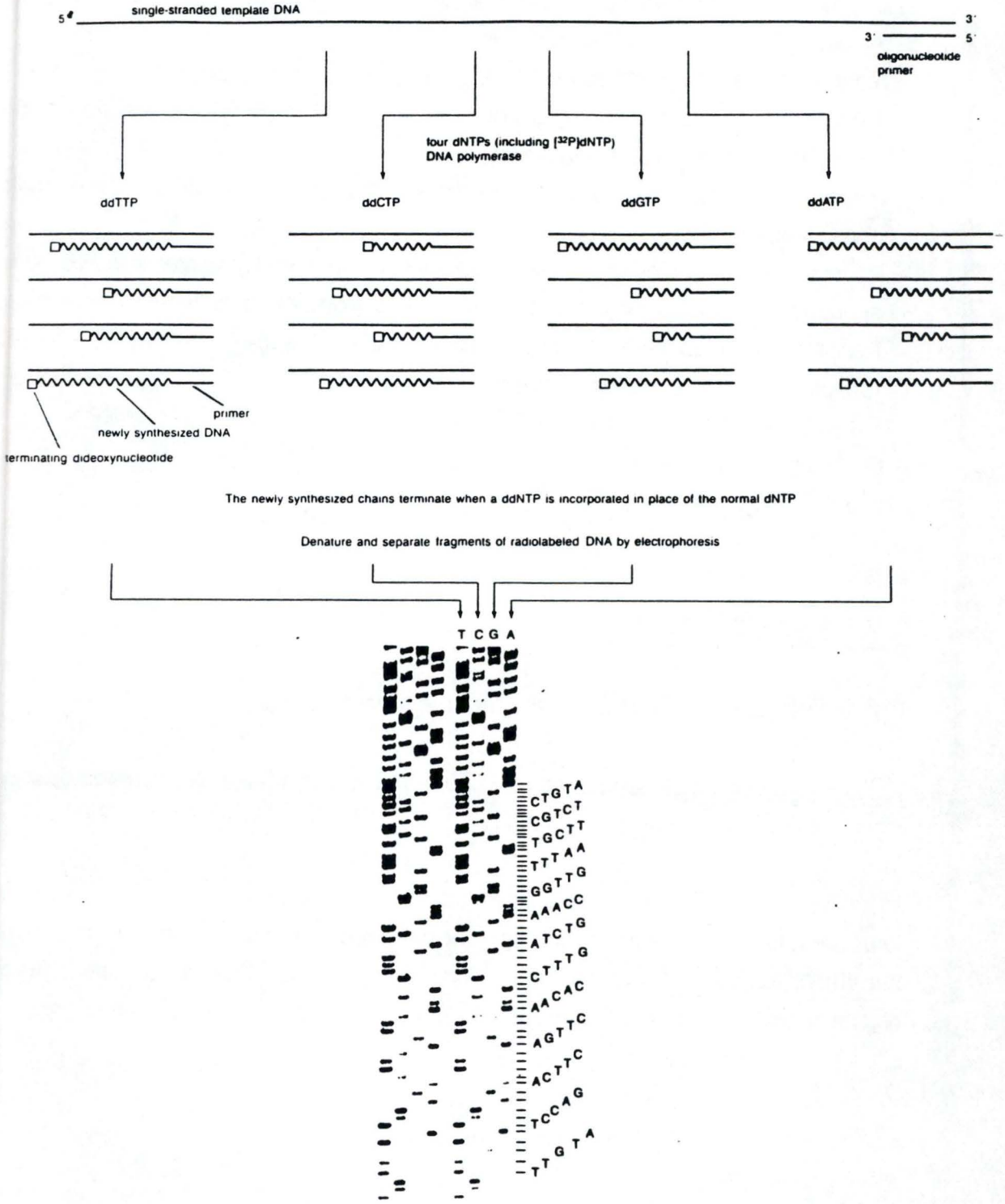


Figure III.36 : Séquençage selon la méthode de Sanger (Maniatis et al., 1989)



séquencer. En allongeant cette amorce, une polymérase synthétisera le brin complémentaire du fragment choisi.

Dans une première étape de marquage, la polymérase incorpore des dNTPs **(figure III.35)**, dont un est radioactif (marqué au ^{35}S). La réaction de séquençage se poursuit dans quatre mélanges séparés, qui diffèrent par la présence d'un didéoxynucléotide spécifique supplémentaire (ddATP, ddTTP, ddCTP ou ddGTP), auxquel il manque un groupe hydroxyle. Ces ddNTPs peuvent être incorporés dans une chaîne en élongation, mais ils bloquent la polymérisation parce qu'ils ne peuvent pas se lier au nucléotide triphosphate suivant.

Quand les quatre réactions sont terminées, on dépose les quatre solutions réactionnelles sur un gel d'électrophorèse dénaturant. La séquence est déterminée à partir de l'autoradiographie du gel de séquençage. **(figure III.36)**

II.7.2. Protocole

Le matériel génétique utilisé pour le séquençage est de l'ADN plasmidique obtenu par midipréparation. Mais, avant d'entamer la réaction de séquençage et pour permettre à l'amorce de s'hybrider à l'ADN, il faut dénaturer l'ADN plasmidique bicaténaire. Nous avons suivi le protocole préconisé par Pharmacia dans le "T7 Sequencing Kit".

— Prendre 2 à 3 ng de l'ADN obtenu par midipréparation.
— Ajouter 2 µl d'amorce (2.5-5 pmole/µl).
— Ajouter 1.5 µl da NaOH 1M.
— Vortexer le tube délicatement et centrifuger brièvement.
— Incuber 5 minutes à 65°C.
— Transférer l'eppendorf dans un bain à 37°C et ajouter rapidement 1.5 µl de HCl 1M et 2 µl de tampon "Annealing". Vortexer.
— Incuber 10 minutes à 37°C.
— Placer 5 minutes à température ambiante.
— Au mélange d'hybridation, ajouter 3 µl de Labelling Mix (contient les 4 dNTPs), 1 µl de S^{35}dATP et 2 µl de T7 DNA polymerase (réaction de marquage).
— Mélanger et laisser 5 minutes à température ambiante.
— Noter 4 eppendorfs A, C, G, T et y déposer 2.5 µl des mélanges de terminaison correspondants (contenant les 4 dNTPs et 1 ddNTP).

— Préchauffer les eppendorfs 1 minute à 37°C.
— Lorsque la réaction de marquage est terminée, déposer 4.5 µl de réaction de marquage dans chacun des 4 eppendorfs contenant les mélanges de terminaison.
— Mélanger doucement et laisser 5 minutes à température ambiante.
— Ajouter 5 µl de solution "Stop" aux échantillons.
— Mélanger et incuber 2 minutes à 80°C.
— Analyser par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

II.7.3. Electrophorèse

II.7.3.1. Préparation du gel

- Tampon TBE 10X concentré

Tris-HCl	121.1 gr.
Acide borique	51.35 gr.
EDTA	3.72 gr.

Porter à un litre avec de l'eau désionisée.

* Traitement des plaques

— Laver la plaque à circulation et une plaque de verre (munie d'une encoche sur une des 2 faces) à l'eau désionisée et ensuite à l'éthanol-éther (Norvanol).
— Enduire la plaque à circulation d'eau avec 5 ml de Repel-Silane; ceci afin de détacher plus facilement le gel de la plaque après la migration.
— Enduire l'autre plaque de verre avec un mélange de 5 ml d'éthanol absolu, 15 µl d'acide acétique glacial et 15 µl de Bind-Silane (du côté de l'encoche).

* Montage des plaques

— Centrer la plaque à circulation d'eau sur le support.
— Placer les quatre spacers (de 0.1 mm d'épaisseur) de taille croissante sur les bords de la plaque à circulation d'eau. La disposition des spacers aura pour conséquence un gradient d'épaisseur du gel (gel de 6% en acrylamide; gradient d'épaisseur de 0.1 à 0.4 mm). Le gel sera plus épais dans le bas et ainsi, il en découlera une diminution du gradient de potentiel, la migration sera ralentie, permettant une meilleure résolution.

* Préparation du gel (6%)

Urée	42 gr.
Acrylamide pure	5.7 gr.
N, N'-méthylènebisacrylamide	0.3 gr.
TBE 10X concentré	10 ml

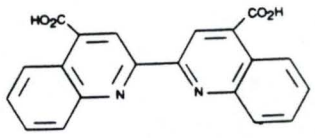
— Dissoudre dans un petit volume d'eau désionisée avant de porter à 100 ml.
— Passer sur un filtre de 0.45 μm et dégazer la solution afin d'améliorer la polymérisation.
— Ajouter extemporanément à la solution de gel, 800 μl d'APS 10% fraîchement préparé et 40 μl de TEMED.
— Couler le gel en versant la solution sur la plaque à circulation d'eau, tout en faisant coulisser l'autre plaque de verre. Eviter les bulles.
— Quand la plaque supérieure atteint l'extrémité de la plaque à circulation d'eau, maintenir les deux plaques l'une contre l'autre au moyen de pinces.
— Insérer le peigne entre les deux plaques et laisser polymériser environ trois heures.
— Lorsque le gel est polymérisé, monter les plaques dans la cuve d'électrophorèse en les fixant au moyen des attaches *ad hoc.*
— Remplir les cuves de tampon de migration TBE 1X.

II.7.3.2. Electrophorèse proprement dite

— Enclencher le circulateur d'eau à 55°C.
— Nettoyer les puits avec du tampon de migration afin d'éliminer l'urée qui s'y est concentrée.
— Réaliser un "pré-run" de 30 minutes à 1600 Volts.
— Nettoyer à nouveau les puits et déposer les échantillons, soit 2.5 μl, préincubés 2 minutes à 80°C (par exemple dans l'ordre ACGT).
— Faire migrer 5 minutes à 1600 Volts pour commencer et augmenter le voltage à 2000 Volts puis jusqu'à 2300 Volts pour le reste de la migration.
— Après la migration, séparer les 2 plaques; le gel reste fixé sur la plaque de verre. Placer la dans un bain d'acide acétique à 10% pendant 20 minutes sous légère agitation.
— Sécher le gel 2 heures entre 60 et 80°C.
— Déposer un film Kodak X-ARS sur le gel.

— Après une nuit, révéler et fixer le film (5 minutes dans le révélateur Kodak, 1 minute de lavage dans l'eau et 15 minutes dans le fixateur Kodak); lire la séquence.
— Analyser la séquence en utilisant le logiciel "DNA Strider 1.2".

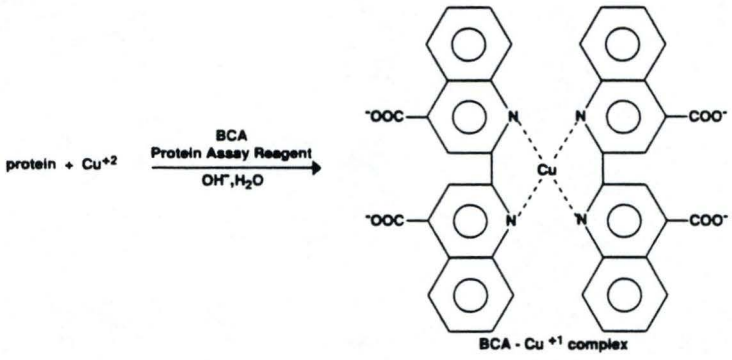
Figure III.37 : Structure du BCA (Bicinchroninic acid)



BCA MW 388.27

Figure III.38 : Principe du dosage protéique au BCA

Les protéines réagissent avec les ions Cu^{++} en solution alcaline pour produire des ions Cu^{+}. Il se forme alors un composé pourpre, résultat de la réaction de deux molécules de BCA (Bicinchroninic acid) avec un ion Cu^{+} (Pierce).



III.Techniques d'analyse des protéines

III.1. DOSAGE PROTEIQUE

III.1.1. Principe

Les protéines ont été dosées en utilisant le kit "BCA Protein Assay Reagent" (Pierce). Le sel de sodium de l'acide bicinchroninique (BCA) **(figure III.37)** est un réactif sensible, stable et hautement spécifique pour les ions de cuivre Cu^{+}. Quatre acides aminés (cystéine, cystine, tryptophane et tyrosine) sont responsables de la formation de couleur dans les échantillons contenant des protéines, lorsqu'ils sont testés au BCA. La réaction combine les caractéristiques du BCA avec la réaction de Biuret, dans laquelle les protéines réagissent avec le Cu^{++} pour produire du Cu^{+}. **(figure III.38)**. La réaction pourpre provenant de l'intéraction de 2 molécules de BCA avec un ion Cu^{+} présente une forte absorbance à 562 nm, ce qui permet la quantification spectrophotométrique des protéines en solution aqueuse par rapport à une courbe étalon.

III.1.2. Protocole

- Le dosage se réalise dans une plaque micropuits MAXISORP 69 949 (NUNC).
- Réaliser une droite d'étalonnage à partir de dilutions d'une solution de BSA (Albumine de Sérum Bovin) de concentration connue.
- Déposer 10 μl d'échantillon par puits.
- A la solution à tester, ajouter le BCA et le sulfate de cuivre dans une proportion 50/1 soit 200 μl de réactif A (Pierce) et 4 μl de réactif B (Pierce). Agiter la plaque 30 secondes.
- Couvrir la plaque et incuber 30 minutes à 37°C.
- Lire l'absorbance à 550 nm sur un lecteur ELISA (microplate EL 340 de BIO-TEK instruments).

Figure III.39 : Schéma de la réaction de polymérisation de l'acrylamide

Les gels de polyacrylamide sont le résultat de la polymérisation d'un monomère, l'acrylamide, en présence d'un agent bifonctionnel réticulant les chaînes polymériques entre elles, le N-N'-, méthylène bisacrylamide.

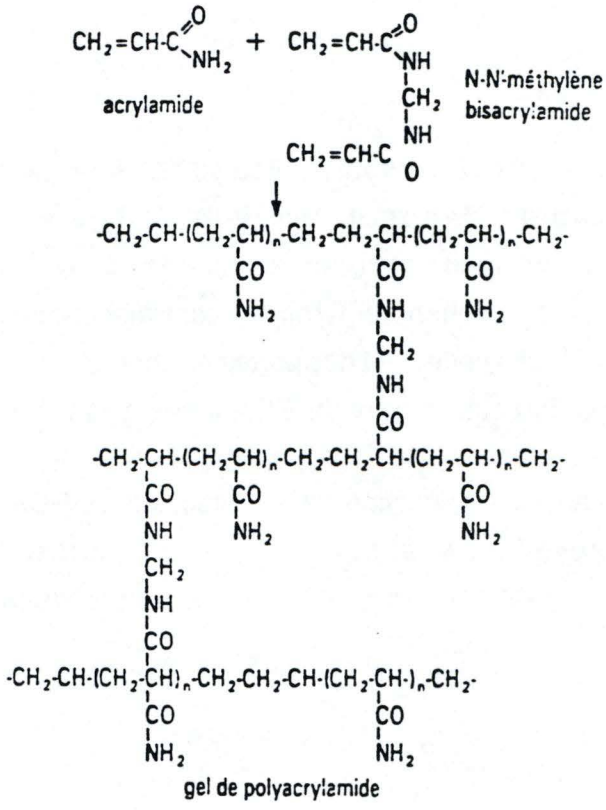
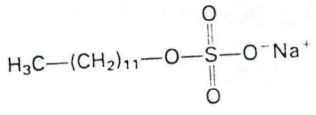


Figure III.40 : Structure du dodécylsulfate de sodium (SDS)



III.2. ANALYSE DES PROTEINES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE SDS

III.2.1. Principe (Weber and Osborn, 1969)

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide **(figure III.39)** en présence de dodécylsulfate de sodium **(figure III.40)** (SDS-PAGE) est une technique de séparation des protéines en fonction de leur taille. Les chaînes pontées fournissent le réseau tridimensionnel que les molécules à séparer devront traverser. Le SDS, détergent anionique, déroule les structures protéiques et se fixe stoechiométriquement à leurs chaînes, leur conférant une charge négative égale par unité de masse. L'ébullition permet de séparer les différentes sous-unités. Le ß-mercaptoéthanol rompt les ponts disulfures, intra- et intermoléculaires, en libérant les protéines constitutives complètement dépliées. Le mélange des protéines est alors déposé à une extrémité du gel, puis un champ électrique est appliqué au gel. Les protéines migrent au travers du gel, qui est divisé en *stacking gel*, ou gel de tassement et en *running gel*, ou gel de séparation. Les protéines sont mises en évidence par coloration ou par réaction avec un anticorps après transfert sur nitrocellulose.

III.2.2. Solutions, Tampons, Matériel

- Solution de Bleu de Coomassie:

Bleu de Coomassie brillant blue R250	0.25%
méthanol	45%
eau distillée	45%
acide acétique	10%

- Solution de décolorant:

méthanol	30%
acide acétique	10%
eau distillée	60%

- Tampon de stacking:

  Tris-HCl 0.5M, pH 6.8

  SDS 4%

- Tampon de running:

  Tris-HCl 1.5M, pH 8.8

  SDS 4%

- Tampon d'électrophorèse:

Tris-HCl 25mM, pH 8.3
glycine 192mM
SDS 0.1%

- Tampon pour échantillon (5 fois concentré):

Tris-HCl 250mM, pH 6.8
SDS 10%
2-ß-mercaptoéthanol (Fluka) 10%
glycérol (UCB) 50%
bleu de bromophénol 0.25%

III.2.3. Protocole du SDS-PAGE

— Réaliser le montage des plaques d'électrophorèse à l'aide des spacers.
— Couler le *running gel* ou gel de séparation, dont la concentration en acrylamide est fonction du degré de polymérisation souhaité.

% d'acrylamide	**15%**
acrylamide + bisacrylamide (1)	5 ml
tampon de *running*	2.5 ml
eau distillée	2 ml
APS (2)	0.5 ml
Temed	10 µl

(1) Solution stock d'acrylamide 30%, bisacrylamide 0.8% dans de l'eau distillée.
(2) Solution d'APS 1% dans de l'eau distillée, préparée extemporanément.

— Déposer un film d'alcool isobutylique sur le *running gel* .
— Laisser polymériser le gel.
— Eliminer l'alcool et rincer à l'eau distillée. Sécher.
— Couler alors le *stacking gel* ou gel de tassement, qui a pour rôle de concentrer les protéines .

Figure III.41 : Etalon commercialisé par Sigma

Protéines	Masse moléculaire (daltons)
Sérum albumine bovine	66000
ovalbumine	45000
glycéraldéhyde-3-P-déshydrogénase	36000
anhydrase carbonique	29000
trypsinogène	24000
inhibiteur de la trypsine	20000
α-lactalbumine	14200

% d'acrylamide	**3%**
acrylamide + bisacrylamide	0.5 ml
tampon de *stacking*	1.25 ml
eau distillée	2.75 ml
APS	0.5 ml
Temed	5 µl

— Enfoncer le peigne et laisser polymériser.
— Les échantillons sont préparés dans le tampon pour échantillon et placés trois minutes à 100°C pour dénaturer les protéines.
— Charger les échantillons.
— La migration se déroule à 200 Volts durant 1 heure.

La masse moléculaire des protéines est estimé à partir de l'étalon de masse moléculaire (Dalton Mark VII-L™), commercialisé par Sigma **(figure III.41)**.

III.2.4. Coloration des protéines

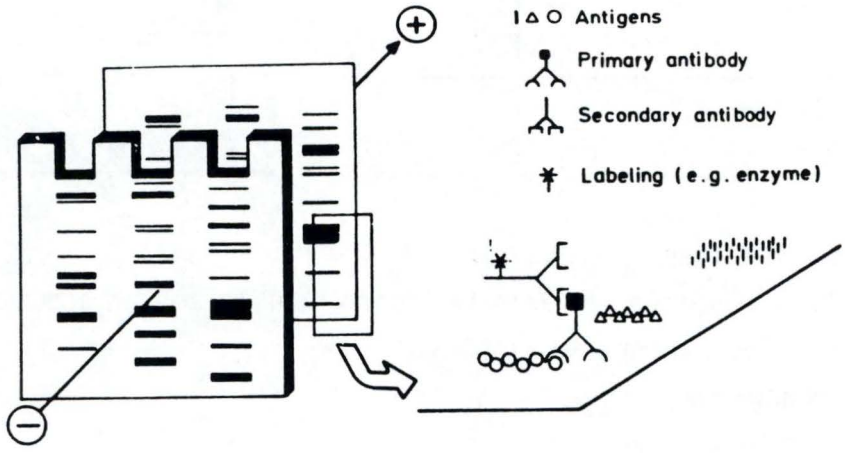
* Bleu de Coomassie

Après la migration, le gel est plongé dans la solution de bleu de Coomassie durant 30 minutes. Cette coloration est non spécifique. Le gel est ensuite décoloré par plusieurs bains successifs dans la solution de décolorant, jusqu'à ce que les protéines colorées se démarquent du fond du gel décoloré.

* Argent

— Réaliser la fixation du gel dans une solution à 50% éthanol et 10% acide acétique durant 45 minutes.
— Incuber dans le bain suivant pendant 30 minutes (100 ml de méthanol, 76 ml d'eau distillée et 24 ml d'acide acétique glacial).
— Placer ensuite le gel 30 minutes dans une solution à 25% en glutaraldéhyde.

Figure III.42 : Principe du Western blot



— Réaliser 2 lavages de 15 minutes dans 150 ml de la solution: 30 ml d'éthanol absolu, 15 ml d'acide acétique glacial et 255 ml d'eau distillée).
— Réaliser ensuite la réaction d'oxydation en plongeant le gel dans une solution de dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) 0.1% et d'acide nitrique 6% durant 15 minutes.
— Passer alors le gel dans une solution de nitrate d'argent 0.2% 20 minutes.
— Laver le gel dans 400ml d'eau distillée quelques minutes.
— Plonger le gel dans le liquide de développement (5.95 gr de carbonate de sodium, 0.1 ml de formaldéhyde et 193 ml d'eau distillée).
— Quand la coloration des protéines est suffisamment intense,arrêter la réaction par la solution d'arrêt (3 ml d'acide acétique glacial, 1.15 ml de glycérol 87% et 96 ml d'eau distillée).

Lorqu'elle est précédée d'une coloration au Bleu de Coomassie, la coloration à l'argent débute à l'étape n°2.
Cette coloration à l'argent est beaucoup plus sensible que la coloration au bleu de Coomassie, mais le bruit de fond est aussi plus important.

III.3. WESTERN BLOT

III.3.1. Principe (Towbin et al., 1979)

Après l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, le gel est placé dans le système de transfert où les protéines se comportant comme des anions sont transférées sur une feuille de nitrocellulose. Ainsi, une différence de potentiel est imposée entre les deux surfaces du gel, celui-ci étant maintenu dans un tampon de basse force ionique afin d'éviter des courants électriques trop importants qui généreraient une augmentation de la température néfaste au transfert des protéines. Mais, on peut noter que l'efficacité d'élution va dépendre de la concentration en polyacrylamide du gel, de la force ionique et du pH du tampon de transfert, qui contient du méthanol. Ce constituant augmente la capacité de fixation de la nitrocellulose en augmentant les intéractions hydrophobes et il stabilise aussi les dimensions du gel, ce qui n'est pas négligeable, car un gel a tendance à gonfler dans un tampon de basse force ionique, modifiant ainsi la forme des bandes. Après la procédure du transfert, la protéine intéressante est localisée sur la feuille de nitrocellulose à l'aide d'un anticorps spécifique de cette protéine **(figure III.42)**. Cet anticorps est à son tour reconnu par un second anticorps conjugué à une enzyme (phosphatase alcaline ou peroxydase). La

Tableau III.7 : Liste des anticorps monoclonaux utilisés dans ce travail

clone	isotype	antigène utilisé pour l'immunisation de souris	antigène de spécificité
A68/8E7/B11	IgG2a	*B. abortus* 45/20 vivante	10 kDa
A68/7G11/C10	IgG2a		
A68/4G1/C6	IgG2a	*B. abortus* 45/20 vivante	16.5 kDa
A66/4E3/B7	IgG2b	paroi cellulaire de *B. melitensis* B115 (R)	
A66/4E5/E9	IgG2a		
A67/7F6/B9	IgG1	*B. abortus* 45/20 tuées	
A76/8C3/G3	IgG2a		
A68/25H10/A5	IgG2a	*B. abortus* 45/20 vivantes	19 kDa
A76/2A6/H10	IgG2a		
A76/17B9/A2	IgG2a		
A76/18B2/D6	IgG2a		
A76/2A4/A7	IgG2b		
A68/3F3/D5	IgG2b	*B. abortus* 45/20 (R) vivantes	LPS-R
A76/12G12/F12	IgG1	*B. melitensis* B115	LPS-S
A76/3D6/A9	IgG3	*B. melitensis* B115	peptidoglycane (PG)
A76/29E3/C10	IgG2a	*B. abortus* 45/20 vivantes	15.7 kDa
A66/5H1/E9	IgG2a	paroi cellulaire de *B. melitensis* B115 (R)	

révélation se fait par mise en évidence de l'activité enzymatique en présence de composants, qui par réaction forment un précipité coloré.
La liste des anticorps monoclonaux utilisés est donnée au **tableau III.7**.

III.3.2. Production des anticorps monoclonaux

Les Ac Mo ont été produits par fusion de cellules myélomateuses NSO avec des cellules spléniques de souris, soit immunisées avec des parois ou fractions SDS-I (fraction insoluble dans le SDS, composée de peptidoglycane, d'OMPs majeures et d'un peu de LPS) de *Brucella*, soit infectées par des souches R ou S de *B. abortus* ou *B. melitensis*. Les Ac dirigés contre des antigènes de *Brucella* ont été sélectionnés par la technique ELISA en utilisant comme antigène des parois, fractions SDS-I, extraits de bactéries soniquées, LPS-R, LPS-S ou bactéries entières de souches R et S de *B. abortus* ou *B. melitensis*. La spécificité des Ac Mo a été déterminée par Western blot en utilisant ces mêmes antigènes (Cloeckaert et al., 1990). **(figure III.43)**

III.3.3. Solutions, Tampons, Matériel

- Solution d'amidoschwartz:

amidoschwartz	0.1%
méthanol	45%
acide acétique	10%
eau distillée	45%

- Solution de décolorant:

méthanol	30%
acide acétique	10%
eau distillée	60%

- Solution de 5-Bromo-4-Chloro-2-indolyl-phosphate (BCIP) (Sigma): ($C_8H_6NO_4BrCIP.C_7H_9N$) 5% de BCIP disodium salt dans du diméthylformamide (conservée à -20°C).
- Bleu de Nitrotétrazolium (NTB).
- Tampon de blotting:

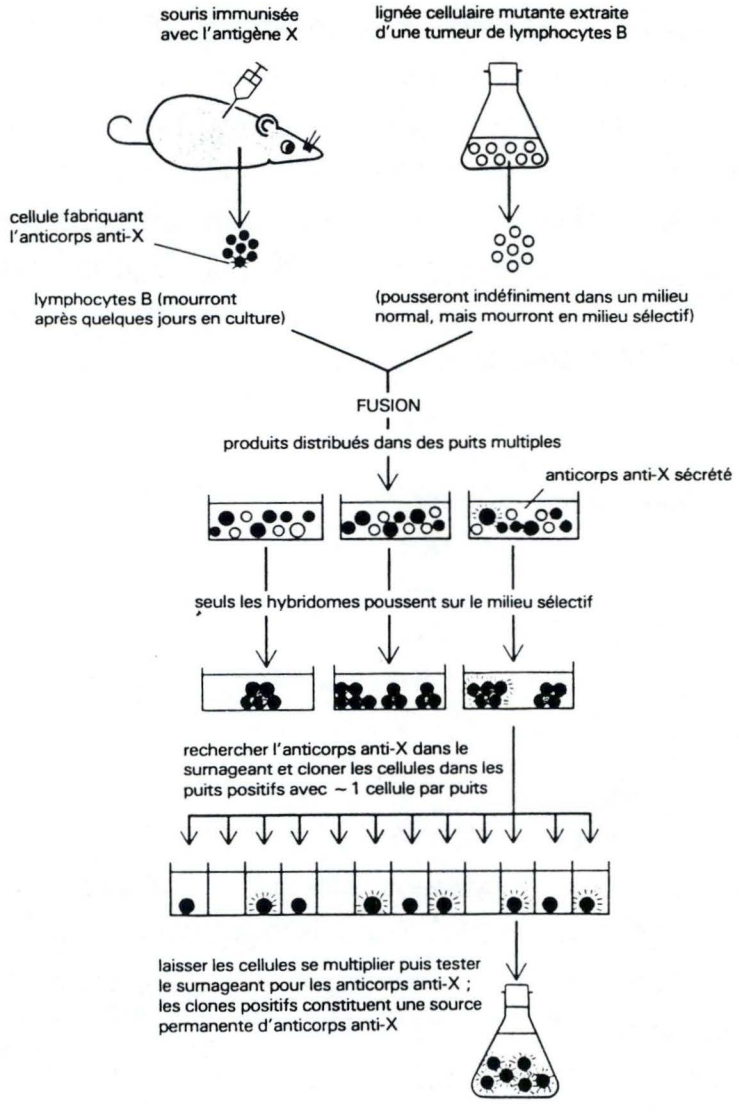
Tris-HCl	25mM
glycine	192mM
méthanol	20%

- TBS:

Tris-HCl	20mM

Figure III.43 : Schéma de production des anticorps monoclonaux

Ce schéma représente la préparation des cellules hybrides, ou hybridomes, sécrétant des anticorps monoclonaux homogènes dirigés contre un antigène particulier (X). Le milieu de croissance sélectif utilisé contient un inhibiteur (aminoptérine) qui bloque les voies métaboliques normales de synthèse des nucléotides. Les cellules doivent donc utiliser une voie de dérivation afin de synthétiser leurs acides nucléiques, et cette voie est défectueuse dans la lignée cellulaire mutante avec laquelle sont fusionnés les lymphocytes B normaux. Aucun des types cellulaires utilisés pour la fusion initiale n'étant capable de croître par lui-même, seules les cellules hybrides survivent.



NaCl 500mM

pH 7.5

- TTBS:

TBS + 0.05% de Tween 20 (Fluka)

- Tampon de révélation (dans eau bidistillée):

Tris-HCl 200mM

$MgCl_2$ 4mM

pH 9.5

- Nitrocellulose pour immunodétection: Millipore HA 0.45 μm (Millipore, Belford).
- Alkaline phosphatase conjugated affinity immunoglobulin to mouse immunoglobins (from sheep) (SAM-PA) (Prosan).
- Whatman chromatography paper (Whatman).
- Albumine de sérum bovin (BSA) (Sigma).
- Protéine A couplée à la peroxydase.
- Sérum de lapin anti-Immunoglobulines murines (épuisé avec des extraits d'*E. coli*) (RAM).
- 4-Chloro-1-naphtol (réactif HRP, Biorad).
- H_2O_2 30%.

III.3.4. Protocole

III.3.4.1. SDS-PAGE

Suivre la méthode décrite au point III.2.

III.3.4.2. Etape de transfert

— Placer le gel contre le film de nitrocellulose, qui est placé du côté de la cathode (borne +).

— Recouvrir de papier Whatman des 2 côtés et mettre alors le "sandwich" dans la cuve remplie de tampon de blotting.

— Laisser migrer 1 heure à 100 Volts (cuve Biorad).

III.3.4.3. Immunodétection des protéines transférées sur nitrocellulose

— Découper, après le temps de migration, la partie de nitrocellulose où se trouve l'étalon de poids moléculaire et colorer cette bande quelques minutes à l'amidoschwartz.

* Amidoschwartz

Cette coloration est utilisée après transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose. Les protéines sont alors révélées durant 5 minutes dans la solution d'amidoshwartz. Le film de nitrocellulose est alors décoloré.

— Incuber pour saturation le reste de la nitrocellulose dans du TBS/BSA 3% pendant 30 minutes à 37°C; afin de saturer les sites de fixation aspécifique, responsables du bruit de fond.

— Incuber avec les anticorps monoclonaux (surnageant de cultures d'hybridomes dilués 3X dans du TTBS/BSA 1%) une nuit à 4°C ou 3 heures à température ambiante.

— Laver 3 fois 5 minutes avec du TTBS.

* Révélation à la peroxydase

— Incuber 1 heure à température ambiante avec du RAM, dilué 100 fois dans du TTBS/BSA 1%.

— Laver 3 fois 5 minutes avec du TTBS.

— Incuber 1 heure à température ambiante avec le conjugué, la protéine A-peroxydase, dilué 2000 fois dans du TTBS/BSA 1%.

— Laver 3 fois 5 minutes avec du TTBS.

— Placer dans la solution de révélation (15 μl d'H_2O_2 30% dans 25 ml de TBS et 15 mg de chloro-naphtol dans 5 ml de méthanol; à mélanger extemporanément).

— Arrêter la réaction par rinçage avec du TBS.

* Révélation à la phosphatase alcaline

— Incuber 1 heure à température ambiante avec le conjugué, SAM-PA, dilué 500 fois dans du TTBS/BSA 1%.

— Laver 2 fois 5 minutes au TTBS.

— Laver une fois 5 minutes dans le tampon de révélation.

— Ajouter alors la solution de révélation (10 ml de tampon de révélation + 12 μl de BCIP + 1 mg de NTB; préparée extemporanément).

— Laisser révéler à l'obscurité.

— Arrêter la réaction à l'eau de ville.

III.4. MISE EN EVIDENCE D'UNE PROTEINE PAR DOT BLOT

Cette méthode permet de rapidement mettre en évidence la présence de l'antigène, reconnu par l'anticorps monoclonal dans un lysat bactérien.

III.4.1. Solutions, Tampons, Matériel

- Tampon de lyse:

sucrose	8%
Triton X-100	1%
EDTA	50mM
Tris-HCl, pH 8.0	50mM
Lysosyme	0.0625%

- Nitrocellulose pour immunodétection.
- DNase: 1 mg/ml

III.4.2. Préparation des lysats bactériens

— A partir d'un ml de culture bactérienne à saturation, resuspendre le culot bactérien dans 100 µl de tampon de lyse.
— Ajouter 5 µl de DNAse.
— Laisser 15 minutes à température ambiante.

III.4.3. Procédure du dot blot

— Réaliser sur de la nitrocellulose des dépôts séparés de 1 µl, 2 µl et 5 µl pour chaque échantillon.
— Laisser sécher complètement la nitrocellulose.
— Saturer 30 minutes à 37°C avec du TTBS/BSA 3%.
— Suivre la démarche "Immunodétection des protéines transférées sur nitrocellulose" (révélation à la phosphatase alcaline).

III.5. ELISA indirect

III.5.1. Principe

L'antigène est adsorbé au fond des puits de microplaques. L'anticorps monoclonal est mis en présence de l'antigène. La fixation de l'anticorps est révélée par un anticorps secondaire (Sheep Anti Mouse, SAM) couplé à une enzyme, la peroxydase qui catalyse la formation d'un produit coloré. L'absorbance de ce composé (à la longueur d'onde adéquate) est alors mesurée.

III.5.2. Solutions, Tampons, Matériel

- Plaques NUNC 69620 (NUNC).
- Hydrolysat de caséine (Hc):
  25 g de caséine (Fluka) dans 800 ml de NaOH 0.3N
  1 nuit à 37°C sous agitation
  porter à pH 7 avec du HCl 10N, puis porter à 1 litre
  centrifuger à 2000 rpm durant 20 minutes
  congeler directement.
- Laveur ELISA: Titertek Microplate Washer M96 Flow (ICN).

III.5.3. Protocole

— Récolter les bactéries à partir d'une culture liquide.
— Laver 3 fois le culot bactérien avec un ml de PBS.
— Déposer 100 µl de suspension bactérienne (5.10^9 bactéries/ml, ce qui correspond à une DO_{600} de 6.25) par puits sur des plaques NUNC 69620.
— Incuber deux heures à 37°C ou une nuit à 4°C.
— Laver 6 fois au NaCl-Tween au laveur ELISA.
— Déposer 50 µl par puits de l'anticorps monoclonal en dilution croissante dans du PBS-EDTA-Tween-Hc1/25.
— Incuber une heure à 37°C.
— Laver 6 fois au NaCl-Tween.
— Déposer par puits 50 µl de conjugué, SAM-peroxydase (dilué 500 fois dans du PBS-EDTA-Tween-Hc 1/25).
— Incuber une heure à 37°C.

— Laver 6 fois au NaCl-Tween.

— Révéler à l'ABTS (2,2'-azino-di-3-alkyl-benzathiozoniline-thionate = $C_{18}H_{16}N_4O_6S_4(NH_4)_2$).

* Réaliser la solution de révélation extemporanément: 25.2 mg d'ABTS dans 33.6 ml de tampon citrique (1.635 g de Na_2HPO_4 + 0.89 g d'acide citrique + 100 mls d'H_2O, pH 5.6 avec NaOH).
* Ajouter 30 µl d'H_2O_2 30%.
* Déposer 100 µl par puits.
* Placer les plaques dans le noir quelques minutes.
* Lire l'absorbance à 405 nm sur un lecteur ELISA (microplate EL340 de BIO-TEK instruments).

III.6. DETECTION IMMUNOLOGIQUE A L'AIDE DE LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE (Alberts et al., 1989)

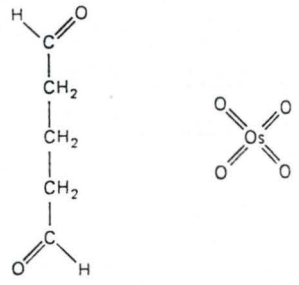
Le microscope électronique à transmission s'est avéré un outil puissant dans l'étude des membranes biologiques et est donc particulièrement indiqué dans notre étude des protéines mineures de la membrane externe de *Brucella*. Sa résolution est limitée à 20 Å pour les objets biologiques.

III.6.1. Le microscope à transmission (MET)

La source lumineuse est un filament qui émet des électrons au sommet cylindrique d'une colonne haute d'environ deux mètres. Puisque les électrons sont dispersés par collision avec les molécules d'air, il faut tout d'abord créer le vide à l'intérieur de la colonne en pompant l'air. Les électrons sont ensuite accélérés à partir du filament par une anode toute proche et transmis à travers un orifice minuscule pour former un faisceau électronique, qui descend le long de la colonne. Des bobines magnétiques échelonnées le long de la colonne font converger le faisceau électronique, exactement comme les lentilles focalisent la lumière dans un microscope photonique. On place l'échantillon dans le vide (en passant par un sas) dans la trajectoire du faisceau convergent d'électrons. Certains des électrons traversant l'échantillon sont déviés, selon la densité locale du matériel; les autres sont focalisés pour former une image. Les électrons déviés ne figurant pas sur l'image, les régions denses de l'échantillon se distinguent nettement comme des zones de flux électronique réduit.

Figure III.44 : Structure du tétroxyde d'osmium et de la glutaraldéhyde

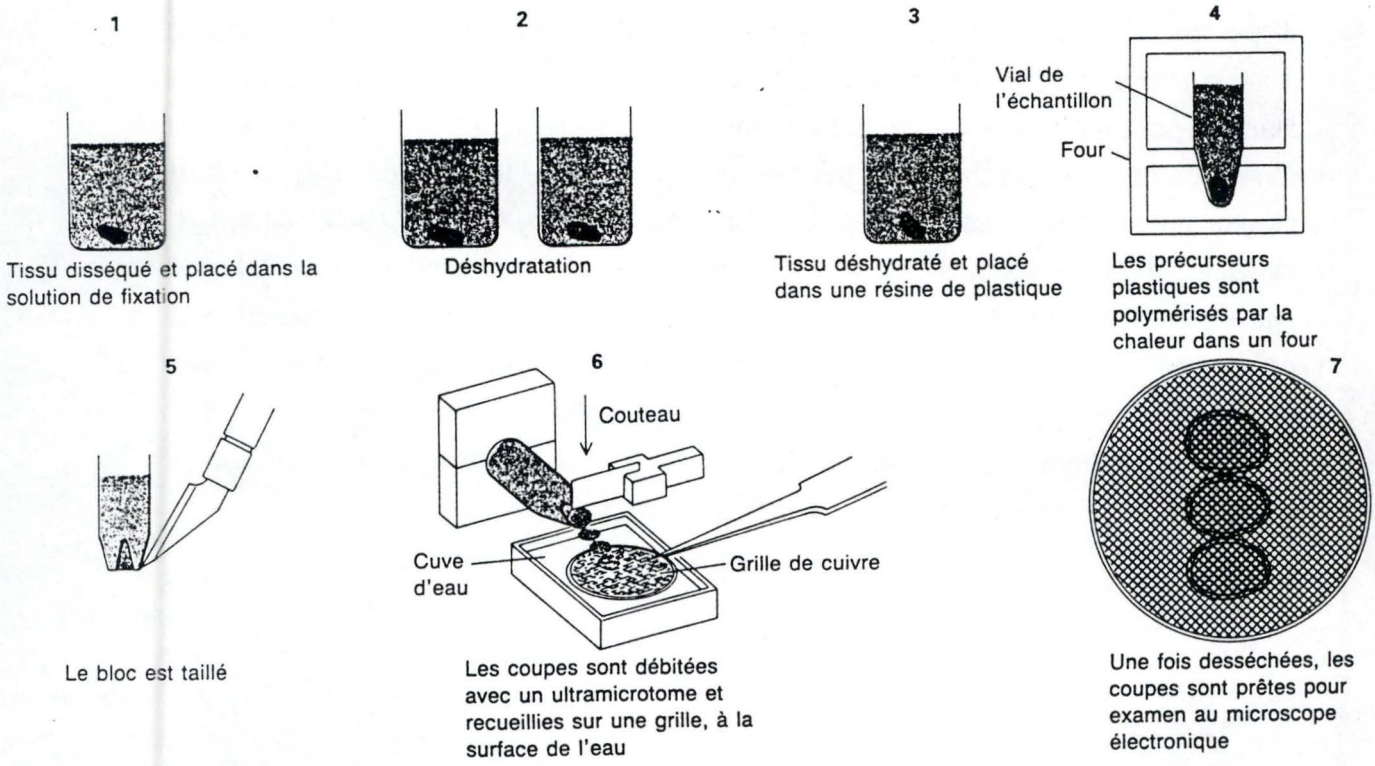
Les deux groupes aldéhydes de la glutaraldéhyde lui permettent d'effectuer la réticulation de divers types de molécules en formant entre elles des liaisons covalentes. Le tétroxyde d'osmium est réduit par de nombreux composés organiques avec lesquels il forme des composés réticulés. Il est spécialement utile pour fixer les membranes cellulaires, car il réagit avec les doubles liaisons C=C présentes dans de nombreux acides gras.



glutaraldéhyde tétroxyde d'osmium

Figure III.45 : Etapes de la préparation d'une coupe mince de tissu pour la microscopie électronique à transmission

1) La fixation rapide du tissu est importante pour dénaturer et stabiliser les protéines, les membranes et les autres constituants avant que ne commence la dégradation du matériel. Les tissus sont disséqués, coupés en petits cubes et plongés dans une solution qui fixe les protéines. La glutaraldéhyde est une solution de fixation fréquemment utilisée. Un autre fixateur, le tétroxyde d'osmium, contraste certaines macromolécules dont celles des membranes cellulaires.
2) La déshydratation du tissu est effectuée par des concentrations croissantes d'alcool ou d'acétone.
3) Le tissu déshydraté est immergé dans une résine de plastique qui l'enrobe.
4) L'échantillon est alors placé dans une étuve; la chaleur polymérise les résines en un plastique dur.
5) L'extrémité du bloc obtenu est taillée.
6) Des coupes d'une épaisseur inférieure à 0.1 μm sont débitées sur un ultramicrotome, instrument muni d'une lame en diamant. Les coupes sont recueillies à l'aide d'une grille de cuivre traitée ou non au carbone.
7) Après séchage, les coupes sont prêtes à être examinées.



III.6.2. Préparation des échantillons pour l'examen au ME

Tout échantillon étant exposé à un vide très poussé dans le ME, les tissus sont habituellement conservés par fixation; d'abord dans le glutaraldéhyde, qui établit des liaisons covalentes entre les molécules protéiques voisines. Puis le tétroxyde d'osmium, se fixe sur les doubles couches lipidiques, aussi bien que sur les protéines, et les stabilise. **(figure III.44)**.

Les électrons ayant un pouvoir de pénétration très limité, les tissus fixés doivent être normalement coupés en sections très fines (50 à 100 nm) avant d'être observés. Les étapes de la préparation d'une coupe mince de tissu pour la microscopie électronique à transmission sont montrées à la **figure III.45**.

Le contraste du microscope électronique dépend du nombre atomique des atomes de l'échantillon: plus le nombre atomique est élevé, plus les électrons sont dispersés et plus fort est le contraste. Les molécules biologiques sont composées d'atomes de nombre atomique très faible (principalement le carbone, l'oxygène, l'azote et l'hydrogène). La localisation des protéines s'est réalisée à l'aide d'anticorps monoclonaux conjugués à une anti-immunoglobuline de souris biotiné, reconnu par la streptavidine couplée à un marqueur dense aux électrons (généralement de minuscules sphères d'or métallique, appelées particules d'or colloïdal). Ces complexes permettent de localiser les protéines que les anticorps reconnaissent **(figure III.46)**.

III.6.3. Marquage de bactéries entières sur grilles de ME

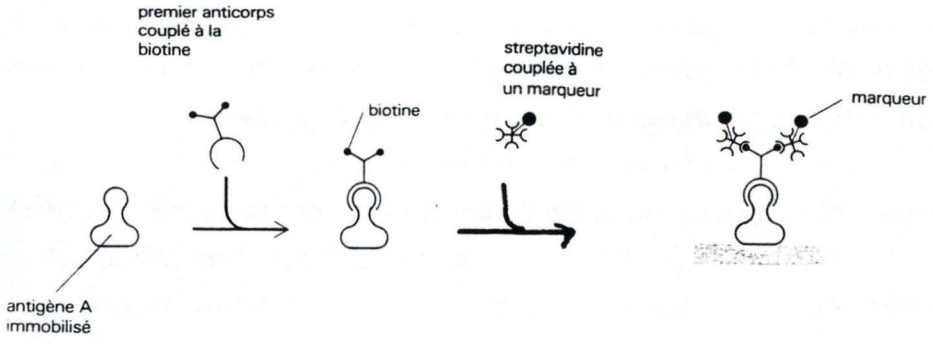
III.6.3.1. Matériel, Tampons

- Grilles de microscopie électronique utilisées: cuivre-300 mesh (carbone-formvar).
- Streptavidine couplée à l'or colloïdal (particules de 15 nm) (Auro Probe^{TM} streptavidin G15 RPN 443) (Amersham).
- Goat Anti Mouse Biotinylated (Anti-Mouse IgG2a, RPN.1181, lot 5).
- Tampon PBS (10 fois concentré):

KH_2PO_4	15mM
NaH_2PO_4	74mM
NaCl	1.37M
KCl	27mM, pH 7.4

Figure III.46 : Mode d'utilisation des anticorps pour localiser une molécule particulière avec une grande sensibilité

L'anticorps monoclonal se fixe à la molécule antigénique. Un deuxième anticorps, couplé à la biotine est alors amené et se fixe au premier anticorps. Ensuite, on exploite l'intéraction de haute affinité entre la streptavidine et la biotine; en effet, la streptavidine peut se fixer à une molécule de biotine. La détection est possible car la streptavidine est couplée à des sphères d'or colloïdal. (Alberts et al., 1989).



- Tampon PBS-EDTA-Tween:

PBS	100 mls
EDTA	18.1 gr
Tween 20	0.1%
H_2O	300 mls

- Tampon de lavage (NaCl-Tween) 10 fois concentré:

NaCl	90 gr
Tween 20	1 ml

Porter à un litre avec H_2O distillée.

III.6.3.2. Méthode

— Récolter les bactéries à partir d'une culture liquide.
— Laver 3 fois le culot bactérien au PBS.
— Déposer 5 μl de suspension bactérienne (10^{10} cellules/ml, ce qui correspond à une D O_{600} de 12.5) sur une grille carbone/formvar.
— Aspirer l'excédent et laisser sécher une à deux minutes.
— Saturer en déposant une goutte de PBS/BSA 3%.
— Laisser 30 minutes à 37°C.
— Incuber une heure à 37°C avec l'anticorps monoclonal dilué 3 fois dans du PBS-EDTA-Tween/BSA 1%.
— Laver par passage dans 12 gouttes de NaCl-Tween.
— Incuber une heure à 37°C avec le conjugué GAM-biotine, Goat Anti Mouse Biotinylated dilué 200 fois dans du PBS-EDTA-Tween/BSA 1%.
—Laver 6 fois au NaCl-Tween.
—Incuber 1 heure à 37°C avec la streptavidine couplée à l'or colloïdal, diluée 10 fois dans du PBS-EDTA-Tween/BSA 1%.
— Laver au NaCl-Tween; ensuite à l'eau distillée.
— Examiner la grille au microscope électronique à transmission (EM-301).

III.6.4. Détection immunologique dans les plaques de Terasaki

— Inoculer du milieu liquide (LB + ampicilline + tétracycline) avec une colonie bactérienne et incuber une nuit à 37°C.
— Centrifuger 15 minutes à 4000 rpm.
— Laver deux fois au PBS.

— Déposer 10 µl de suspension bactérienne (2.10^{10} bactéries /ml) par puits des microplaques de Terasaki (NUNC).
— Incuber 2 heures à 37°C.
— Laver 6 fois au NaCl-Tween.
— Incuber une heure avec une anti-immunoglobuline de souris biotinylée, diluée 200 fois dans du PBS-EDTA-Tween-Hydrolysat de caséine 1/25.
— Laver 6 fois au NaCl-Tween.
— Incuber une heure avec la streptavidine couplée à l'or colloïdal, diluée 20 fois dans du PBS-EDTA-Tween-Hydrolysat de caséine 1/25.
— Laver 6 fois au NaCl-Tween.
— Rincer 3 fois au PBS.
— Fixer à la glutaraldéhyde 2% (Fluka) une heure à température ambiante.
— Laver 3 fois 10 minutes dans du PBS.
— Effectuer un rinçage dans du tampon cacodylate 0.1M.
— Réaliser alors une post-fixation au tétroxyde d'osmium 1% par dépôt de 10 µl par puits.
— Laisser 30 minutes à température ambiante.
— Faire 3 rinçages de 10 minutes dans le tampon cacodylate avec dépôt de 10 µl par puits.
— Veiller à ce que les puits restent humides et incuber une nuit à 37°C.
— Observer les plaques au microscope inversé Leitz Diavert, muni d'un contraste de phase. Les bactéries positives se reconnaissent par la présence d'un anneau périphérique plus foncé.
— Les cellules sont alors déshydratées dans des solutions aqueuses d'éthanol à 25 (2X5 min), 50 (2X5 min), 70 (2X10 min), 94 (2X10 min) et 100% (3X10 min) à température ambiante.
— Les cellules sont ensuite enrobées dans un mélange (oxyde de propylène-épon 50/50) pendant 90 minutes.
— Après, les cellules sont rincées 2 fois une heure dans de l'épon 100%, pour évaporer les résidus d'alcool.
— Les cellules sont alors enrobées dans l'épon. La polymérisation se fait 24 heures à 37°C, puis 24 heures à 45°C et 48 heures à 60°C. Le mélange d'enrobage est constitué de 6.25 g d'anhydre dodécyényl succinique (DDSA), de 14.75 g d'Epon 812 (TAAB), de 8.55 g d'anhydre méthyl nadique (NMA, Ladd) et de 0.65 ml d'accélérateur (N,N-diméthylbenzylamide = DMP).
— Quand la polymérisation est terminée, les champs cellulaires sont choisis.
— Les petits blocs d'épon correspondant à ces champs sont découpés .

— Le substrat plastique est enlevé et le bloc d'épon est monté sur un ultramicrotome LKB III (LKB).
— Une pyramide est taillée dans le bloc et des coupes ultrafines (500 Å) sont réalisées.
— Les coupes sont déposées sur des grilles de cuivre.
— Coloration des grilles durant 20 minutes à l'obscurité par une solution d'acétate d'uranyle 2% dans de l'éthanol 50%, préparée extemporanément.
— Rincer les coupes.
— Ajouter alors la solution de citrate de plomb (pH basique) avec du citrate de sodium et de l'hydroxyde de sodium, durant 5 minutes.
— Examen des coupes au microscope électronique à transmission Philips EM 301.

III.7. FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

Cette méthode a pour but de séparer les constituants d'*Escherichia coli* en trois fractions:

enrichie en PI: protéines insolubles (paroi et membrane);
enrichie en PP: protéines de l'espace périplasmique;
enrichie en PS: protéines solubles (protoplasmiques).

III.7.1. Solutions, Tampons

- Tampon de lyse A:

Na_2HPO_4	10 mM
NaCl	30 mM
Tween 20	0.25%
EDTA, pH 8.0	10 mM

- Tampon de lyse B:

Tris-Cl	30 mM
sucrose	20%
EDTA, pH 8.0	1 mM

III.7.2. Protocole

— Inoculer 100 ml de milieu liquide (LB, ampicilline, tétracycline) avec une colonie bactérienne.
— Incuber la culture une nuit à 37°C sous agitation.

Figure III.47 : Structure du Triton-X114

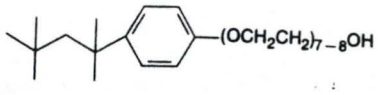
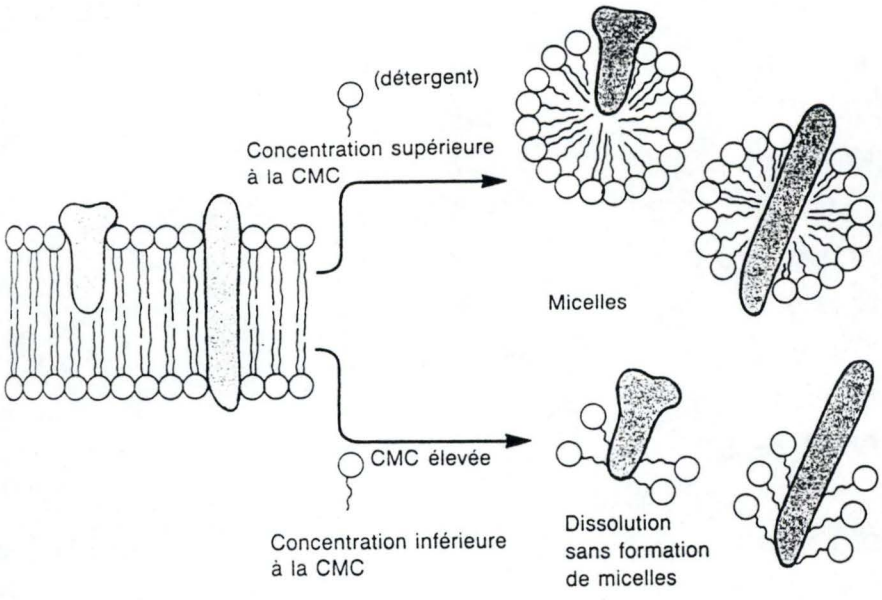


Figure III.48 : Comportement des détergents

L'addition à des membranes biologiques de détergents en concentrations plus élevées que les concentrations micellaires critiques (CMC) permet de solubiliser les lipides et les protéines membranaires intégrales et de former des micelles composées de détergents, de protéines et de lipides. Un détergent à CMC élevée peut dissoudre les protéines membranaires à des concentrations bien en-dessous de sa CMC, c'est-à-dire sans formation de micelles.



— Partager la culture en 2 fractions (A et B) et centrifuger à 5000 rpm durant 10 minutes (Sorvall, rotor SS34).

* Fraction A:
  - Resuspendre le culot bactérien dans 5 ml de tampon de lyse A.
  - Congeler les bactéries 30 minutes à -80°C.
  - Dégeler les bactéries dans l'eau froide.
  - Soniquer à une puissance moyenne: 5 fois 8 secondes.
  - Centrifuger les extraits à 10000 rpm durant 30 minutes à 4°C.
  - Récupérer le surnageant, qui représente la fraction des protéines solubles (PS).
  - Resuspendre le culot bactérien dans 5 ml de tampon de lyse A (+ 0.1% de Triton X-100).
  - Centrifuger dans les mêmes conditions.
  - Resuspendre le culot dans la solution suivante: NaCl 0.8%, Tris 20mM, SDS 1%, pH 7.4. Ceci représente la fraction des protéines insolubles (PI).

* Fraction B:
  - Resuspendre le culot bactérien dans 10 ml de tampon de lyse B.
  - Laisser 10 minutes à température ambiante sous agitation.
  - Centrifuger 10 minutes à 9000 rpm, à 4°C (Sorvall, rotor SS34).
  - Resuspendre le culot bactérien dans 10 ml de $MgSO_4$ 5mM.
  - Agiter les bactéries 10 minutes dans la glace.
  - Centrifuger dans les mêmes conditions.
  - Le surnageant représente les protéines périplasmiques libérées par choc osmotique.

Les trois fractions sont alors analysées en Western blot.

III.8. REPARTITION AU TRITON X-114

III.8.1. Principe (Bordier, 1981)

Les détergents non ioniques, comme le Triton X-114 **(figure III.47)**, n'ont pas de groupes chargés. Habituellement, ils solubilisent les membranes biologiques en formant des micelles combinant détergents, phospholipides et protéines membranaires intégrales **(figure III.48)**.

Ce détergent est homogène à 0°C et se sépare en deux phases: aqueuse et détergente à température ambiante. Ainsi, la répartition des protéines dans les deux

phases se fait de la façon suivante: les protéines hydrophiles se retrouvent dans la phase aqueuse; alors que les protéines membranaires intégrales de nature amphiphile se retrouvent dans la phase détergente. En effet, le Triton-X 114 remplace durant la solubilisation la plupart des lipides en contact avec le domaine hydrophobe de la protéine intégrale membranaire, conduisant à la formation d'une micelle mélangée de protéines et de détergent. Les protéines hydrophiles, elles, n'ont pas ou très peu d'intéractions hydrophobes avec des détergents non ioniques. Les protéines des différentes phases obtenues sont alors analysées par SDS-PAGE et Western blot.

III.8.2. Protocole

— Le Triton X-114 doit être précondensé; le protocole suivi est celui préconisé par Bordier (Bordier, 1981).
— Inoculer 50 ml de milieu liquide (LB+ampicilline+tétracycline) avec une colonie bactérienne et incuber une nuit à 37°C avec agitation.
— Récolter les bactéries par centrifugation et passer en eppendorf.
— Laver 3 fois les bactéries avec du tampon Tris 200mM, pH 8.0.
— Resuspendre le culot final dans 1 ml de tampon d'extraction (Tris 20mM, EDTA 10mM, Triton X-114 2%).
— Extraire (c'est-à-dire faire passer tous les composés solubles dans le tampon d'extraction) une nuit à 4°C sous agitation douce.
— Centrifuger 10 minutes à 4°C et à 13000 rpm, pour éliminer les constituants insolubles.
— Récupérer le surnageant.
— Placer alors 10 minutes dans un bain à 37°C pour obtenir une séparation de phases.
— Centrifuger 10 minutes à température ambiante pour séparer les deux phases.
— Récupérer ensuite les deux phases séparément et poursuivre l'extraction afin d'éliminer dans chacune d'elle les protéines contaminantes (à répéter 2 fois).
    - Prendre la phase Triton et ajouter une solution (Tris 20mM, EDTA 10mM, pH 8.0) pour obtenir un volume final de 1 ml.
    - Prendre la phase aqueuse et ajouter du Triton X-114 pour obtenir une concentration finale de 2%.
    - Homogénéiser.
    - Placer à 4°C sous agitation durant au moins une heure.
    - Mettre 10 minutes à 37°C.
    - Centrifuger 10 minutes à température ambiante.

Figure III.49 : Structure de l'acide palmitique

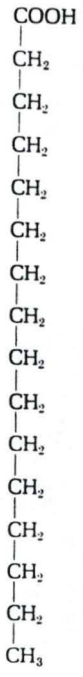


Figure III.50 : Poids moléculaires des protéines étalons (Amersham)

protéines	poids moléculaire
myosine	200000
phosphorylase b	97400
albumine bovine	69000
ovalbumine	46000
anhydrase carbonique	30000
lysozyme	14300

— Précipiter les protéines de la phase Triton à l'acétone en ajoutant 10 volumes d'acétone et en plaçant une heure à -80°C.
— Centrifuger alors 10 minutes et resuspendre le culot dans du tampon d'échantillon d'électrophorèse.
— Analyser les résultats par SDS-PAGE, suivi d'un Western blot.

III.9. TEST DE RADIOIMMUNOPRECIPITATION

III.9.1. Principe

Le test consiste à isoler d'une solution donnée un antigène marqué radioactivement en mettant la solution en présence des Ac Mo spécifiques, immobilisés sur un support. Dans notre cas, le mélange antigénique est marqué radioactivement par incorporation métabolique d'acide palmitique tritié (acide gras à 16C) **(figure III.49)**. Les complexes immuns formés sont dissociés et analysés par SDS-PAGE. Les antigènes radioactifs sont mis en évidence par fluorographie et autoradiographie.

III.9.2. Solutions, Tampons, Matériel

- Acide palmitique [9, 10 (n)- ^{3}H], 37.0 MBq/ml, 1.0 mCi/ml (Amersham).
- ^{14}C methylated protein mixture 1 μCi, 37 kBq (Amersham) **(figure III.50)**.
- Billes magnétiques: Dynabeads-M280 Sheep Anti-Mouse IgG-Dynal (Medichim).
- Solution Amplify (Amersham).

III.9.3. Protocole

III.9.3.1. Marquage des antigènes

— Inoculer 10 ml de milieu minimum M9 (pour les bactéries *E. coli*) ou de milieu RPMI (pour les *Brucella*) à partir d'une préculture.
— Quand la DO_{600} est de 0.1, ajouter 100 μl d'acide palmitique-^{3}H (10 μCi/ml).
— Lorsque la DO_{600} est de 0.8, centrifuger 15 minutes à 3000 rpm (Jouan). Eliminer le surnageant.
— Laver 3 fois le culot bactérien dans du Tris 200 mM pH 8.

Les bactéries subissent alors une extraction-répartition au Triton -X114, selon le protocole décrit au point III.8.

III.9.3.2. Capture des anticorps monoclonaux sur les billes

La capture des anticorps sur une matrice permet d'isoler l'antigène à partir d'une solution. Le support choisi est constitué de billes de polystyrène magnétiques recouvertes d'anticorps de mouton dirigés contre les immunoglobulines murines (SAM).

— Placer 30 µl d'une suspension de billes magnétiques SAM avec 1 ml d'Ac Mo sous forme dense (surnageant de culture d'hybridome), dilué 2 fois dans du TBS/BSA 0.1%.
— Incuber 16 heures à 4°C (avec rotation continue).
— Récupérer les billes avec un aimant.
— Laver 3 fois avec 1 ml de TBS/BSA 0.1%.

III.9.3.3. Immunoprécipitation

— Diluer 10 fois la phase détergente dans du tampon d'extraction-Triton X114 0.2%.
— Préclearing: ajouter à un ml de cette phase diluée 30 µl de billes magnétiques SAM durant 2 heures à 4°C (rotation continue).
— Récupérer le surnageant et le mettre en présence de billes couplées à l'Ac Mo et laisser une nuit à 4°C (rotation continue).
— Laver les billes 5 fois au TTBS.
— Faire bouillir les billes dans 25 µl de tampon d'échantillon pendant 5 minutes.
— Eliminer les billes.
— Les échantillons sont analysés par SDS-PAGE.

III.9.3.4. Fluorographie et autoradiographie

Le traitement des gels par fluorographie est préconisé pour amplifier la sensibilité de l'autoradiographie.

— Fixer les protéines dans la solution suivante: isopropanol, eau, acide acétique (25:65:10) pendant 30 minutes..
— Placer le gel dans la solution Amplify (Amersham) sous agitation durant 20 minutes.
— Sécher le gel.
— Placer le gel en étroit contact avec le film photographique (Fuji).

La masse moléculaire des protéines sera estimé grâce aux masses moléculaires des protéines étalons d'Amersham, marquées au ^{14}C.

A chaque étape du protocole, un aliquot des préparations traitées est prélevé et la radioactivité qui y est associée mesurée:
prendre x μl de prélèvement + 2 ml d'Ecoscint A, vortexer et mesurer la radioactvité au compteur LS 6000SC (Beckman).

RESULTATS

I. Présentation des *E. coli* recombinantes qui expriment les 3 OMPs mineures de *Brucella*.

I.1. Introduction

I.1.1. Rappels

Les bactériophages recombinants exprimant les OMPs mineures de *Brucella* ont été isolés de la banque génomique de *B. abortus,* établie dans λgt11, par criblage immunologique. Les inserts d'ADN de *Brucella*, délimités par les sites *Eco* RI ont été extraits de l'ADN phagique et clonés au site *Eco* RI d'un plasmide (pTZ, pBluescript ou pUC 19).

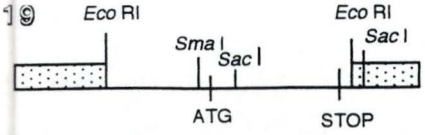
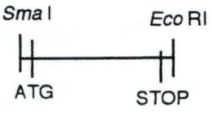
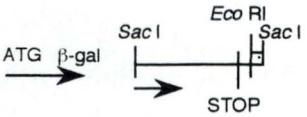
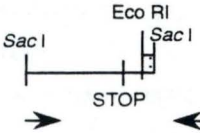
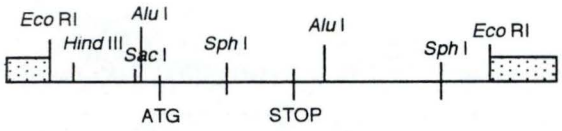
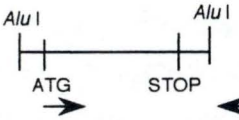
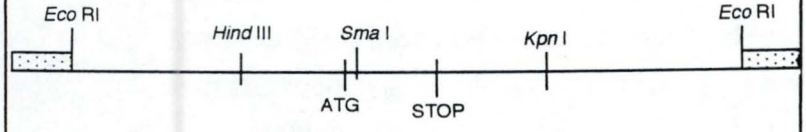
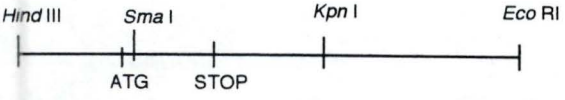
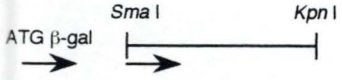
Dans un premier temps, il a été montré que les bactéries *E. coli* transformées par ces plasmides recombinants expriment dans les 3 cas (les OMPs de 19-, 16.5- et 10-kDa) une protéine recombinante dont la taille est équivalente à celle de la protéine native, présente dans les extraits de *Brucella* (dans les limites de résolution du SDS-PAGE et du Western blot).

Dans un deuxième temps, pour chaque gène, les cartes de restriction (= carte représentant les positions des sites de clivage d'une série d'enzymes de restriction) des différents fragments d'ADN de *Brucella* ont été établies. Sur base de ces cartes de restriction, des sous-clones ont été construits. Le plus petit fragment d'ADN, identifié comme contenant le gène entier codant pour l'OMP a été séquencé selon la méthode de Sanger. Dans la séquence nucléotidique, la phase ouverte de lecture (ORF = open reading frame, région de la séquence codant pour la protéine) a été localisée sur chaque gène et la séquence en acides aminés de la protéine correspondante a été déduite.

Ces 3 OMPs mineures de *Brucella* font l'objet de notre étude. Les clones d'*E. coli* recombinants (= bactéries contenant le plasmide portant le gène d'une des 3 OMPs) constituent un des outils à notre disposition dans ce travail.

Figure IV.51 : Carte des inserts et des différents sous-clones

La matrice plasmidique est représentée par un ensemble de points aux extrémités de l'insert d'ADN de *Brucella*.

Schéma de la construction	taille de l'insert (kb)	matrice plasmidique	expression	taille de la protéine par rapport à la protéine native de *Brucella*	
				=	>
OMP 19 	0.963	pTZ 18R (2.87 kb)	+	X	
19.06 	0.58	pBluescript SK- (2.96 kb)	+	X	
19.05F 	0.47	pTZ 18R	+ (IPTG)		X
19.28 	0.47	pTZ 18R	-		
OMP 16.5 					
16.18 	1.8	pTZ 18R	+	X	
16.20 	0.69	pBluescript SK-	-		
OMP 10 					
	3.3	pBluescript SK-	+	X	
10.22 	2.2	pBluescript SK-	+	X	
10.07F 	0.7	pBluescript SK-	+ (IPTG)		X
10.03 	1.6	pBluescript SK-	-		

I.1.2. Plasmides et bactéries recombinants : carte des inserts et expression de protéines recombinantes

Les différents sous-clones utilisés sont présentés à la **figure IV. 51**.

L'ADN plasmidique a été extrait par miniprep des différentes bactéries *E. coli* recombinantes. Le **tableau IV.8** présente les restrictions réalisées sur différents sous-clones.
Il est entendu que l'analyse par électrophorèse des mélanges de restriction n'est qu'une manière supplémentaire de présenter les plasmides recombinants **(figure IV.52)**.

Les profils de restriction présentés après électrophorèse en gel d'agarose correspondent à ceux obtenus sur base des cartes de restriction précédemment établies.

Les protéines de *Brucella* exprimées par ces bactéries recombinantes ont été détectées par immunodétection avec les Ac Mo anti-OMP. Pratiquement, des extraits totaux de ces bactéries sont séparés par SDS-PAGE et analysés par Western blot **(figure IV.53).**

Deux catégories de protéines recombinantes sont détectées:
1) certaines ont une masse moléculaire semblable -dans les limites de résolution du SDS-PAGE- à la protéine native de *Brucella* (19.06, 16.18 et 10.22);
2) d'autres ont une masse moléculaire supérieure à la protéine native de *Brucella* (19.05F et 10.07F).

Expliquons ces profils d'expression sur base des séquences nucléotidiques des matrices plasmidiques et des inserts d'ADN de *Brucella* **(figure IV.54)**:
1) L'insert des clones 19.06, 16.18 et 10.22 contient l'entièreté de la séquence codante du gène de l'OMP et ses signaux d'expression. Les résultats de diverses équipes (Halling et al., 1991; de Wergifosse, 1992) montrent que les gènes de *Brucella* s'expriment chez *E. coli* à partir de leur promoteur. Nos données indiquent que les gènes des OMPs 19, 16.5 et 10 s'expriment également chez *E. coli*. La séquence en acides aminés déduite de la séquence nucléotidique contient, pour chaque OMP, un peptide-signal qu'on suppose être clivé au cours du processus de sécrétion. Les OMPs détectées dans les extraits totaux de *Brucella* correspondent à la forme mature, c'est-à-dire processée et modifiée par des acides gras (s'il s'agit, comme

Tableau IV. 8 : Restrictions réalisées pour les sous-clones considérés et taille attendue des fragments

Sous-clone	enzymes de restriction	taille des fragments
19.05F	*Sac* I *Eco* RI	0.47 kb et 2.87 kb 0.47 kb et 2.87 kb
19.06	*Eco* RI	3.54 kb
16.18	*Eco* RI	1.8 et 2.87 kb
10.22	*Hind* III-*Eco* RI	2.2 kb et 2.87 kb
10.07F	*Sma* I-*Kpn* I	0.7 kb et 2.96 kb

Figure IV.52 : Analyse par électrophorèse en gel d'agarose 0.8% des mélanges de restriction de l'ADN plasmidique extrait par miniprep.

La taille des fragments a été estimée par comparaison avec des étalons de taille II et VIII (Boerhinger).

1. étalon de taille II et VIII (pb)
2. 19.05F (*Sac* I)
3. 19.05F (*Eco* RI)
4. 19.06 (*Eco* RI)
5. 16.18 (*Eco* RI)
6. 10.22 (*Hind* III-*Eco* RI)
7. SK+ (*Eco* RI)
8. 10.07F (*Sma* I-*Kpn* I)

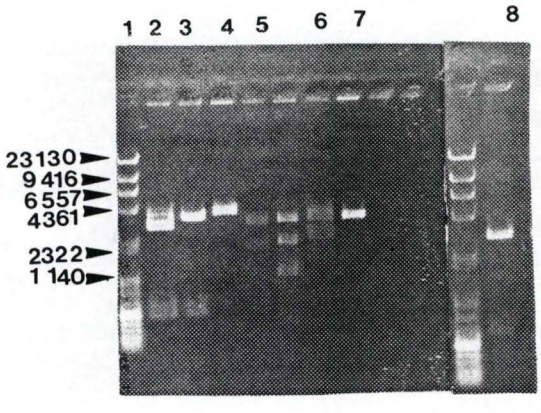
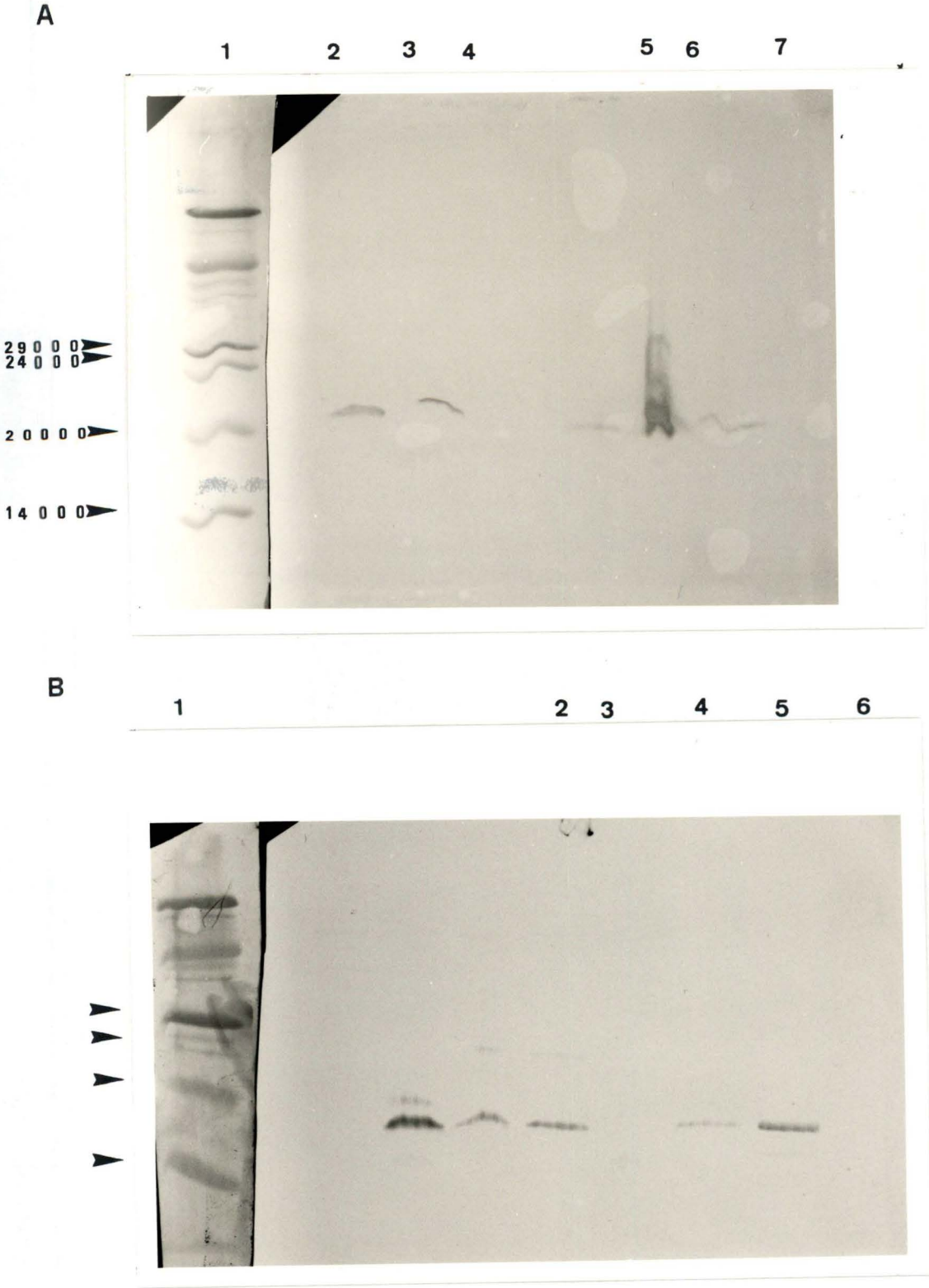


Figure IV.53 : SDS-PAGE suivi d'un Western blot sur des extraits totaux d'*E. coli* recombinantes

Le témoin positif est fourni par la protéine native de *Brucella* présente dans un lysat total de *B. abortus* 544 ou de *B. melitensis* B115. Le contrôle négatif est apporté par un extrait d'*E. coli* non recombinant (c'est-à-dire transformé par pBluescript). La révélation s'est déroulée avec les AcMo anti-19 kDa A68/25H10/A5 (**A**), anti-16.5 kDa A68/04G1/C6 (**B**) et anti-10 kDa A68/07G11/C10 (**C**).

A. 1. étalon de masse moléculaire (Da)
2. 19.05F (avec IPTG)
3. 19.05F (sans IPTG et sans glucose)
4. 19.05F (avec glucose)
5. 19.06
6. *B. abortus* 544
7. 19.28

B. 1. étalon de masse moléculaire (Da)
2. 16.18
3. 16.20
4. *B. abortus* 544
5. *B. melitensis* B115
6. SK+



C. 1. étalon de masse moléculaire (Da)
2. SK+
3. *B. abortus* 544
4. 10.22
5. 10.07F
6. 10.03

C



Figure IV.54 : Schéma représentant ce que sont les protéines de fusion 19.05F et 10.07F

***Sma* I**

19.06 : cc cgg ggc gcg ccc cca ccc ctg atg aga aat gcg caa atg gag aac ctg atg gga
met arg asn ala gln met glu asn leu met gly

att tca aaa gca agt ctg ctc agc ctc gcg gcg gct ggc att gtc ctg gcc ggg tgc
ile ser lys ala ser leu leu ser leu ala ala ala gly ile val leu ala gly **cys**

***Sac* I**

cag agc tcc cgg
gln ser ser arg

19.05F : atg acc atg att acg acg cca agc tcg aaa tta acc ctc act aaa ggg aac aaa agc
met thr met ile thr asn ser ser ser arg leu gly asn leu asp asn val ser pro

***Sac* I**

tgG AGC TCC CGG
trp SER SER ARG

La séquence de 19.06 est représentée avec le peptide-signal (les 30 premiers acides aminés), le tétrapeptide consensus est souligné et le résidu cystéine est indiqué en gras.
La séquence de 19.05F, la protéine de fusion dépourvue de peptide-signal montre les 19 acides aminés de la ß-galactosidase (représentés en minuscules) et les acides aminés de l'OMP 19 sont montrés en majuscules.
Les sites de restriction sont également indiqués.

10.22 : atg gag agc atg gac atg aaa cgc tcc cgc atc ctt gcc ccc ctc gca ctc atg tcg ctt
met glu ser met asp met lys arg phe arg ile val ala pro leu ala leu met ser leu

***Sma* I**

gcg ctg gct gct tgc gaa aca aca ggc ccg ggc
ala leu ala ala **cys** glu thr thr gly pro gly

10.07F : atg acc atg att acg cca agc gcg caa tta acc ctc act aaa ggg aac aaa agc
met thr met ile thr pro ser ser glu leu thr leu thr lys gly asn lys ser

tgg gta ccg ggc ccc ccc tcg agg tcg acg gta tcg ata agc ttg ata tcg aat
trp ser ser thr ala val ala ala ala leu glu leu val asp pro pro gly ser

***Sma* I**

tcc tgc agc ccG GGC AGC GGC AAT GCC
gly asn ala pro GLY SER GLY ASN ALA

La séquence de 10.22 est représentée avec le peptide-signal. Le tétrapeptide consensus est souligné et le résidu cystéine est indiqué en gras.
La séquence de la protéine de fusion 10.07 est indiquée avec les premiers acides aminés de la ß-galactosidase en minuscules et la suite de l'OMP 10 est en majuscules.
Les sites de restriction sont indiqués.

proposé, de lipoprotéines). La masse moléculaire des protéines native et recombinante étant semblable, la maturation des OMPs de *Brucella*, ou du moins le clivage du peptide-signal, semble efficient chez *E. coli*.

2) Les sous-clonages conduisent à la construction d'un gène chimérique avec conservation de la phase de lecture entre les premiers codons de *lac Z'* (matrice plasmidique) et la séquence codante de l'OMP 19 ou 10 dépourvue du peptide-signal. Une protéine de fusion entre la portion N-terminale de la ß-galactosidase et la séquence mature de l'OMP est donc synthétisée sous la dépendance du promoteur/opérateur *lac*. Cette protéine a par conséquent (comme constaté ci-dessus) une masse moléculaire supérieure à celle de l'OMP native mature. Le tableau suivant nous montre la masse moléculaire de ces différentes protéines, calculée sur base des séquences protéiques déduites.

OMP considérée		protéine préprocessée (avec peptide-signal)	protéine mature (sans peptide-signal et avec lipides)	protéine de fusion
OMP 19	Masse Moléculaire	18680 Da	15665 Da	16316 Da
	nombre d'acides aminés	187	157	162 *(19)
OMP 10	Masse Moléculaire	13844 Da	12000 Da	14138 Da
	nombre d'acides aminés	132	107	135 *(39)

* ( ) = nombre d'acides aminés apportés par la ß-galactosidase.

Le qualificatif mature signifie pour nous que le peptide-signal a été clivé et que la protéine (selon notre hypothèse de travail) aurait été modifiée par un glycérol et 3 acides gras (qui cumulés réprésentent une masse moléculaire d'environ 800 Da, en considérant l'acide palmitique comme acide gras principal).

Figure IV.55 : Schéma explicatif du choix des oligos

La position des oligos sur la séquence du gène de l'OMP 16.5 est indiquée. Les deux oligos utilisés sont notés en caractères gras et les sites de restriction sont soulignés.

* Séquence du côté 5' de l'ORF

5' GCC GGC TGT GCG TCA AAG AAG AAC CTT -----**3'**
ala gly cys ala ser lys lys asn leu

3' A CGC AGT TTC TTC TTG GAA -----**5'**

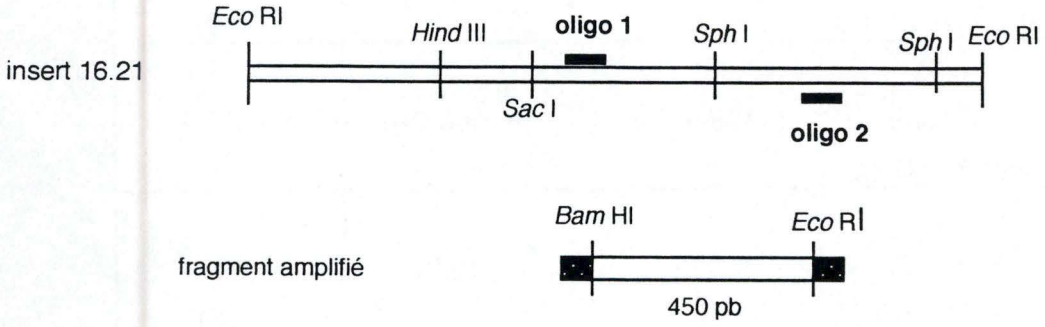
TGCGGATCC T GCG TCA AAG AAG AAC CTT
Bam HI
oligo 1

* Séquence du côté 3' de l'ORF

5' ----- C AAC GGG GCC GGA CGG TAA **3'**
asn gly ala gly arg OCH

3' **G TTG CCC CGG CCT GCC ATT CTT AAG GTT 5'**
Eco RI

oligo 2



L'IPTG, inducteur synthétique de l'opéron lactose, augmente l'expression de ces protéines de fusion; alors que l'expression des OMPs recombinantes à partir de leur gène entier (cas 1) est indépendante de l'IPTG.

Signalons que ces inserts, dépourvus des 30 premiers codons des ORF des OMPs 19 et 10, clonés dans le sens inverse par rapport à *lac Z* (clones 19.28 et 10.03) ne donnent lieu à l'expression d'aucune OMP. En effet, en amont de ces inserts, la matrice plasmidique ne contient ni promoteur ni signaux de traduction pour permettre leur expression.

Ainsi, parmi les *E. coli* recombinantes, certaines expriment une protéine recombinante dont la masse moléculaire paraît semblable à celle de la protéine native de *B. abortus* 544 ou *B. melitensis* B115. D'autres expriment une protéine de fusion (expression induite par l'IPTG), dépourvue de peptide-signal. L'étude comparative de ces 2 types de clones sera très instructive pour l'analyse de la nature lipoprotéique et de la localisation des 3 OMPs. Enfin, certaines constructions ne conduisent à aucune expression parce que le gène n'est pas entier et qu'il n'a pas été placé sous le contrôle des signaux d'expression d'*E. coli*.

I.2. Obtention d'une protéine de fusion sans peptide-signal pour l'OMP 16.5

Nous avons voulu comme pour l'OMP 19 et l'OMP 10 disposer d'un plasmide recombinant qui code pour l'expression d'une protéine contenant la séquence en acides aminés de l'OMP 16.5 mature, c'est-à-dire dépourvue de peptide-signal. Cette construction sera réalisée en amplifiant par PCR la séquence codante située en aval du peptide-signal et en clonant ce fragment amplifié dans un plasmide.

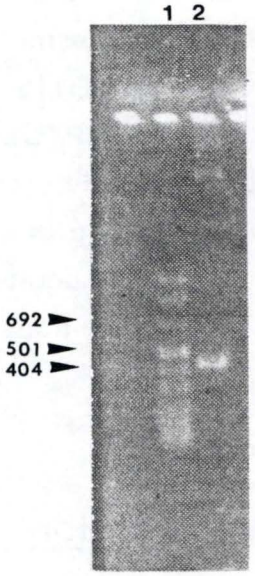
I.2.1. Amplification PCR

I.2.1.1. Choix des oligos (figure IV.55)

Nous avons utilisé 2 oligos s'hybridant l'un en amont, l'autre en aval du fragment d'ADN à amplifier. L'oligo 1 a été synthétisé de façon à s'hybrider à la séquence codante de l'OMP 16.5 à partir du codon suivant la cystéine, la séquence codant pour le

<u>Figure IV.56</u> : Analyse sur gel d'agarose 2% du produit PCR

Piste 1: étalon de taille VIII (pb).
Piste 2: produit PCR après Magic Preps PCR



peptide-signal n'étant donc pas amplifiée. L'oligo 2 s'hybride juste en aval du codon STOP de l'ORF de l'OMP 16.5. Les extrémités 3'OH des oligos servent d'amorces à l'ADN polymérase; chacun des brins du fragment servant de matrice à l'enzyme pour synthétiser les brins complémentaires.
Pour ce type d'application, les oligos ont généralement une longueur de 18 à 28 nucléotides. Chaque oligo contient un site de restriction afin de faciliter le clonage du fragment amplifié au site multiple de clonage du plasmide pBluescript SK+. Les 2 sites choisis sont *Bam* HI du côté 5' et *Eco* RI du côté 3' de l'ORF. Les oligos 1 et 2 ont été synthétisés par la firme Innogenetics (Ghent); leurs concentrations respectives sont 112 pmol/μl et 93 pmol/μl. Les températures d'hybridation des oligos ont été évaluées; elles sont de 54°C et de 50.7°C respectivement (le détail de ce calcul est explicité dans la partie "Matériel et Méthodes"). Nous avons réalisé les hybridations successives à 58°C.

I.2.1.2. Choix du plasmide

La partie amplifiée de l'ORF 16.5 étant dépourvue de l'ATG initiateur de traduction, elle doit être clonée en phase avec le début d'une autre ORF pour s'exprimer. Le plasmide pBluescript contient l'ORF *lac Z'* dans laquelle est insérée une batterie de sites de clonage. Le clonage du fragment amplifié aux sites *Bam* HI et *Eco* RI de cette batterie place l'OMP 16.5 en phase avec les premiers codons de *lac Z'*.

I.2.1.3. Amplification : réaction PCR

Une réaction PCR nécessite la présence d'au moins 50 molécules de plasmide. Nous avons utilisé un large excès ($1.83.10^{11}$ molécules) du plasmide 16.21 (purifié par midiprep et quantifié après électrophorèse, coloration au bromure d'éthidium et comparaison à l'étalon de taille) qui contient l'entièreté du gène de l'OMP 16.5.

La réaction PCR (destinée à amplifier le fragment d'ADN compris entre l'oligo 1 et l'oligo 2 à partir du plasmide 16.21) comprend les différents cycles présentés dans la partie "Matériel et Méthodes", avec un ordre bien déterminé: dénaturation-hybridation-polymérisation. Lorsque les 36 cycles sont terminés, une purification par Magic Preps PCR (Promega) est réalisée. Un aliquot de la solution récoltée est alors analysé par électrophorèse en gel d'agarose 2%. La **figure IV.56** présente le résultat obtenu; une bande apparaît à une taille d'environ 450 pb, taille attendue pour le fragment amplifié. La quantité d'ADN amplifiée est évaluée à 100 ng.

I.2.2. Clonage dans le plasmide pBluescript

Le produit de la réaction PCR et le plasmide pBluescript ont été restreints par les enzymes de restriction *Bam* HI et *Eco* RI afin de permettre le clonage du fragment amplifié par PCR au site multiple de clonage du plasmide pBluescript SK+.

Le mélange de restriction de pBluescript par *Bam* HI et *Eco* RI contient 2 fragments: la matrice plasmidique limitée par les sites *Bam* HI et *Eco* RI (2940 pb) et le fragment de 18 pb compris entre ces deux sites. La matrice est séparée de ce minuscule fragment par électrophorèse de la totalité du mélange de restriction en gel d'agarose 0.8%. Le fragment *Bam* HI-*Eco* RI de 2940 pb a été extrait du gel par la méthode du Geneclean (Westburg). Le dixième du volume récupéré a été analysé par électrophorèse en gel d'agarose de manière à quantifier la récupération d'ADN. Nous considérons que l'ADN récupéré équivaut à 30 ng/µl.

Quant au produit PCR après restriction des 100 ng par *Bam* HI et *Eco* RI, nous en avons précipité l'ADN à l'éthanol. Nous décidons d'évaluer grossièrement les pertes d'ADN au cours de ces étapes à 50%; considérons que nous disposons donc de 50 ng du fragment amplifié restreint.

Lors de la réaction de ligation, cette quantité de produit PCR restreint est mise en présence de la T4 DNA ligase et du pBluescript SK+ *Bam* HI-*Eco* RI extrait du gel. Le tableau ci-dessous présente les éléments engagés dans la réaction.

taille des fragments engagés	rapport du nombre de molécules	nombre approximatif de ng d'ADN engagé
450 pb (=produit PCR *Bam* HI-*Eco* RI)	2	50
2940 pb (=matrice plasmidique *Bam* HI-*Eco* RI)	1	160

La réaction de ligation peut aboutir à différentes constructions dont une seule nous intéresse. Pour individualiser chacune de ces constructions, nous avons transformé des cellules compétentes *E. coli* XL1-blue avec le mélange de ligation. Après

Figure IV.57 : Analyse sur gel d'agarose 0.8% de l'ADN plasmidique extrait des bactéries par miniprep.

L'ADN a été restreint par les enzymes de restriction *Bam* HI et *Eco* RI.

1. colonie n°15
2. étalon de taille II (pb)
3. étalon de taille VIII (pb)

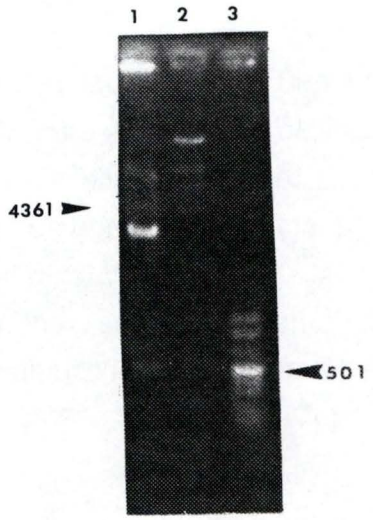
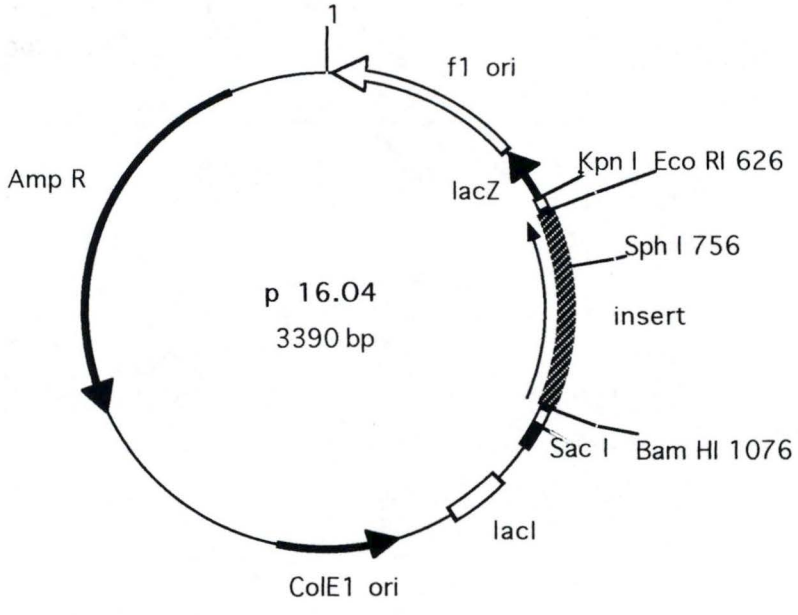


Figure IV.58 : Carte de la construction p16.04F.

f1 (f1 ori), origine de réplication phagienne.
AmpR, gène de résistance à l'ampicilline.
ColEI ori, origine de réplication.
Lac Z', début du gène de la ß-galactosidase.
Lac I, portion du gène codant pour le répresseur.
Insert, fragment de 450 pb (amplifié par PCR).



étalement sur milieu sélectif (ampicilline), seules les bactéries transformées par un plasmide portant le marqueur de résistance à l'ampicilline se multiplient; ce marqueur est apporté par la matrice pBluescript.

Parmi les plasmides transformants, certains contiennent un insert au niveau de leur site multiple de clonage (= plasmides recombinants) et d'autres n'en contiennent pas (= plasmides non recombinants).

La distinction entre les bactéries recombinantes et les bactéries non recombinantes est possible grâce au test de discrimination blanc/bleu. En effet, en présence de X-gal et d'IPTG dans le milieu d'étalement, nous obtenons une série de colonies non recombinantes bleues et de colonies blanches supposées recombinantes (voir explication dans le chapitre "Matériel et Méthodes").

Nous avons récupéré 24 colonies blanches; elles ont alors été cultivées dans du milieu liquide sélectif (LB + ampicilline). L'ADN plasmidique a été extrait des bactéries par miniprep. Un échantillon de l'ADN récupéré a ensuite été restreint par les enzymes *Bam* HI et *Eco* RI, afin de vérifier après électrophorèse en gel d'agarose la présence de l'insert dans le plasmide **(figure IV.57)**. Parmi les 24 échantillons d'ADN plasmidique, seul le clone 15 présente une bande correspondant à l'insert de taille attendue, c'est-à-dire 450 pb. Ce plasmide recombinant formé d'un pBluescript contenant un insert de 450 pb a été appelé 16.04F **(figure IV.58)**.

Sur base de la carte de restriction du gène codant pour l'OMP 16.5, une double restriction supplémentaire a été réalisée (*Bam* HI-*Sph* I) pour confirmer l'identité de l'insert; théoriquement, elle doit générer des fragments de 3080 pb et de 330 pb. **(figure IV.59)**. Nous observons après analyse électrophorétique en gel d'agarose un fragment d'environ 3000 pb et un second compris entre 404 et 310 pb, correspondant donc aux tailles attendues.

I.2.3. Test de l'expression de l'OMP 16.5 par les bactéries *E. coli* transformées par le plasmide 16.04F

Des extraits totaux d'*E. coli* recombinantes 16.04F ont été analysés par SDS-PAGE suivi d'un transfert sur une feuille de nitrocellulose et d'une immunodétection à l'aide d'AcMo anti-OMP 16.5 **(figures IV.60 et IV.64)**.

Figure IV.59 : Analyse en gel d'agarose 2% de la double restriction *Bam* HI-*Sph* I pour la construction p16.04F à partir de l'ADN plasmidique extrait des bactéries par miniprep.

1. étalon de taille II et VIII (pb).
2. 16.04F (*Bam* HI-*Sph* I)

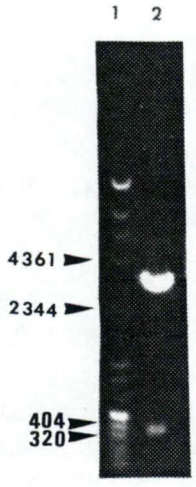


Figure IV.60 : SDS-PAGE suivi d'un Western blot d'extraits totaux d'*E. coli* transformées par p16.04F.

La détection s'est réalisée à l'aide de l'AcMo anti-16.5-kDa A68/4G1/C6 et la révélation s'est déroulée avec RAM-protéine A peroxydase.

1. étalon de masse moléculaire (Da)
2. 16.04F (IPTG)
3. 16.04F (sans glucose et sans IPTG)
4. 16.04F (avec glucose)

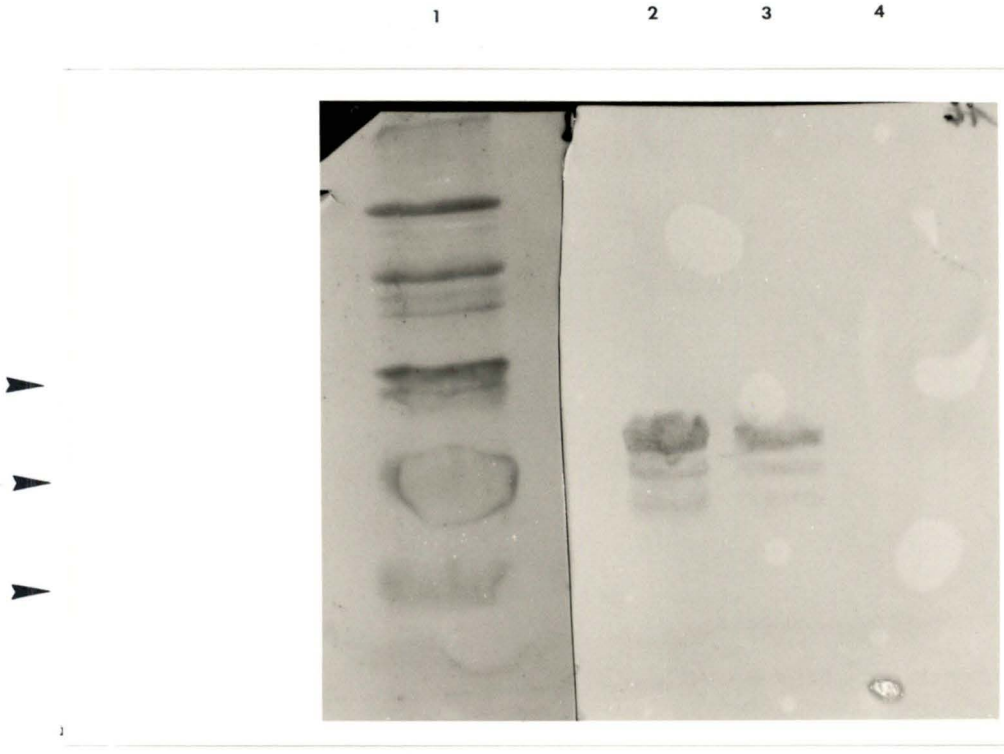


Figure IV.61 : Schéma représentant la protéine de fusion 16.04F.

16.18 : atg cgc cgt atc cag tcg att gca cgt agc ccg atc gct att gcg ctt ttc atg tcg
met arg arg ile gln ser ile ala arg ser pro ile ala ile ala leu phe met ser

ctc gcc gtt gcc ggc tgt gcg tca aag aag aac ctt ccg
leu ala val ala gly **cys** ala ser lys lys asn leu pro

16.04F : atg acc atg att acg cca agc tcg gaa tta acc ctc act aaa ggg aac aaa agc
met thr met ile thr pro ser ser glu leu thr leu thr lys gly asn lys ser

tcc acc gcg gtg gcg gcc gct cta gaa cta gtg gat ccT GCG TCA AAG
ser thr ala val ala ala ala leu glu leu val asp pro ALA SER LYS

La séquence de 16.18 est représentée avec le peptide-signal. Le tétrapeptide consensus est souligné et le résidu cystéine est indiqué en caractères gras.
La séquence de la protéine de fusion 16.04F est indiquée avecles premiers acides aminés de la ß-galactosidase en minuscules et la suite de l'OMP 16.5 est noté en majuscules.

La protéine recombinante reconnue par l'AcMo anti-OMP 16.5 est exprimée même en absence d'IPTG. Cependant, l'IPTG intensifie l'expression. Comme attendu, la taille de la protéine observée est supérieure à la taille de la protéine native de *Brucella*. Expliquons ce profil d'expression sur base des séquences nucléotidiques de la matrice plasmidique et de l'insert d'ADN de *Brucella* **(figure IV.61)**. Le tableau suivant présente les masses moléculaires des protéines recombinantes calculées sur base des séquences nucléotidiques codantes.

	protéine native (avec peptide-signal)	protéine mature (sans peptide-signal et avec lipides)	protéine de fusion
Masse moléculaire	18221 Da	16467 Da	18995 Da
nombre d'acides aminés	169	144	177 * (30)

* ( ) = nombre d'acides aminés apportés par la ß-galactosidase.

Le problème des bandes multiples observées pour les extraits de 16.04F sera abordé dans le chapitre "Discussion".

Puisque la protéine recombinante exprimée par le clone 16.04F est reconnue par l'AcMo anti-OMP 16.5 et que l'expression est stimulée par l'IPTG, la phase de lecture est conservée d'une ORF à l'autre et il s'agit donc très probablement d'une protéine de fusion.

Les connections pBluescript-insert aux sites *Bam* HI (extrémité 5' de l'insert) et *Eco* RI (côté 3' de l'insert) ont été séquencées par la méthode de Sanger aux didéoxynucléotides. L'ADN plasmidique de 16.04F préparé par midiprep et des oligos commerciaux s'hybridant à pBluescript de part et d'autre du site multiple de clonage ont été utilisés pour ce séquençage. Le résultat confirme que l'insert est cloné aux sites voulus de pBluescript et que la phase de lecture est conservée entre *lac Z'* et l'OMP 16.5, dépourvue du peptide-signal et de la cystéine.

Ainsi, à ce stade, trois clones (19.05F, 16.04F et 10.07F) expriment une protéine de fusion entre les premiers acides aminés de la ß-galactosidase et l'OMP dépourvue

de peptide-signal et de cystéine. Cette expression doit se trouver sous la dépendance du promoteur/opérateur de l'opéron lactose. *Lac* I, gène codant pour le répresseur de l'opéron *lac* est surexprimé (mutation *lac* I^q porté par l'épisome F'). Dans notre cas, la levée de la répression devrait être réalisée par l'inducteur, l'IPTG. On s'attend donc à ne détecter une expression qu'en présence d'IPTG. Les résultats obtenus indiquent qu'il y a expression même sans IPTG, mais l'addition d'IPTG intensifie l'expression.
Une bactérie contient quelques centaines de copies de pBluescript et donc de l'opérateur *lac*. Une inhibition totale du promoteur *lac* exige la liaison d'un répresseur à chaque opérateur. L'expression détectée en absence d'IPTG pourrait être la conséquence d'un nombre insuffisant de molécules de répresseur par bactérie pour bloquer toutes les copies promoteur/opérateur *lac*.

Nous nous permettons maintenant une petite digression en exploitant l'autre mode de régulation de l'opéron *lac* : la répression catabolique par le glucose.

I.3. Effet du glucose sur l'expression de protéines de fusion

La répression catabolique par le glucose permet à la bactérie d'utiliser préférentiellement le glucose comme source d'énergie.
Si le glucose et le lactose sont présents simultanément, l'expression de l'opéron lactose et donc la synthèse de la ß-galactosidase est réprimée tant que le glucose est présent. Les études réalisées suggèrent qu'un produit de la dégradation du glucose empêche l'induction de l'opéron *lac* par le lactose; c'est pourquoi cet effet fut appelé initialement répression catabolique. L'effet de ce produit du catabolisme du glucose, dont l'identité précise n'a pas encore pu être déterminée, s'exerce par l'intermédiaire de l'AMPc. La concentration en AMPc est inversément proportionnelle à la concentration en glucose.

Le facteur de contrôle de cet opéron est une protéine appelée CAP (Catabolite Activator Protein) ou CRP (Cyclic AMP Receptor Protein) qui est activée par l'AMPc. Le complexe CAP-AMPc se lie à l'ADN au site de liaison à la CAP, à proximité du promoteur dans le cas de l'opéron lactose, permettant le démarrage de la transcription à partir de ce promoteur (Suzuki, 1989; Lewin, 1983):

- en présence de glucose, le taux d'AMPc est trop faible pour activer la CAP; la transcription n'a pas lieu.

Figure IV.62 : SDS-PAGE suivi d'un Western blot d'un extrait total de *E. coli* transformées par p10.07.

La détection immunologique s'est faite à l'aide de l'AcMo A68/7G11/C10 et révélation avec RAM-protéine A peroxydase.

1. étalon de masse moléculaire (Da).
2. 10.07F (sans IPTG et sans glucose).
3. 10.07F (avec IPTG).
4. 10.07F (avec glucose).



- en absence de glucose, le taux d'AMPc augmente, activant la CAP; ainsi, la transcription peut avoir lieu.

Dans le cas des bactéries *E. coli* recombinantes, contenant un plasmide codant pour une protéine de fusion ß-galactosidase-OMP de *Brucella* (c'est le cas pour 19.05F, 16.04F et 10.07F), l'expression de ces protéines, placée sous le contrôle du promoteur/opérateur de *lac Z,* devrait être inhibée en présence de glucose. Ces bactéries recombinantes ont été cultivées dans différentes conditions:

- sans glucose et sans IPTG;
- avec IPTG;
- avec glucose.

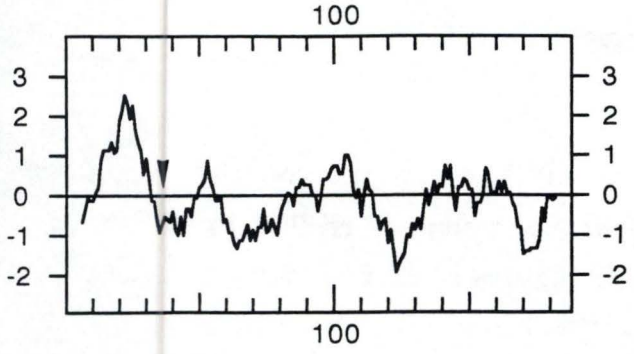
Les extraits bactériens totaux ont été analysés par électrophorèse en SDS-PAGE suivie d'un Western blot utilisant des Ac Mo anti-OMP **(figures IV.62, 60 et 53)**.

Nous observons comme précédemment que sans l'inducteur IPTG, l'expression des protéines recombinantes est plus faible que si la culture s'est faite en présence d'IPTG; par contre, le glucose inhibe tout à fait leur expression.

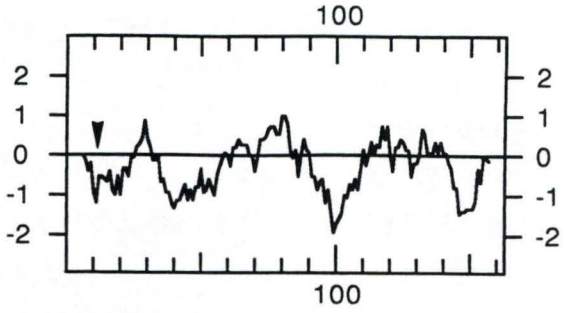
Figure IV.63 : Profils d'hydrophobicité des protéines recombinantes obtenus selon l'algorithme de Kyte et Doolittle.

Au niveau des protéines recombinantes entières exprimées par les clones 19.06, 16.18 et 10.22, la flèche indique la fin du peptide-signal.
Pour les protéines exprimées par les clones 19.05F, 16.04F et 10.07F, la flèche indique l'endroit de la protéine où a lieu la fusion entre la ß-galactosidase et l'OMP de *Brucella*.

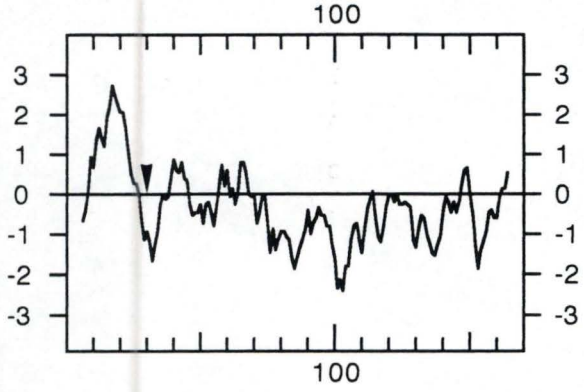
19 .06



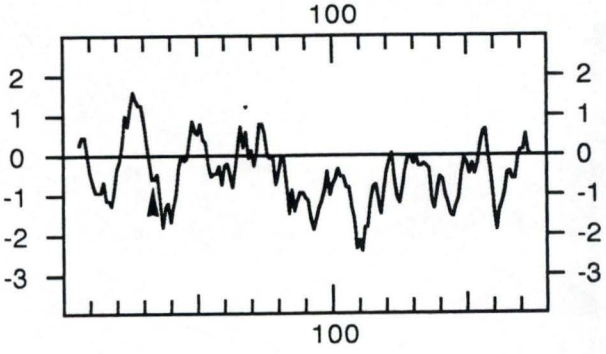
19 .05F



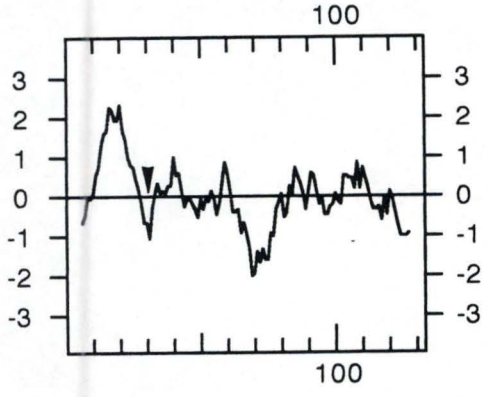
16 .18



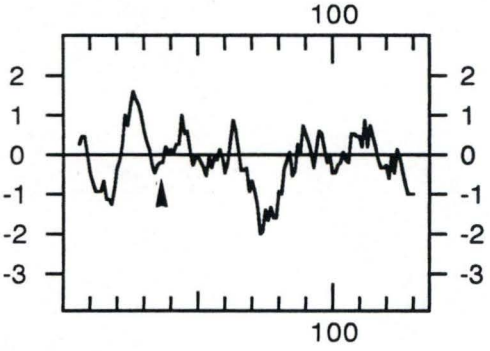
16 .04F



10.22



10 .07F



II. Localisation des OMPs chez les *E. coli* recombinantes

Les OMPs recombinantes exprimées chez *E. coli* à partir du gène entier ont la même masse moléculaire apparente que les OMPs natives matures de *Brucella*. Nous en déduisons que ces OMPs semblent être processées chez *E. coli*, du moins le peptide-signal serait-il clivé.

Nous avons donc exploité les outils "bactéries recombinantes" à notre disposition dans le but d'étudier la nature de ces 3 OMPs. Deux méthodes de caractérisation de ces protéines ont été menées en parallèle:

- localisation des protéines dans les fractions soluble, insoluble ou périplasmique;
- étude de l'exposition en surface.

Deux catégories de bactéries recombinantes seront utilisées:

- Les clones 19.06, 16.18 et 10.22 expriment une protéine entière avec un peptide-signal, élément permettant le passage de la membrane cytoplasmique et la localisation au niveau de la paroi. De plus, sur base de la séquence en acides aminés, nous avions émis l'hypothèse d'une modification lipidique qui permettrait l'ancrage membranaire. Cloeckaert et al. (1991) ont montré par microscopie électronique et ELISA indirect sur bactéries entières que ces 3 OMPs sont exposées à la surface de *Brucella*.

Ainsi, notre hypothèse de travail est que chez ces 3 clones d'*E. coli* recombinantes, les OMPs sont associées à la paroi par ancrage à la membrane externe via la partie lipidique et qu'elles exposent certains épitopes peptidiques en surface. Lors d'un fractionnement d'extraits bactériens, elles devraient être détectées surtout dans la fraction insoluble. L'analyse des profils d'hydrophobicité établis selon l'algorithme de Kyte et Doolittle révèle que le peptide-signal est la seule région hydrophobe contenue dans la séquence de ces 3 OMPs. Par conséquent, si ces protéines adoptent un comportement hydrophobe après clivage du peptide-signal, nous pouvons supposer que la liaison covalente à un lipide en est responsable **(figure IV.63)**.

- Les clones 19.05F, 16.04F et 10.07F expriment des protéines de fusion sans peptide-signal; nous supposons donc qu'elles sont cytoplasmiques. De plus, étant dépourvues du tétrapeptide consensus et de la cystéine, elles ne peuvent être

Tableau IV.9 : Estimation de la quantité de protéines contenues dans chaque fraction (après dosage au BCA).

Sous-clone	fraction	quantité de protéine totale (μg)	pourcentage déposé (%)	nombre de μg déposé sur le gel
19.05F	PP	1253.5		3.2
	PS	7892.1	0.25	20
	PI	10161.4		26
19.06	PP	1963.2		1.4
	PS	9647.6	0.07	7
	PI	14186.2		10
16.18	PP	1796.25		0.52
	PS	6907.4	0.03	2
	PI	34952.4		10
16.04F	PP	1754.5		2.6
	PS	6778.9	0.15	10
	PI	13629.6		20.1
10.22	PP	4968.95		6
	PS	6736.1	0.12	7.8
	PI	17483.1		20
10.07F	PP	919.55		3
	PS	7121.2	0.28	20
	PI	10981.5		31

modifiées par un lipide. De surcroît, leur profil d'hydrophobicité n'indique aucun segment d'acides aminés hydrophobes; on s'attend donc à les retrouver principalement dans la fraction des protéines solubles

Les expériences qui suivent sont destinées à étayer ces hypothèses.

II.1. LOCALISATION DES OMPs PAR FRACTIONNEMENT

Cinquante ml de culture des 6 clones d'*E. coli* recombinantes sont lysés et utilisés pour le fractionnement afin de séparer les protéines de la bactérie en trois fractions: les protéines insolubles (fraction PI-majorité des protéines de la paroi), les protéines solubles (fraction PS- enrichie en protéines cytoplasmiques) et la fraction principalement constituée de protéines périplasmiques (fraction PP).
Nous avons effectué un dosage protéique au BCA pour estimer la quantité de protéines contenues dans chaque fraction **(tableau IV.9)**. Nous avons ensuite réalisé un SDS-PAGE suivi d'un Western blot. Nous avons déposé pour chacune des 3 fractions d'un clone le même pourcentage de protéines par rapport à la quantité totale de protéines contenues dans chaque fraction. Les résultats sont donnés à la **figure IV.64**.
Cependant, ne disposant pas de dosage d'enzymes marqueurs de fraction, nous ne pouvons pas évaluer le degré de contamination d'une fraction par les protéines d'une autre.

Remarquons immédiatement qu'aucune protéine recombinante n'a pu être détectée dans la fraction PP. Ceci montre que le degré de contamination de cette fraction par les 3 OMPs doit être faible et nous n'avons pas pu le mettre en évidence.

II.1.1. Cas de l'OMP 10

L'OMP exprimée par le clone 10.22 n'est détectée que dans la fraction PI. La protéine de fusion exprimée par le clone 10.07F est localisée très majoritairement dans la fraction PS. Ces résultats sont compatibles avec notre hypothèse de départ.

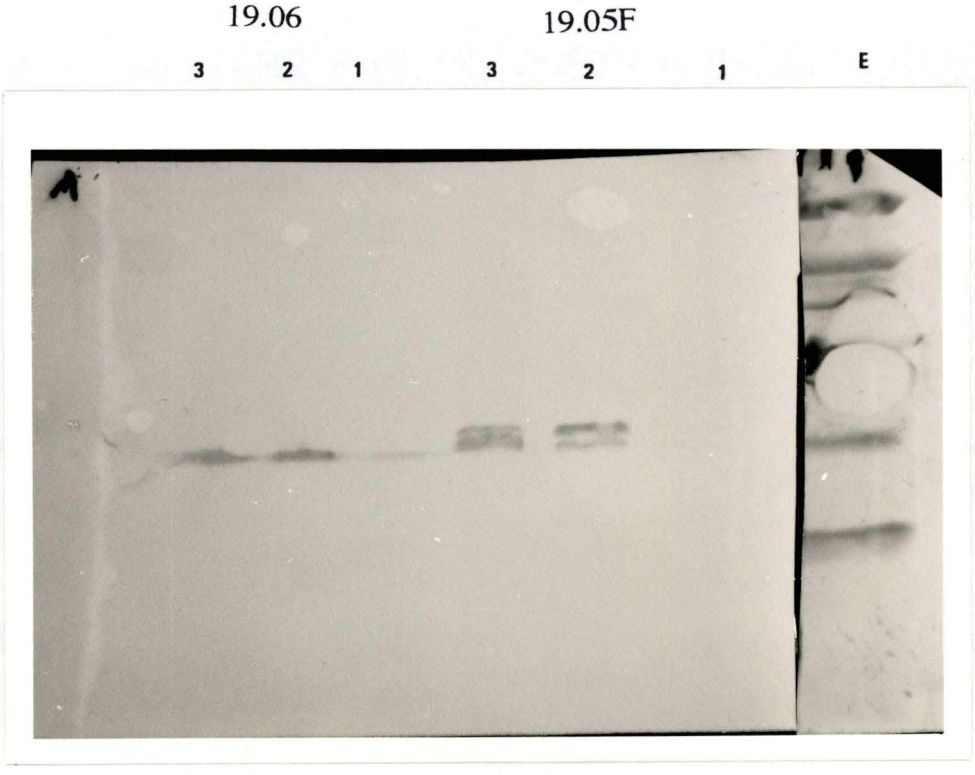
II.1.2. Cas des OMPs 19 et 16.5

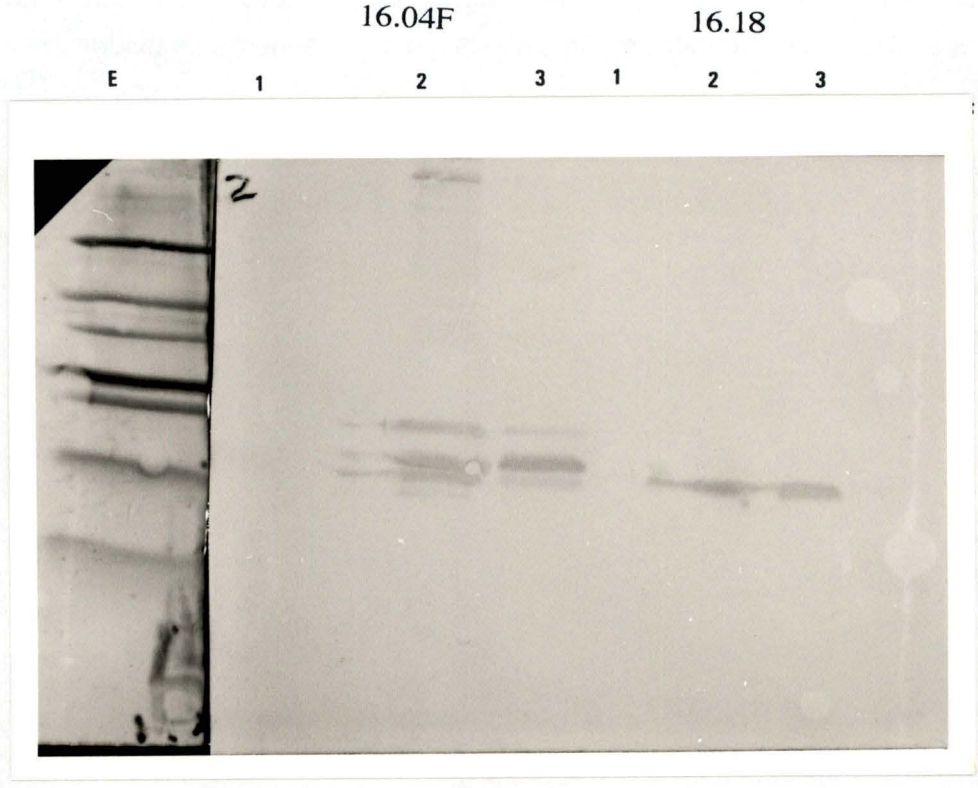
Quels que soient les clones testés, la protéine recombinante est mise en évidence avec la même intensité dans les fractions PI et PS. Ces résultats sont donc

Figure IV.64 : SDS-PAGE suivi d'un Western blot avec les AcMo anti-OMPs et RAM-protéine A peroxydase sur les 3 fractions issues d'extraits totaux de bactéries recombinantes.

Les AcMo utilisés sont A68/25H10/A5 (anti-19-kDa), A68/04G1/C6 (anti-16.5-kDa) et A68/07G11/C10 (anti-10-kDa).

E : étalon de masse moléculaire (Da)
1. fraction PP
2. fraction PS
3. fraction PI





10.22

10.07F

1 2 3 1 3 2 E

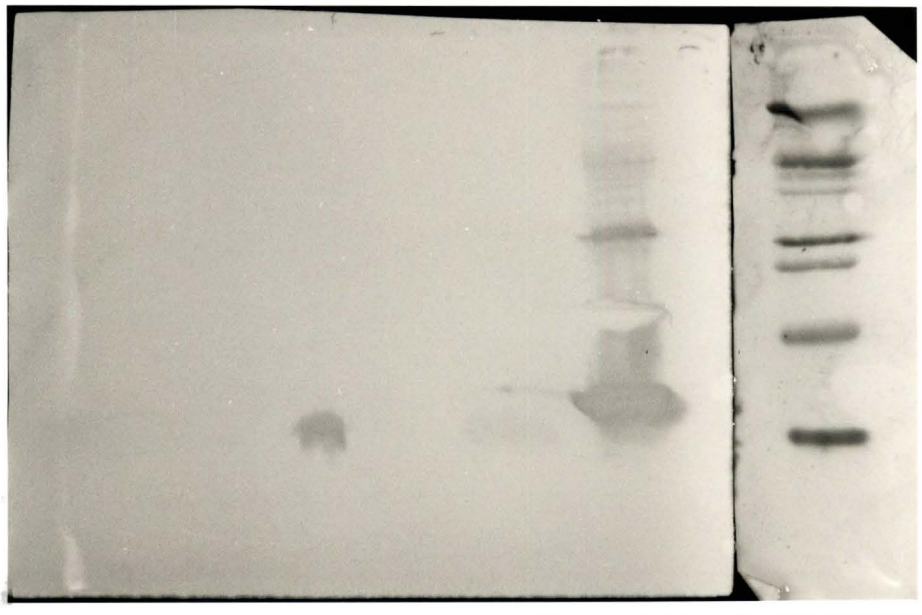
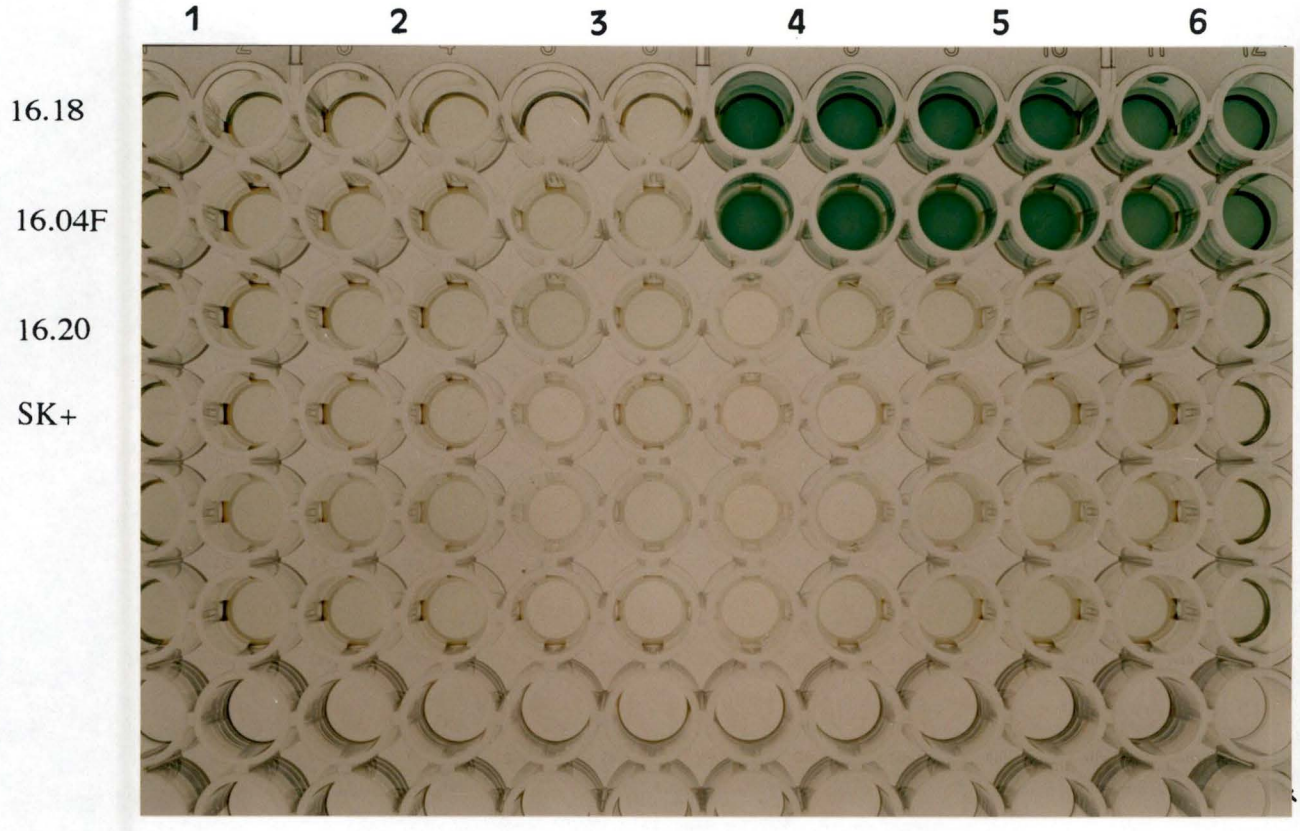


Figure IV. 65 : Photo présentant les résultats d'un test ELISA indirect sur bactéries entières immobilisées.

La fixation de l'AcMo à l'antigène (épitope de l'OMP 16.5, dans ce cas) a été révélée par un conjugué SAM-peroxydase et ABTS.

Puits 1: pas d'AcMo
Puits 2: AcMo de spécificité différente (A76/10D3/H2)
Puits 3: anti-PG (A76/03D6/A9)
Puits 4: A68/04G1/C6 (1/5)
Puits 5: A68/04G1/C6 (1/25)
Puits 6: A68/04G1/C6 (1/125)



quelque peu inattendus si on se réfère à l'hypothèse présentée auparavant et nous ne pouvons pas tirer de conclusions quant à la localisation des OMPs 19 et 16.5 chez les *E. coli* recombinantes. Signalons que le profil en bandes multiples observé pour les clones 16.04F et 10.07F sera traité au chapitre "Discussion".
Nous exploiterons à présent des techniques plus directes de caractérisation de ces OMPs afin de voir si, comme chez *Brucella*, elles sont exposées en surface.

II.2. EXPOSITION EN SURFACE des OMPs RECOMBINANTES

Nous avons testé l'exposition à la surface des *E. coli* recombinantes, en utilisant les deux mêmes techniques que Cloeckaert et al. (1990): ELISA indirect et marquage sur grilles.

Les contrôles utilisés pour valider ces deux tests sont identiques:
- un AcMo anti-peptidoglycane de *Brucella* (PG) a été testé; le PG est un constituant du périplasme qui ne devrait pas être accessible aux AcMo si l'intégrité de la membrane externe est préservée. Il est important d'ajouter que l'anti-PG de *Brucella* croise avec le PG d'*E. coli* (Cloeckaert et al., 1990).
- des bactéries *E. coli*, transformées par une matrice pBluescript SK+ sans insert;
- un AcMo ne reconnaissant pas l'OMP recombinante considérée, mais de même isotype que les Ac Mo anti-OMP;
- le blanc tampon pour lequel on n'a pas ajouté d'AcMo dans le test.

II.2.1. ELISA indirect sur bactéries entières immobilisées

Les bactéries entières *E. coli* ont été immobilisées sur la surface de puits de microplaques. On ajoute alors un AcMo anti-OMP dont la fixation à la surface est révélée par un conjugué anti-Ig de souris couplé à la peroxydase **(figure IV.65)**.

Dans une des 2 microplaques, les bactéries ont été fixées à la glutaraldéhyde (10 minutes, 37°C et en présence de 2% de glutaraldéhyde) après immobilisation; l'ultrastructure de la paroi bactérienne étant ainsi fixée, le traitement subi au cours de l'ELISA pourrait en effet fragiliser la paroi. Nous avons, dans un premier temps, vérifié que les pontages à la glutaraldéhyde n'empêchent pas la reconnaissance de l'épitope

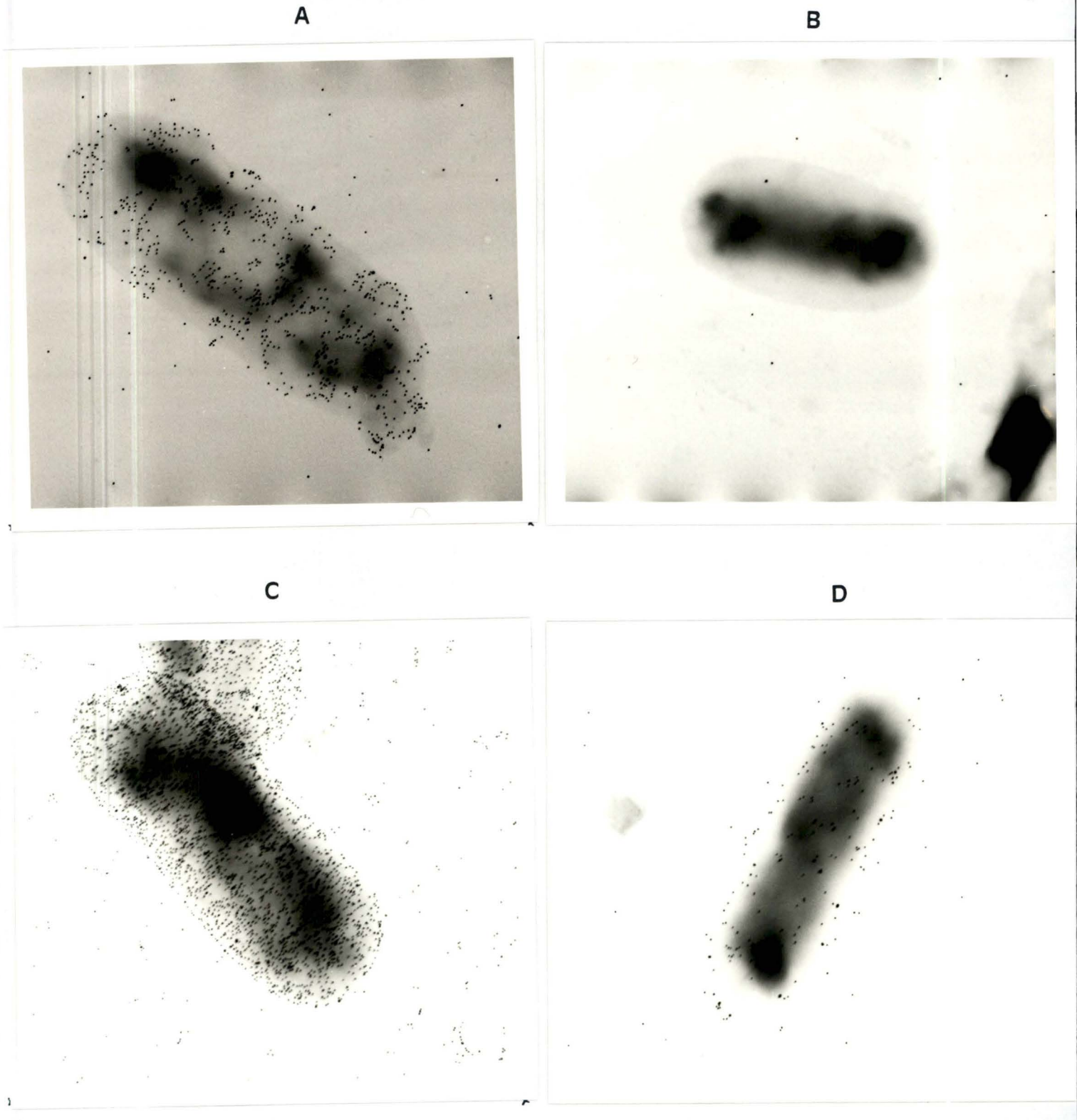
par l'AcMo. Nous constatons que les AcMo réagissent avec les protéines présentes dans des extraits bactériens totaux fixés à la glutaraldéhyde (résultats non montrés).
Les résultats de l'ELISA indirect sur bactéries entières sont semblables avec ou sans fixation à la glutaraldéhyde. De plus, l'AcMo anti-PG ne réagit de façon significative dans aucun de nos tests. Ce constituant périplasmique ne semble pas accessible à l'AcMo anti-PG mis en présence de bactéries immobilisées. Ces 2 arguments convergent en faveur d'une conservation de l'intégrité de la membrane externe en cours d'ELISA.
Les valeurs de DO très faibles mesurées pour les témoins négatifs nous autorisent les déductions suivantes: pas de reconnaissance directe de l'antigène bactérien par le conjugué, pas de réaction non spécifique avec un AcMo de même isotype, pas de réaction croisée avec un antigène d'*E. coli*.

Le tableau ci-dessous présente les résultats de l'ELISA sur bactéries entières en reprenant les différents AcMo testés et les clones utilisés.

AcMo anti-OMP	ELISA indirect sur bactéries entières immobilisées	ELISA indirect sur bactéries entières immobilisées	Western blot sur extraits totaux	ELISA indirect sur bactéries entières immobilisées
OMP 19	19.06	19.05F	19.05F	19.28
A7618B2D6 A7610D3H2 A6825H10A5 A765C10A8 A762A4A7 A7612F2D6	+	−	+	−
OMP 16.5	16.18	16.04F	16.04F	16.20
A768C3G3 A684G1C6 A664E3B7 A7617G6	+	+	+	−
OMP 10	10.22	10.07F	10.07F	10.03
A687G11C10 A688E7B11	+	−	+	−

Figure IV.66 : Photos en microscopie électronique à transmission du marquage sur grilles de bactéries entières à l'or colloïdal.

La figure montre le marquage de 19.06 (**A**) et 19.05F (**B**) par l'anti-19-kDa A76/18B2/D6; 16.18 (**C**) et 16.04F (**D**) par l'anti-16.5-kDa A68/4G1/C6; 10.22 (**E**) et 10.07F (**F**) par l'anti-10-kDa A68/7G11/C10; SK+ (**G**) mis en présence du mélange des 3 AcMo (témoin négatif).
Le grossissement est de 24000 pour toutes les photos, à l'exception de celle représentant le clone 10.07F où il est de 18000.



Les OMPs recombinantes sont exprimées à la surface des clones 19.06, 16.18, 16.04F et 10.22. Les 6 AcMo anti-19-kDa, les 4 AcMo anti-16.5-kDa et les 2 AcMo anti-10-kDa reconnaissent donc un épitope de l'OMP qui est exposé à la surface bactérienne. Aucun des AcMo utilisés ne détecte d'OMP à la surface des clones 19.05F et 10.07F. Or, en Western blot, ils reconnaissent la protéine de fusion exprimée par ces clones. Nous en déduisons 2 informations:

1) la protéine de fusion n'est pas exprimée en surface.
2) les épitopes reconnus par toute cette batterie d'AcMo sont indépendants de la modification lipidique supposée des OMPs.

L'exposition à la surface de la protéine exprimée par le clone 16.04F n'est pas compatible avec les hypothèses établies; cette observation sera traitée au chapitre "Discussion".

II.2.2. Marquage de bactéries entières sur grilles

Cette expérience devrait nous permettre de confirmer l'exposition en surface des 3 OMPs chez les *E. coli* recombinantes par le marquage spécifique à l'or colloïdal de bactéries et leur observation en microscopie électronique à transmission.
La fixation des AcMo à la surface des bactéries déposées sur grilles est mise en évidence par un conjugué anti-Ig de souris biotinylé, lui-même reconnu par des molécules de streptavidine couplées à des particules d'or colloïdal.
Les résultats du marquage sur grilles sont montrés à la **figure IV.66**.

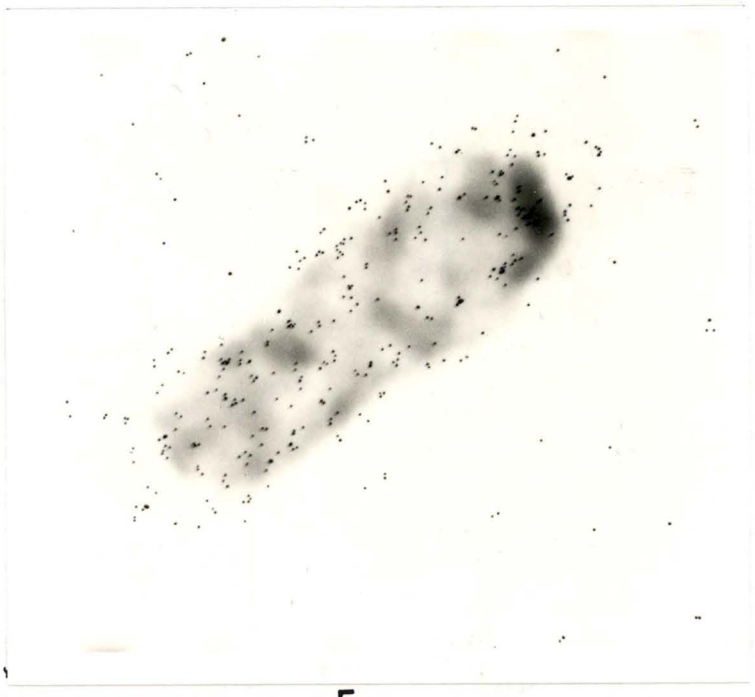
Les témoins négatifs sont également corrects. Nous observons que la surface des bactéries 19.06, 10.22, 16.18 et 16.04F est marquée de manière significative et que par contre, les clones 19.05F et 10.07F ne sont pas marqués en surface. Ces résultats confirment ceux obtenus pour l'ELISA indirect sur bactéries entières immobilisées.

II.2.3. Coupe de bactéries marquées en plaques de Terasaki

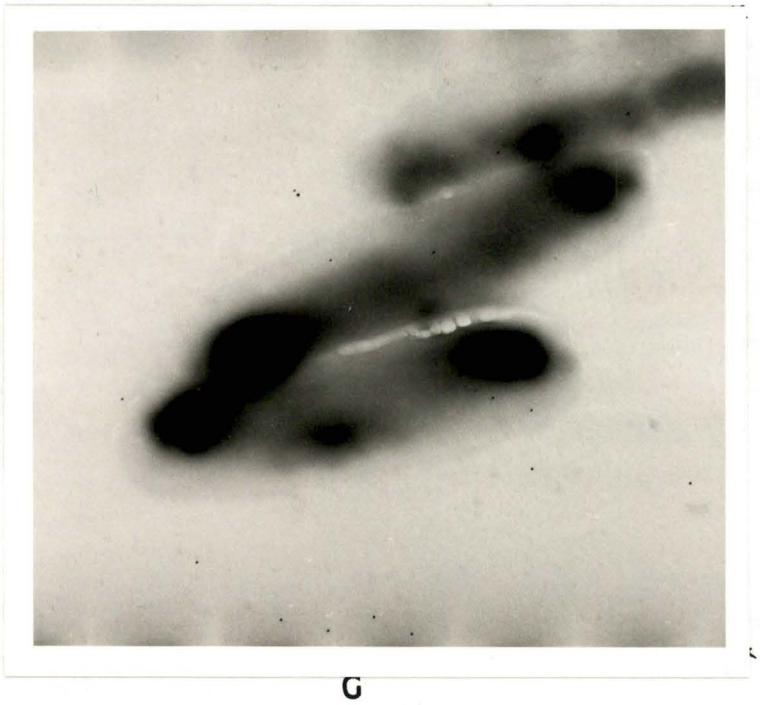
Cette technique utilise le même principe que l'ELISA indirect: les bactéries sont immobilisées au fond des puits d'une plaque particulière (Terasaki), mises en présence d'AcMo et en parallèle, 2 types de détection ont été utilisés:

1) anti-Ig de souris conjugué à la peroxydase, révélation ABTS. Ce test est un témoin positif et fournit les mêmes résultats que l'ELISA indirect.
2) anti-Ig de souris conjugué à la biotine, révélation streptavidine-or colloïdal. Après fixation à la glutaraldéhyde, post-fixation au tétroxyde d'osmium, déshydratation,

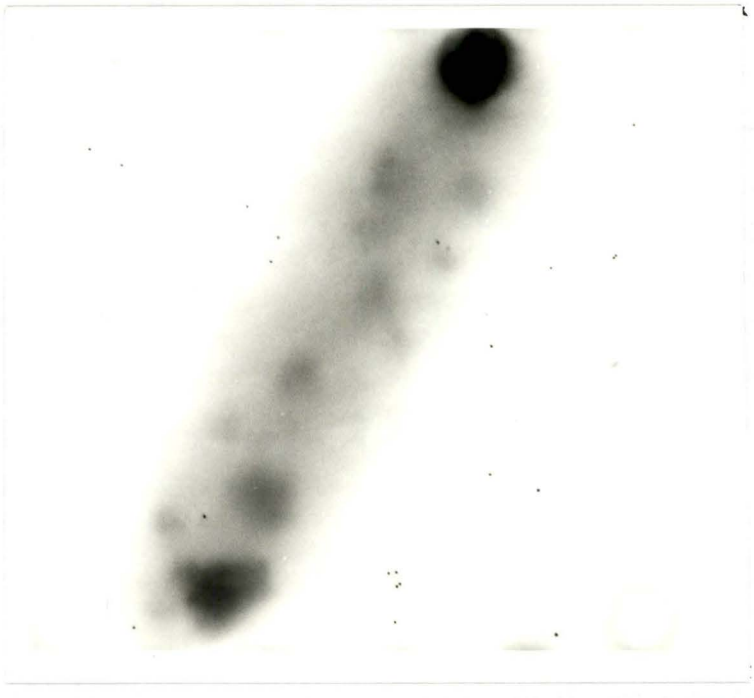
E



F



G



inclusion dans la résine (épon), réalisation de coupes ultrafines et coloration, une observation au MET permet alors de visualiser le marquage et donc d'identifier la structure bactérienne sur laquelle les particules d'or colloïdal sont fixées.

Seul le clone 19.06 a été testé **(figure IV.67)** et nous observons des particules d'or à l'extérieur de la double membrane, indiquant que la protéine reconnue est associée à la membrane externe et exposée à l'extérieur.

II.2.4. Marquage sur coupe

Dans ce cas, la structure bactérienne a d'abord subi la fixation, l'inclusion et la coupe avant d'être marquée. Les protéines marquées peuvent être en cours de synthèse (cytoplasme), d'exportation (membrane cytoplasmique et périplasme) ou sous leur forme mature processée (membrane externe). Cette expérience n'a été réalisée que pour les clones 19.06 et 19.05F, mais elle ne s'est pas avérée concluante. Ce résultat s'explique soit par un nombre trop faible de molécules d'OMPs exprimées, soit par l'altération de l'épitope suite aux étapes de fixation et inclusion.

Les résultats de l'ELISA indirect et du marquage à l'or colloïdal convergent vers les conclusions suivantes: chez les *E. coli* recombinantes qui expriment le gène entier de l'OMP (soit les clones 19.06, 16.18 et 10.22), cette OMP est exposée en surface de la bactérie, comme le montre sa réactivité avec l'AcMo spécifique. Aucune OMP n'est détectée à la surface des 2 clones bactériens recombinants (19.05F et 10.07F) qui contiennent un gène chimérique, codant pour une OMP délétée de son peptide-signal. Par contre, nous avons mis en évidence, de façon reproductible et quelle que soit la méthode utilisée, l'OMP 16.5 chimérique à la surface des bactéries recombinantes 16.04F. Ce résultat pour le moins surprenant sera traité au chapitre "Discussion".

Figure IV.67 : Observation en microscopie électronique à transmission de coupe de bactéries entières marquées.

Cette figure montre les résultats pour le clone 19.06 détecté par l'AcMo anti-19-kDa A76/18B2/D6 (grossissement : 24000).



III. Détermination de la nature lipoprotéique des OMPs

III.1. Extraction et partition de phases au Triton X-114

Les protéines intégrales de membrane se caractérisent par un domaine hydrophobe qui interagit directement avec la partie hydrophobe de la bicouche lipidique. Les détergents non ioniques, comme le Triton X-114, sont largement utilisés pour la solubilisation et la caractérisation de ces protéines de membrane. Durant la solubilisation, le détergent non ionique remplace la plupart des molécules lipidiques en contact avec le domaine hydrophobe de la protéine intégrale de membrane. Cela conduit à la formation de micelles mixtes, composées de protéines solubles dans le détergent et de détergent. Le Triton X-114 présente une partition de phases caractéristique: il est homogène à 0°C tandis qu'en passant à une température supérieure à 20°C, il se sépare en 2 phases: détergente et aqueuse. Dans les conditions préconisées par Bordier (1981), dans les micelles mélangées formées de protéines de nature amphiphile comme les lipoprotéines, ces protéines se retrouvent aggrégées avec le détergent; alors que les protéines hydrophiles n'ont que peu ou pas d'interactions hydrophobes avec le Triton X-114. Elles se retrouvent donc au niveau de la phase aqueuse.

Les bactéries *Brucella B. melitensis* B115 et *E. coli* recombinantes (19.06, 19.05F, 16.18, 16.04F, 10.22 et 10.07F) ont subi une extraction et une partition de phases au Triton X-114 selon le protocole décrit au chapitre "Matériel et Méthodes". Ce procédé conduit à l'obtention de 2 phases (aqueuse et détergente), dans lesquelles les protéines se sont partagées. Les protéines solubilisées dans la phase détergente sont alors précipitées à l'acétone et resuspendues dans du tampon d'échantillon. Les protéines des 2 phases ont été séparées par SDS-PAGE et colorées au bleu de Coomassie de façon à les visualiser. Il faut noter que les protéines de la phase aqueuse ont pu être dosées par BCA, mais pas les protéines de la phase détergente car le Triton X-114 interfére avec le BCA. Ensuite, une détection immunologique par Western blot a été réalisée à l'aide d'AcMo anti-OMP.

III.1.1. Partition d'extraits totaux de *Brucella*

La **figure IV.68** nous présente le contenu des phases aqueuses et détergentes séparé par SDS-PAGE; dans la partie A, le gel est coloré au bleu de Coomassie, alors que la partie B montre le gel recoloré à l'argent, cette coloration ayant une sensibilité supérieure. Les masses moléculaires estimées des protéines visibles (numérotées de 1 à 9) dans la phase détergente pour *B. melitensis* B115 sont indiquées dans la figure (piste 4).

La phase détergente nous intéresse, car elle devrait être enrichie en protéines capables d'interagir avec le Triton X-114, notamment les lipoprotéines. Elle contient beaucoup moins d'espèces protéiques différentes que la phase aqueuse. La coloration à l'argent, beaucoup plus sensible, fait apparaître un plus grand nombre de bandes protéiques.
Les protéines des bandes 3 et 7 qui sont présentes en phase détergente et semblent absentes en phase aqueuse seraient caractéristiques de la phase détergente.
Les bandes 3, 7 et 8 s'intensifient de la piste 3 à la piste 4, c'est-à-dire lors de la dernière extraction. La bande 2 apparaît au niveau de la piste 4. Les bandes 1, 4, 5 et 6 correspondent à des bandes intenses en phase aqueuse; elles résultent sans doute d'une contamination de la phase détergente par des protéines solubles. Mais, restons conscients que plusieurs protéines peuvent migrer à la même distance et par conséquent des bandes protéiques à la même hauteur dans les deux phases peuvent correspondre à des protéines différentes. Nous pouvons aussi signaler que la grosse tache de faible masse moléculaire correspond sans doute au LPS-R. En effet, un AcMo anti-LPS-R utilisé en Western blot sur ces fractions détecte une large bande à cette hauteur.

L'analyse par Western blot à l'aide d'AcMo anti-OMP des phases aqueuse et détergente révèle que les 3 OMPs de 19-, 16.5- et 10-kDa se répartissent dans la phase détergente **(figure IV.69)**. Nous utilisons comme marqueur de la phase aqueuse une protéine cytoplasmique de 39-kDa présente dans le lysat total de *B. melitensis* B115. Elle est détectée dans la phase aqueuse. Les marqueurs de la phase détergente sont les LPS-R et LPS-S mis en évidence exclusivement dans cette phase par Western blot avec les AcMo spécifiques. Signalons également que dans la phase détergente, on s'attend aussi à retrouver les protéines intégrales de membranes interne et externe de *Brucella*; on connaît les OMPs de 36-, 25- et sans doute de 31-kDa

Figure IV.68 : SDS-PAGE suivi d'une coloration au bleu de Coomassie (A) et d'une coloration à l'argent (B) des fractions issues d'une partition au Triton X-114 d'extraits de *Brucella*.

La piste "extrait total" représente 20 μg de protéines déposés; la piste "phase aqueuse" représente 30 μg de protéines déposés, soit 4% de la totalité de la phase aqueuse et la piste "phase détergente" montre le résultat pour 35% environ de l'entièreté de cette phase.
Les protéines contenues dans la phase détergente finale sont numérotées de 1 à 9.

1. étalon de masse moléculaire (Da)
2. *B. melitensis* B115 (extrait total)
3. *B; melitensis* B115 (phase détergente, après 2 extractions)
4. *B. melitensis* B115 (phase détergente finale, après 3 extractions))
5. *B. melitensis* B115 (phase aqueuse, après 2 extractions)
6. *B. melitensis* B115 (phase détergente, après 3 extractions)

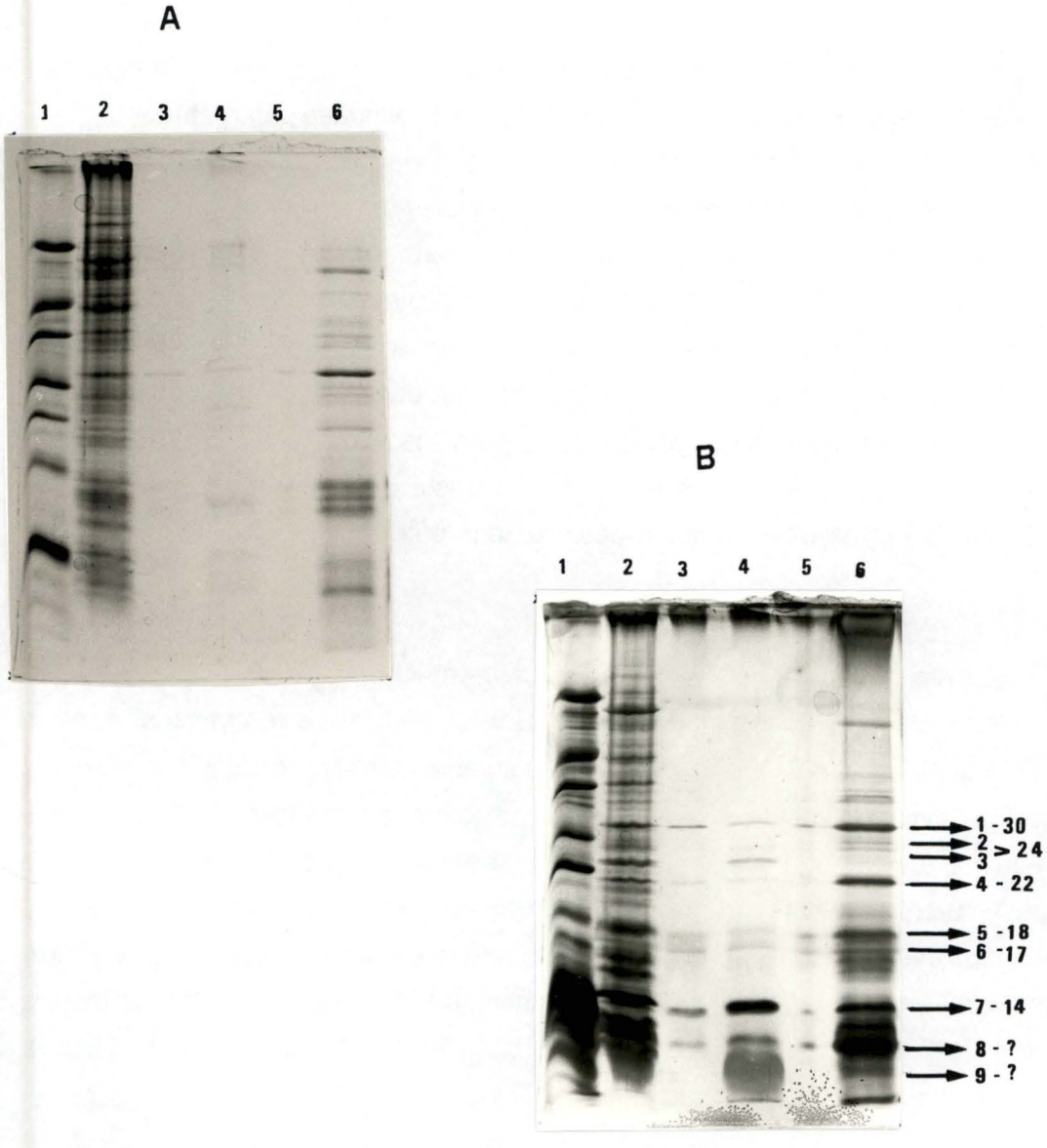
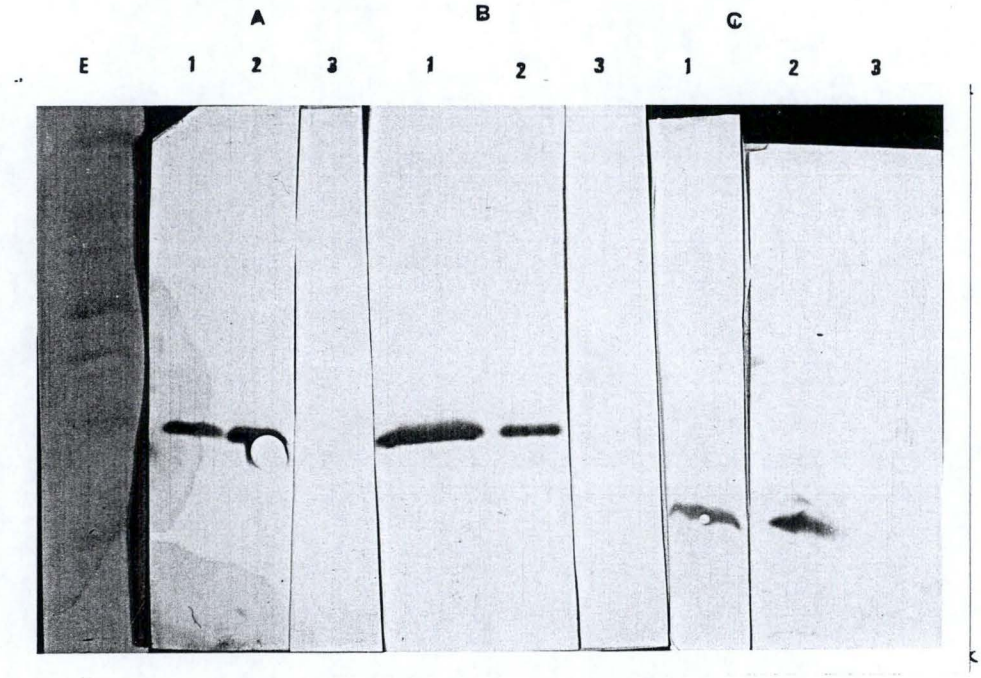


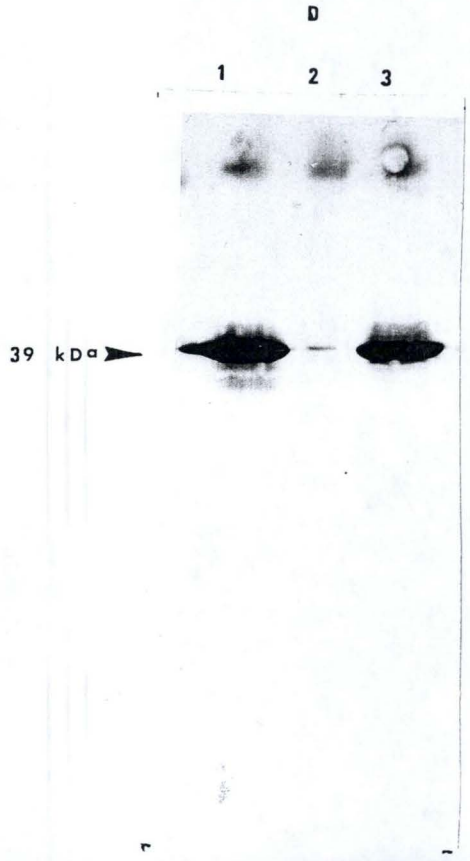
Figure IV.69 : SDS-PAGE suivi d'un Western blot pour les extraits totaux de *B. melitensis* B115 ayant subi une extraction et une partition de phases au Triton X-114.

La détection immunologique s'est réalisée à l'aide d'AcMo anti-OMPs suivi d'une révélation RAM-protéine A peroxydase.
Les AcMo utilisés sont A76/18B2/D6 (anti-19-kDa) (**A**), A68/4G1/C6 (anti-16.5-kDa) (**B**); A68/7G11/C10 (anti-10-kDa) (**C**); A43/05E1/E8 (anti-39-kDa) (**D**); A68/29C5/B6 (anti-LPS-R) (**E**) et A76/12G12/F12 (anti-LPS-S) (**F**).

1. *B. melitensis* B115 (extrait total)
2. *B. melitensis* B115 (phase détergente)
3. *B. melitensis* B115 (phase aqueuse)

E : étalon de masse moléculaire (Da)





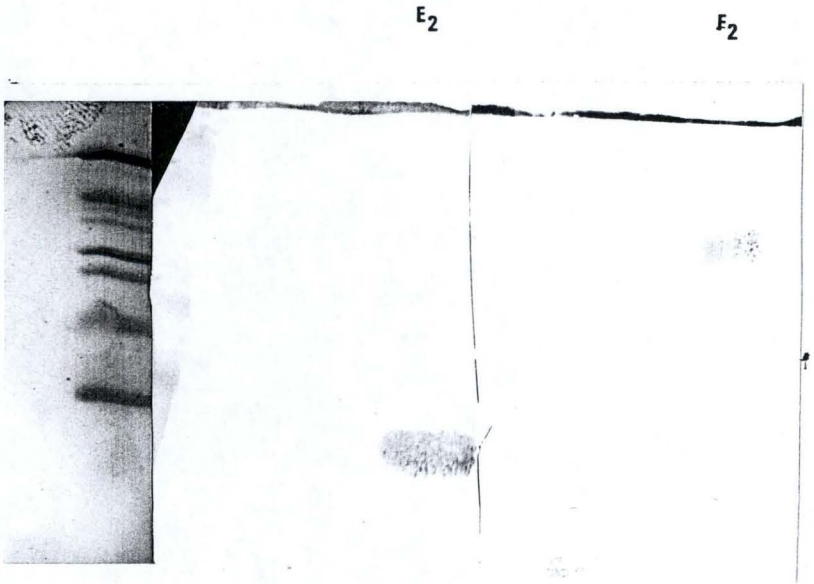
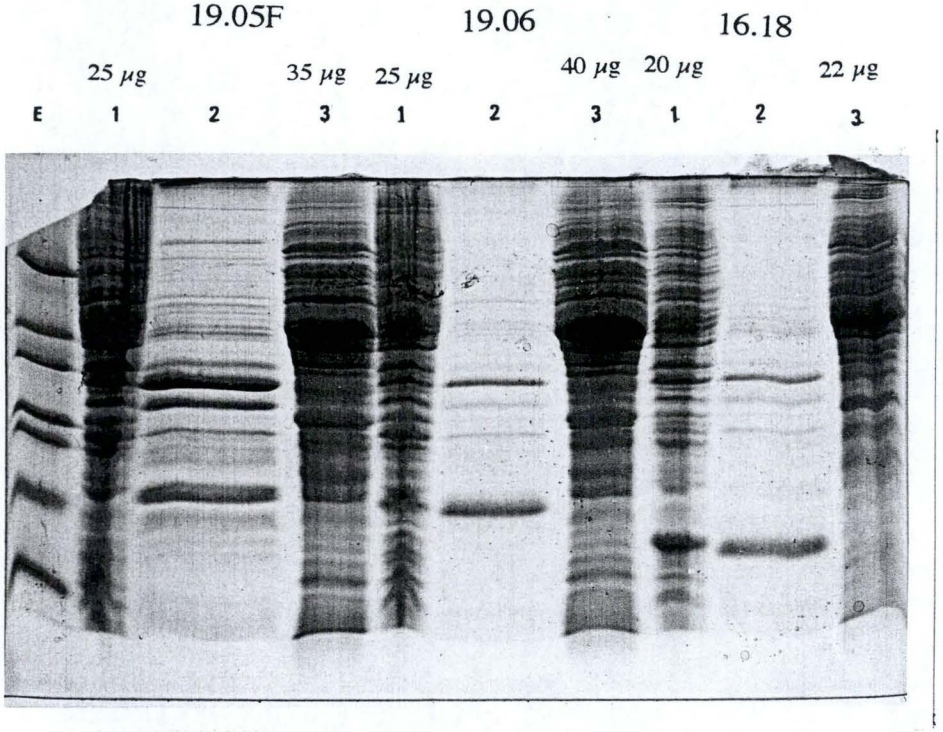
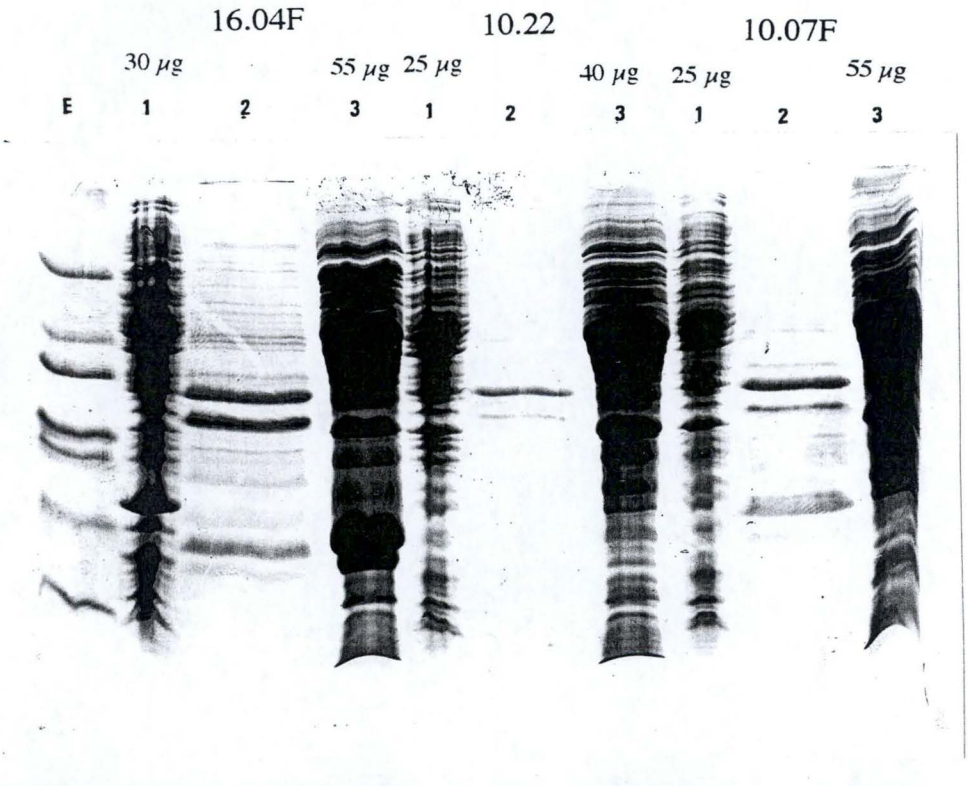


Figure IV.70 : Profil SDS-PAGE après coloration au bleu de Coomassie d'extraits totaux d'*E. coli* qui ont subi une extraction et une partition de phases au Triton X-114.

La quantité de protéines déposée est indiquée entre parenthèses pour les pistes "extrait total" et "phase aqueuse". Pour la phase aqueuse, cette quantité représente 5% de la totalité de la phase aqueuse récupérée. La quantité de protéines déposée pour la phase détergente est de 50%, par rapport à la totalité de la phase, pour tous les échantillons.

E : étalon de masse moléculaire
1. extrait total
2. phase détergente
3. phase aqueuse





(Cloeckaert et al., 1990), l'équivalent de la lipoprotéine de Braun (Gomez-Miguel et al., 1987), les LPS-R et LPS-S et d'autres lipoprotéines qui existent certainement chez *Brucella*. Par Western blot, nous avons pu montrer que les OMPs 36 et 25 sont effectivement détectées dans la phase détergente (résultats non montrés).

III.1.2. Partition d'extraits totaux d'*E. coli* recombinantes

Nous avons réalisé une analyse par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie des phases détergente et aqueuse obtenues à partir des différents clones recombinants **(figure IV.70)**.

Dans la phase détergente se retrouvent les protéines intégrales de membrane et les lipoprotéines d'*E. coli* qui sont visibles pour tous les clones. Très clairement, pour le clone 16.18, une bande apparaît dans l'extrait total qui est présente en phase détergente et absente en phase aqueuse. Sa masse moléculaire est comparable à celle de l'OMP 16.5, elle correspond sans doute à cette OMP. Pour le clone 16.04F, une double bande supplémentaire apparaît majoritairement dans la phase aqueuse, avec une masse moléculaire proche de celle calculée pour la protéine de fusion. De même, pour le clone 19.06, une bande apparaît dans l'extrait total qui est présente en phase détergente et absente en phase aqueuse. Par contre, pour le clone 19.05F, il est très difficile de savoir dans laquelle des 2 phases, aqueuse ou détergente, on retrouve une bande majoritaire représentant une protéine de masse moléculaire comparable à celle de l'OMP 19.

L'analyse par Western blot à l'aide d'AcMo anti-OMP des phases aqueuse et détergente pour les *E. coli* recombinantes **(figure IV.71)** révèle que:

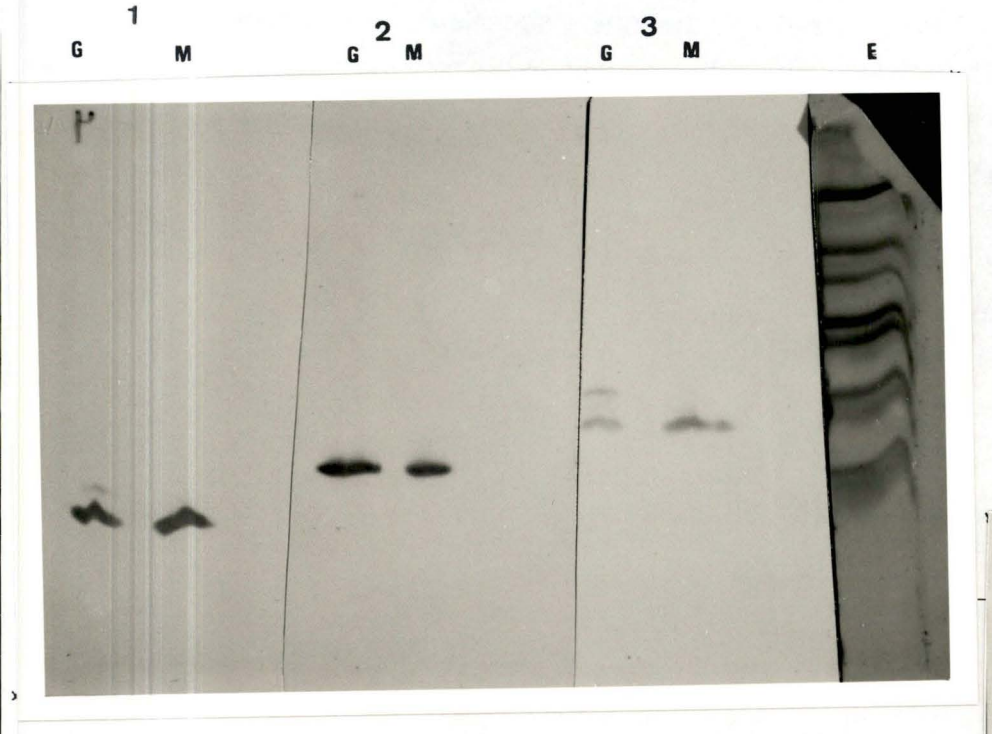
- pour l'OMP 10 : le clone 10.22 exprime une protéine présente uniquement en phase détergente, alors que la protéine de fusion exprimée par le clone 10.07F se retrouve au niveau de la phase aqueuse.
- pour les OMPs 19 et 16.5 : les protéines exprimées par les clones possédant le gène entier (soit 19.06 et 16.18) sont présentes dans la phase détergente; la phase aqueuse est quelque peu contaminée par ces OMPs. La protéine de fusion 16.04F est détectée majoritairement dans la phase détergente. Le résultat pour la protéine de fusion 19.05F (non montré) indique que cette protéine se trouve exclusivement au niveau de la phase aqueuse.

Il semble donc que les 3 protéines considérées de la membrane externe de *Brucella*, soit les OMPs de 19-, 16.5- et 10-kDa, soient des protéines

Figure IV.72 : SDS-PAGE suivi d'un Western blot pour tester l'effet de la globomycine sur des extraits totaux bactériens, à l'aide d'AcMo et révélation RAM-PA.

Le symbole (G) signifie que l'échantillon a été traité à la globomycine et (M) qu'il n'a pas été placé en présence de l'antibiotique.

E : étalon de masse moléculaire (Da)
1. *B. melitensis* B115, révélation par un anti-10-kDa A68/7G11/C10.
2. *B. melitensis* B115, révélation par un anti-15.7-kDa A76/29E3/C10.
3. *B. melitensis* B115, révélation par un anti-19-kDa A76/18B2/D6.
4. *B. melitensis* B115, révélation par un anti-16.5-kDa A68/04G1/C6.
5. clone 19.06 révélé avec l'anti-19-kDa A76/18B2/D6.
6. *B. melitensis* B115 (extrait total).
7. *B. melitensis* B115 (extrait total).
8. clone 16.18 (anti-16.5-kDa A68/04G1/C6)
9. clone 16.04F (anti-16.5-kDa A68/04G1/C6)
10 clone 10.22 (anti-10-kDa A68/7G11/C10)
11. clone 10.07F (anti-10-kDa A68/7G11/C10)
12. témoin négatif SK+
13. *B. melitensis* B115 (extrait total).



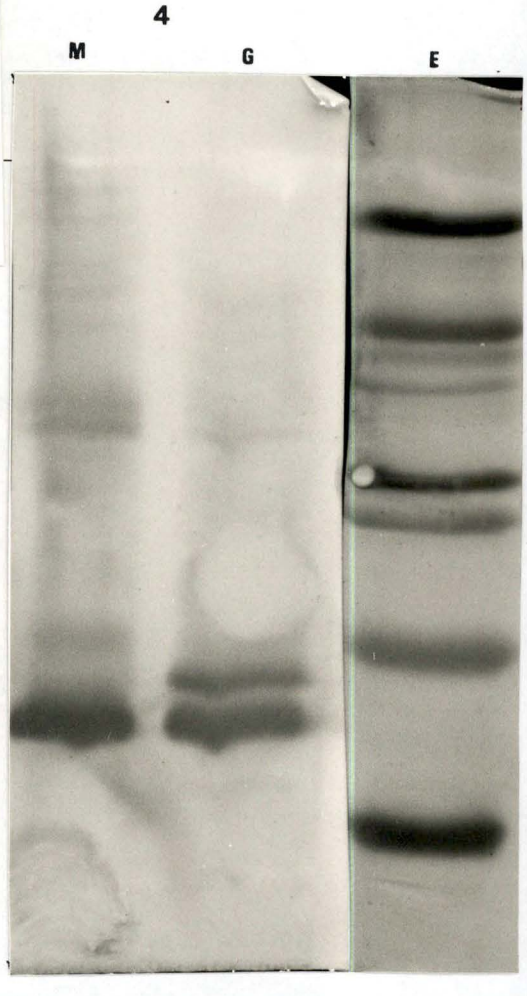
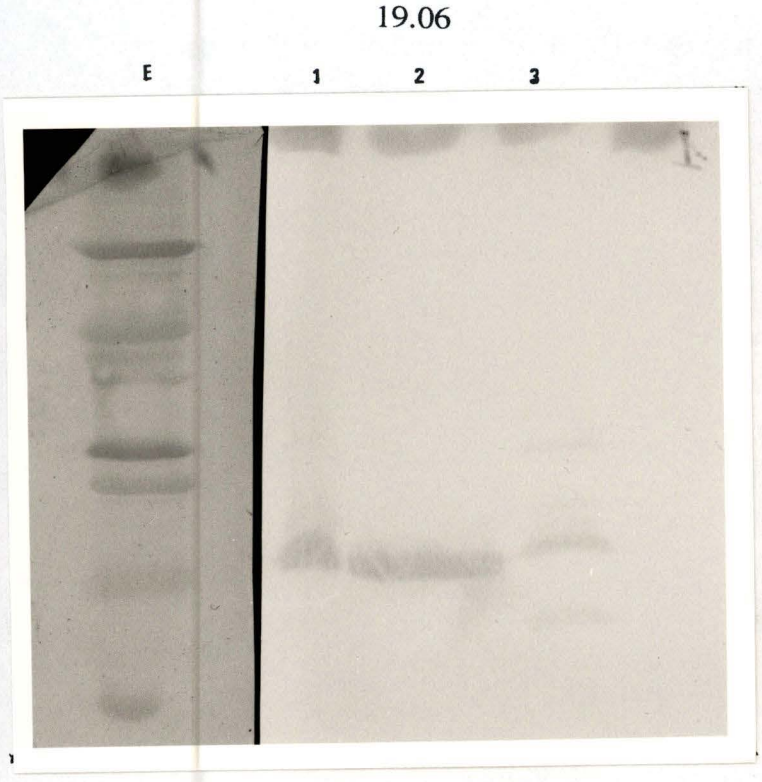
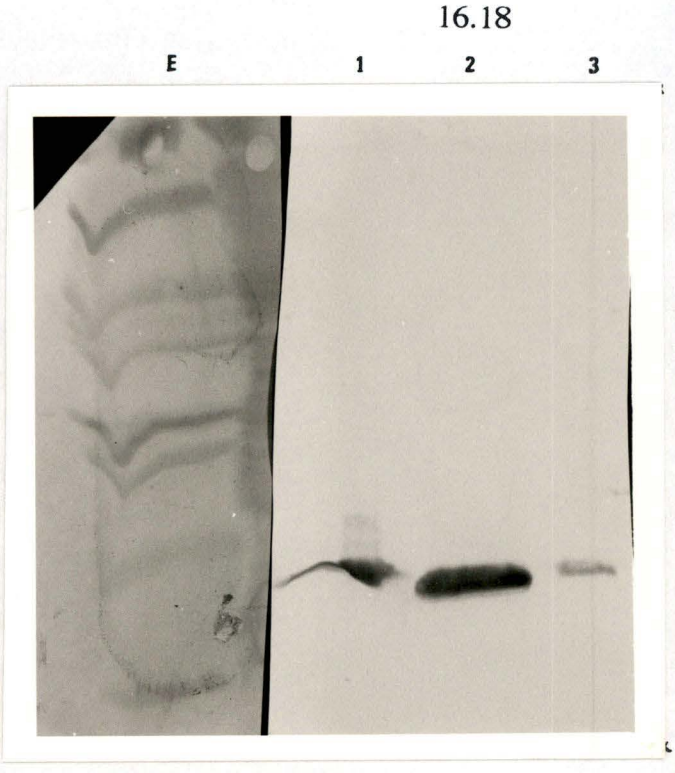


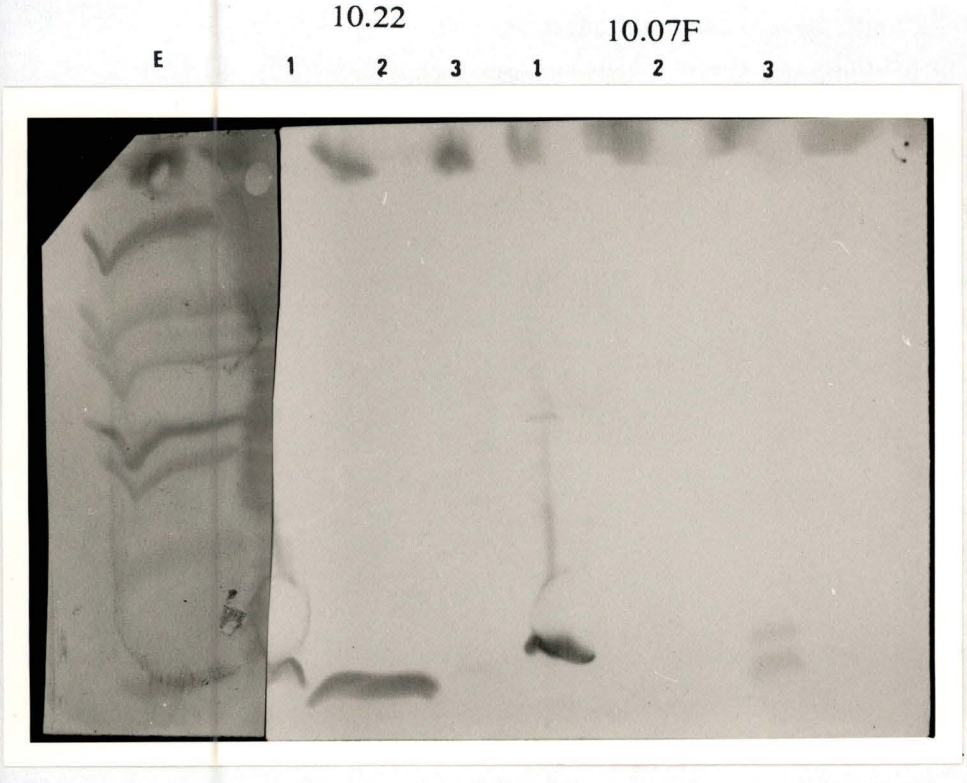
Figure IV.71 : SDS-PAGE suivi d'un Western blot utilisant des AcMo anti-OMPs sur des extraits totaux d'*E. coli* recombinantes (après partition de phases au Triton X-114).

La détection s'est réalisée à l'aide des AcMo anti-19-kDa A68/25H10/A5, anti-16.5-kDa A68/04G1/C6 et anti-10-kDa A68/7G11/C10 et révélation RAM-protéine A peroxydase.

E : étalon de masse moléculaire (Da)
1. extrait total
2. phase détergente
3. phase aqueuse









possédant une partie lipidique, intéragissant avec le Triton X-114. En effet, comme explicité auparavant, il semble que le caractère hydrophobe de ces protéines ne soit pas dû à leur séquence en acides aminés. La partition des protéines de fusion 19.05F et 10.07F en phase aqueuse supporte cette proposition.

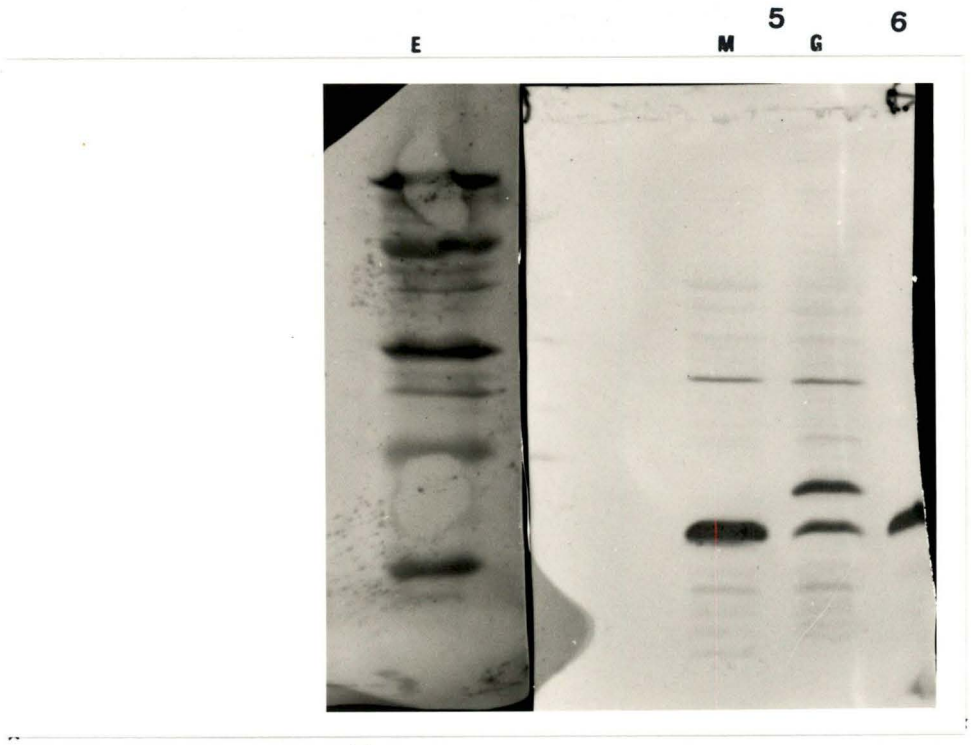
III.2. Effet de la globomycine

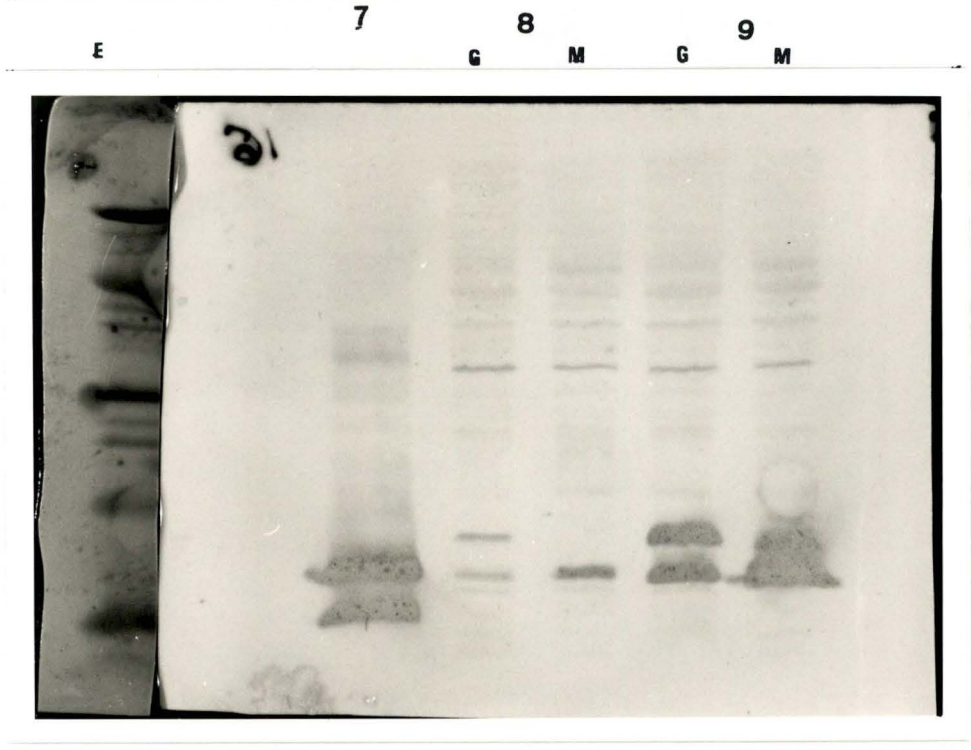
La globomycine, ou SF 1902-A1, est un antibiotique peptidique cyclique dont la formule moléculaire est $C_{32}H_{57}N_5O_4$. Il inhibe la croissance des bactéries Gram-négatives par arrêt de la synthèse de leur paroi bactérienne, avec formation de sphéroplastes. Plus précisément, la globomycine inhibe spécifiquement le clivage enzymatique (réalisé par la peptidase signal II) qui convertit les prolipoprotéines en lipoprotéines bactériennes; entraînant une accumulation du précurseur prolipoprotéique au niveau de la membrane cytoplasmique. Par contre, cet antibiotique n'affecte pas la synthèse macromoléculaire (ADN, ARN, peptidoglycane) ni le taux d'ATP dans les cellules d'*E. coli* (Inukai et al., 1978). Des études de cinétique enzymatique indiquent que la globomycine inhibe la peptidase signal II de manière réversible par liaison à l'enzyme d'une manière non compétitive (Dev et al., 1986). La peptidase signal I n'est pas affectée par la globomycine.

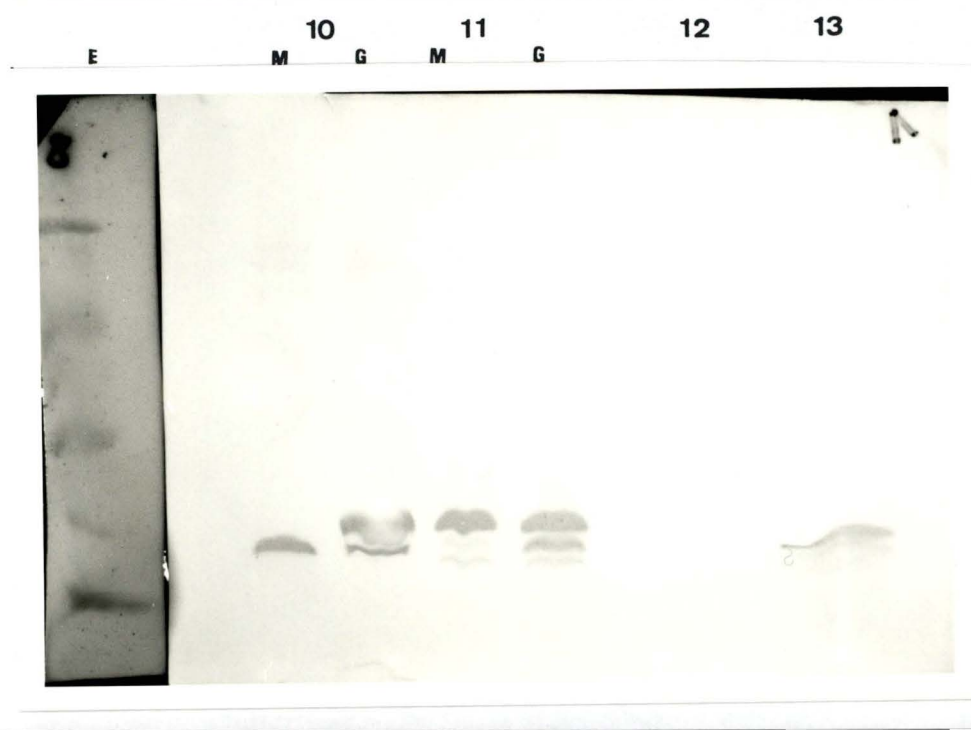
L'effet de cet antibiotique sur la maturation des OMPs devrait donc nous indiquer si la peptidase signal II intervient dans leur processing.

La globomycine nous a été gracieusement fournie par le docteur M. Inukai (Fermentation Research Laboratories; Sanyo Co., LTD; Japan).
L'antibiotique a été dissout dans du méthanol (5 mg/ml) et les bactéries ont été cultivées en présence de globomycine selon le protocole suivant.
Dix ml de milieu liquide ont été inoculés avec une colonie de *B. melitensis* B115 ou d' *E. coli* recombinante et incubés à 37°C sous agitation durant 2 ou 3 jours (pour les *Brucella*) ou quelques heures (pour les *E. coli* recombinantes). Lorsque la densité optique (à 600 nm) est de 0.4, la culture bactérienne est divisée en deux:

- 2 ml sont traités à la globomycine à une concentration finale de 100 µg/ml, (correspondant à 2% de méthanol).
- 8 ml, constituant le témoin sans antibiotique sont incubés en présence de 2% de méthanol.


E
5
M
G
6


E
7
8
G
M
G
9
M


E
10
M
G
11
M
G
12
13

Les cultures sont ensuite placées à 37°c, sous agitation, une nuit (pour les *Brucella*) et deux heures (pour les *E. coli* recombinantes).
Les bactéries sont alors récupérées par centrifugation, lavées et le culot bactérien est resuspendu dans du tampon d'échantillon pour électrophorèse. Les extraits totaux obtenus sont analysés par SDS-PAGE, suivi d'un Western blot à l'aide d'AcMo anti-OMPs **(figure IV.72)**.

Chez les *Brucella,* pour les 3 OMPs, on observe , en présence de globomycine, une bande majoritaire correspondant à la protéine exprimée en absence de globomycine; il s'agit de l'OMP mature. Une bande minoritaire supplémentaire apparaît dont la masse moléculaire est plus élevée d'environ 2000 par rapport à la protéine native. Cette différence de masse moléculaire correspond approximativement à la taille du peptide-signal. Par conséquent, cette bande minoritaire serait le précurseur prolipoprotéique: OMP dont le peptide-signal n'a pas été clivé. La protéine de 15.7-kDa de *B. melitensis* B115 de nature non lipoprotéique, dont le gène a été cloné et séquencé (E. Saman, communication personnelle) a été utilisée comme témoin négatif. Le profil de modification de cette protéine de 15.7-kDa n'est pas affecté par la globomycine. En effet, cette protéine ne contient pas la séquence consensus des lipoprotéines.
Chez les *E. coli* recombinantes 19.06, 16.18 et 10.22, une bande supplémentaire apparaît dont la masse moléculaire est plus élevée d'environ 2000 également par rapport à la protéine native. Dans les extraits d'*E. coli* recombinantes exprimant des protéines de fusion, aucune bande de masse moléculaire supérieure n'est détectée après traitement à la globomycine.Mais, signalons que pour le clone 10.07F, plusieurs bandes (2) sont détectées d'une masse moléculaire inférieure à la bande majoritaire. Ces bandes inférieures sont plus intenses après culture en présence de globomycine. Pour le clone 16.04F, nous observons toujours un profil en bandes multiples, en présence ou en absence de globomycine. Nous y reviendrons au chapitre "Discussion".

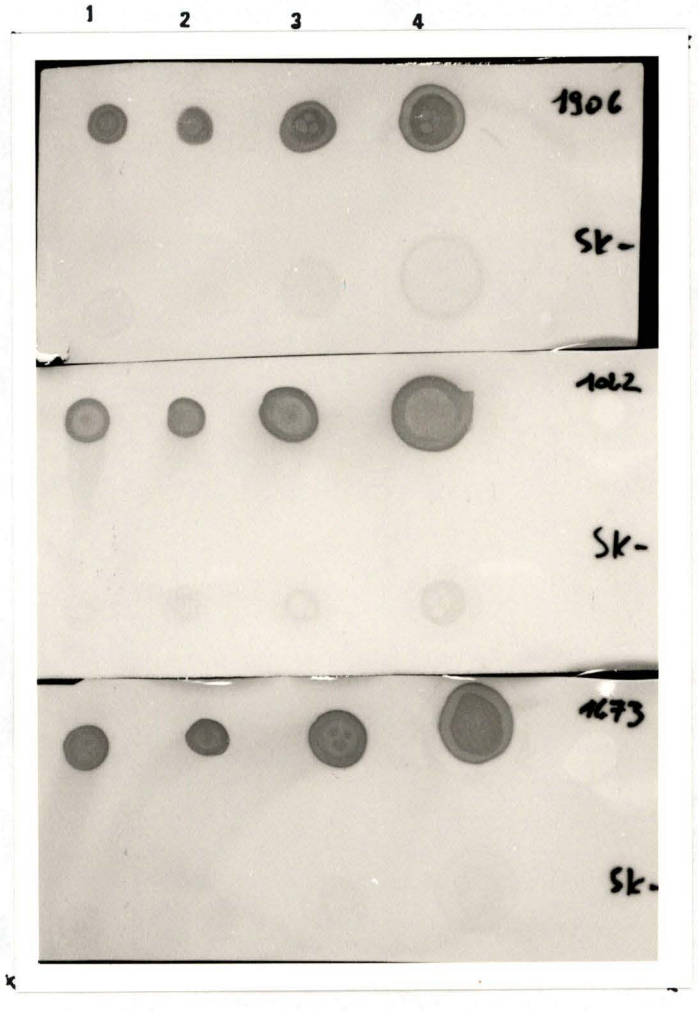
III.3. Marquage métabolique à l'acide palmitique tritié

La séquence en acides aminés déduite de ces 3 OMPs suggère que ce sont des lipoprotéines, dont le peptide-signal se termine par la séquence consensus caractéristique de la maturation des LP's bactériennes. Quand une LP est sécrétée, le résidu cystéine suivant le peptide-signal est modifié post-traductionnellement par l'addition d'un glycérol par la glycéryl transférase. Alors, la SPase II, peptidase signal

Figure IV.73 : Dot blot pour tester l'expression des OMPs recombinantes par les *E. coli* 19.06, 16.18 et 10.22, révélation RAM-phosphatase alcaline.

Dépôt d'extraits totaux avec lyse au lysosyme.
Le témoin négatif est SK-. Les AcMo utilisés pour la détection sont: A76/18B2/D6 (anti-19-kDa), A68/04G1/C6 (anti-16.5-kDa) et A68/7G11/C10 (anti-10-kDa).

1. Dépôt d'1 μl
2. Dépôt de 2 μl
3. Dépôt de 5 μl
4. Dépôt de 10 μl



spécifique des LP's bactériennes, clive le peptide-signal et la cystéine devient le résidu amino-terminale. Deux acides gras sont liés au glycérol (avant le clivage du peptide-signal) et un troisième est attaché à la cystéine par une liaison amino-éther. Les acides gras liés à la cystéine amino-terminale auraient pour fonction d'ancrer les LP's dans la membrane. D'autres études ont révélé que l'acide palmitique (acide gras à 16C) faisait partie des acides gras majeurs de *B. canis* et *B.suis* (Dees et al., 1984).

Pour investiguer si les 3 OMPs mineures de *Brucella* sont liées de façon covalente à des acides gras, les bactéries sont marquées métaboliquement avec de l'acide palmitique tritié, extraites au Triton X-114 et les 3 OMPs devraient être isolées spécifiquement de la phase détergente par immunoprécipitation. Cette expérience a été menée en deux étapes: d'une part, les *E. coli* recombinantes et d'autre part, les *Brucella*.

III.3.1. Incorporation d'acide palmitique chez les *E. coli* recombinantes

Des cultures des 3 clones d'*E. coli* recombinantes (19.06, 16.18 et 10.22) et d'un témoin négatif (bactérie transformée par le plasmide non recombinant, SK-) ont été réalisées en duplicats en milieu minimum M9. Une culture a été mise en présence d'acide palmitique tritié, alors que l'autre culture a servi de contrôle pour vérifier par dot blot l'expression d'OMPs dans les conditions de culture utilisées **(figure IV.73)**. Signalons que d'après les études de cinétique d'expression menées précédemment, l'expression devient détectable après un temps de croissance, équivalent à 4 générations.

Les bactéries, cultivées en présence d'acide palmitique tritié, ont été récoltées par centrifugation. On a ensuite réalisé une extraction et une partition de phases au Triton X-114 sur le culot bactérien obtenu. Avec la phase détergente résultante, nous avons effectué une immunoprécipitation: épuisement de la phase détergente en présence de billes magnétiques et ensuite, mise en présence de la phase détergente avec des billes magnétiques couplées à des AcMo anti-OMPs pour tenter d'isoler l'antigène qui nous intéresse, c'est-à-dire l'OMP de *Brucella*.
Les AcMo utilisés sont des Ac qui reconnaissent les OMPs après SDS-PAGE (conditions dénaturantes) et à la surface cellulaire (configuration native).
Les complexes immuns formés sont dissociés des billes et analysés par SDS-PAGE, avec dépôt de 2000 dpm environ par piste du gel. Les antigènes radioactifs sont mis en évidence par fluorographie et autoradiographie.

Tableau IV.10 : Mesures de la radioactivité (en dpm) associée aux fractions successives obtenues au cours de cette expérience

La quantité de radioactivité introduite dans la culture représente 2 x 10^8dpm.
La quantité totale de radioactivité calculée correspond à la somme des fractions suivantes: culot insoluble + Aq1 + Aq2 + T1 + T2 + phase détergente finale + phase aqueuse finale.

Echantillon	SK-	19.06	16.18	10.22
E. coli récoltées	4.6 x 10^7	5 x 10^7	2.6 x 10^7	5.3 x 10^7
culot insoluble	1.5 x 10^6	1.2 x 10^6	1.3 x 10^6	1.4 x 10^6
T1 + T2	2.8 x 10^6	7.8 x 10^5	1.6 x 10^6	1.7 x 10^6
Aq1 + Aq2	1.1 x 10^6	8 x 10^5	1.1 x 10^6	5 x 10^5
phase aqueuse finale	9.6 x 10^4	15 x 10^5	13 x 10^5	7.9 x 10^4
phase détergente finale	3 x 10^7	1.7 x 10^7	1.5 x 10^7	1.8 x 10^7
total calculé	3.6 x 10^7	2.1 x 10^7	2 x 10^7	2.2 x 10^7
fixé aux billes après épuisement	4.3 x 10^5	2.3 x 10^5	3 x 10^5	3.5 x 10^5
surnageant récupéré après immuno-précipitation (=non fixé)	2.8 x 10^7	1.5 x 10^7	1.4 x 10^7	2 x 10^7
lavages des billes après immuno-précipitation	4.5 x 10^5	3.4 x 10^5	3 x 10^5	3 x 10^5
radioactivité récupérée après immuno-précipitation dans tampon d'échantillon	2.4 x 10^3	2.7 x 10^3	2.1 x 10^3	2.2 x 10^3

T_1 et T_2 représentent les contaminants extraits de la phase aqueuse à la première et à la deuxième extraction au Triton X-114.
Aq_1 et Aq_2 représentent la partie contaminante extraite de la phase détergente par la première et la seconde extraction.
Ces deux extractions sont réalisées pour éliminer les contaminants de chacune des phases.

Nous pouvons noter qu'à chaque étape du protocole, un aliquot des préparations a été prélevé afin de mesurer la radioactivité qui y est associée. Le pourcentage de radioactivité engagé associé aux bactéries correspond à une incorporation de 13 à 26% d'acide palmitique par les bactéries **(tableau IV.10)**.

On peut calculer la radioactivité incorporée en additionnant la radioactivité mesurée dans les différentes fractions obtenues (voir tableau). En tenant compte des pertes de matériel en cours d'extraction et des imprécisions de mesures réalisées, on peut considérer que les radioactivités totales incorporées calculées et mesurées sont du même ordre de grandeur. Comme attendu, la majorité de la radioactivité incorporée par *E. coli* se localise dans la phase détergente finale.

A chaque étape, les mesures de radioactivité sont du même ordre de grandeur pour le témoin SK- et pour les bactéries recombinantes: les constituants d'*E. coli* comme le LPS, les phospholipides et les lipoprotéines incorporent la majorité de la radioactivité, l'incorporation par la protéine recombinante ne constitue qu'une très faible proportion que cette mesure ne permet pas de mettre en évidence. La radioactivité dissociée des billes après immunoprécipitation n'en constitue qu'une très faible fraction et est semblable chez les bactéries recombinantes et SK-. Cette constatation est courante même lorsque le résultat de l'immunoprécipitation est positif.

Après un mois d'exposition à -70°C, aucune protéine marquée n'a été détectée par autoradiographie. Cette expérience n'a pu être répétée. Ce résultat négatif peut s'expliquer par toute une série de facteurs:

- l'isotope, le ^{3}H nécessite une longue période d'exposition. Cependant, il est déconseillé d'utiliser des acides gras marqués au ^{14}C, surtout en position 1, car ils sont sensibles à la dégradation par la ß-oxydation de l'acétyl CoA. Ce produit peut alors être réincorporé dans d'autres constituants cellulaires et la réincorporation de marquage peut donner des résultats faussés.
- expression trop faible de ces OMPs par rapport à l'ensemble des autres éléments de la bactérie, qui incorporent de l'acide palmitique tritié (LPS, phospholipides, lipoprotéines).
- les conditions de l'immunoprécipitation (tampon, détergents,...) ne favoriseraient pas la reconnaissance de l'OMP par l'AcMo.
- la quantité d'antigènes (et donc de bactéries) et/ou d'acide palmitique tritié engagée est insuffisante.

En définitive, dans cette expérience, on ne sait pas si ce sont les conditions de l'incorporation d'acide palmitique ou de l'immunoprécipitation qui posent problème. Pour répondre à cette interrogation, une expérience complémentaire devrait être réalisée: marquage métabolique des protéines avec un acide aminé radioactif, par exemple méthionine marquée au ^{35}S. Ceci permettrait de déterminer si les AcMo utilisés et les conditions d'immunoprécipitation sont adéquates. Mais, il faut sans doute également engager une plus grande quantité d'acide palmitique et un nombre plus important de bactéries.

III.3.2. Marquage métabolique des *Brucella* à l'acide palmitique tritié

Pour les bactéries *Brucella*, nous avons utilisé un milieu de culture riche contrairement à ce qui avait été fait pour les *E. coli* recombinantes (milieu minimum); en effet, le milieu synthétique RPMI (donc dépourvu d'acide palmitique) testé ne convient pas à la croissance des *Brucella*. Un ajustement des constituants du milieu synthétique est sans doute nécessaire.

Nous avons marqué métaboliquement *Brucella* à l'acide palmitique tritié; expérience réalisée en présence et en absence de globomycine. La globomycine avait été ajoutée, à raison de 100 µg/ml, 30 minutes avant l'addition d'acide palmitique au milieu de culture

Ce traitement devrait marquer notamment toutes les LP's de *Brucella*. En présence de globomycine, on devrait observer une série de bandes d'une masse moléculaire supérieure d'environ 2000 Da à celles obtenues en absence de globomycine. En effet, les proLP's sont déjà modifiés par 2 acides gras avant le clivage du peptide-signal et pourraient donc être marquées radioactivement dans cette expérience.

Les bactéries récoltées après culture, lavées et ultrasoniquées, subissent alors une extraction et une partition de phases au Triton X-114. Un SDS-PAGE permet ensuite de séparer les différentes protéines de la phase détergente, avec dépôt de 160000 dpm pour l'échantillon traité à la globomycine et de différentes quantités pour l'échantillon uniquement traité à l'acide palmitique. Les antigènes radioactifs sont mis en évidence par un traitement de fluorographie et d'autoradiographie.

Les résultats (non montrés) ne nous permettent pas de différencier les différents éléments de la bactérie possédant une partie lipidique (LPS, LP's et phospholipides). En effet, aussi bien pour l'échantillon traité à la globomycine et à l'acide palmitique tritié

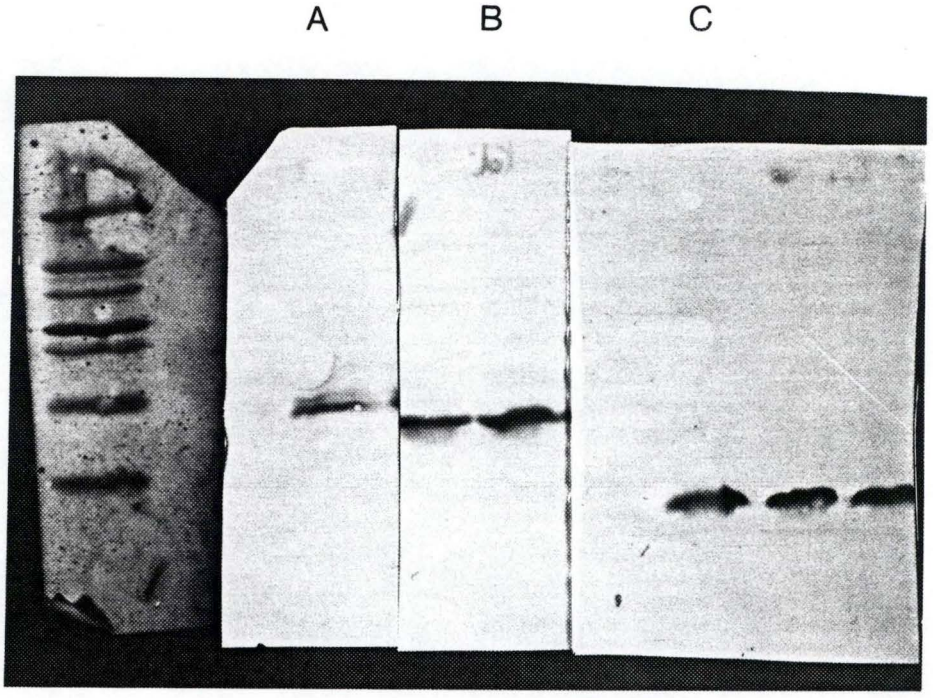
que celui uniquement traité à l'acide palmitique tritié, une seule bande apparaît à une masse moléculaire inférieure à 14000, pouvant correspondre à la lipoprotéine de *Brucella* équivalente à la LP de Braun ou au LPS-R. Aucun autre marquage n'a pu être mis en évidence.

L'incorporation d'acide palmitique s'est sans doute produite pour tous les éléments membranaires, lipoprotéines mais aussi phospholipides et LPS. Par conséquent, il serait judicieux de réaliser une délipidation par extraction au méthanol/chloroforme pour se débarrasser du LPS et des phospholipides avant d'analyser le marquage protéique.

Il sera nécessaire de réaliser également une immunoprécipitation avec des AcMo anti-OMPs sur la phase détergente issue de *Brucella* marquée à l'acide palmitique.

Figure IV.74 : SDS-PAGE suivi d'un Western blot pour tester l'effet du ß-mercaptoéthanol sur des extraits totaux de *B. melitensis* B115.

Dépôt de 40 μg de protéines par piste et détection à l'aide des AcMo anti-19-kDa A76/18B2/D6 (**A**), anti-16.5-kDa A68/04G1/C6 (**B**) et anti-10-kDa A68/7G11/C10 (**C**).



IV. Test de l'effet du ß-mercaptoéthanol

Dans la séquence peptidique (en aval du peptide-signal) de la protéine mature, on dénombre 2 résidus cystéine pour chacune des 3 OMPs. On peut se demander si ces cystéines ne forment pas des ponts disulfures interchaînes. En conditions non réductrices, ces protéines resteraient donc associées en dimères ou en multimères.

Nous avons utilisé des extraits totaux de *B. melitensis* B115 et d'*E. coli* recombinantes. Ils ont été analysés par SDS-PAGE (avec dépôt d'un excès de protéines, soit 40 μg estimé par BCA) en conditions non réductrices (sans ß-mercaptoéthanol) suivi d'un Western blot utilisant des AcMo anti-OMPs **(figure IV. 74)**.

Les seules bandes détectées correspondent aux monomères d'OMPs, comme dans les expériences semblables menées en conditions réductrices **(figures IV. 69, piste "extrait total")**.

Ainsi, nous n'avons pas mis en évidence de bandes correspondant à des poids moléculaires multiples des monomères. Par conséquent, même s'il existe des ponts disulfures interchaînes dans ces protéines, cette expérience n'a pas permis de montrer leur existence ni chez *Brucella* ni chez les *E. coli* recombinantes. Peut-être aurions-nous encore déposé un plus large excès de protéines sur le gel afin de détecter d'éventuelles associations de monomères.

DISCUSSION et CONCLUSIONS

La séquence protéique a été déduite de la séquence nucléotidique des 3 OMPs mineures de *Brucella*. Son analyse révèle la présence d'un tétrapeptide consensus dans le peptide-signal, caractéristique des lipoprotéines, décrit comme siège de la modification lipidique.

Dans la littérature, l'identification des lipoprotéines bactériennes repose principalement sur quatre arguments expérimentaux:

- présence dans la séquence protéique déduite d'un peptide-signal potentiel contenant la séquence consensus (Leu, Val, Ile)-(Ala, Ser, Thr, Gly)-(Gly, Ala)-Cys;
- partition de phases au Triton X-114 et détection de la protéine au niveau de la phase détergente;
- effet de la globomycine sur la maturation de la prolipoprotéine avec inhibition du clivage du peptide-signal par la peptidase signal II;
- marquage des lipoprotéines à l'acide palmitique démontré par incorporation métabolique d'acide palmitique tritié par les bactéries suivie d'une radioimmunoprécipitation.

Plus rarement, des lipoprotéines isolées ont été hydrolysées et les acides gras libérés ont été analysés par HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) (Brandt et al., 1990).

Sur base de ces exigences, nous avons établi un protocole de caractérisation des 3 protéines mineures de *Brucella*, les OMPs de 19-, 16.5- et 10-kDa.

Concernant les bactéries *E. coli* recombinantes disponibles pour l'étude des 3 OMPs de *Brucella*, nous avons élaboré l'hypothèse suivante: les bactéries recombinantes exprimant l'entièreté de la séquence protéique native sont exposées en surface et sont modifiées de manière covalente par un lipide. Par contre, les bactéries recombinantes exprimant une protéine de fusion dépourvue de peptide-signal et de résidu cystéine ne sont pas exposées en surface et sont solubles.

Les deux tableaux suivants représentent une synthèse des résultats obtenus au cours de ce travail sur les bactéries *Brucella* et les clones d'*E. coli* recombinants exprimant ces OMPs. Les résultats en désaccord avec notre hypothèse de travail sont indiqués en caractères gras.

Clones d'*E. coli* recomb.	fractions		exposition en surface (ELISA indirect et MET)	partition au Triton X-114		maturation influencée par la globomycine
	PI	PS		phase aqueuse	phase détergente	
<u>gène entier</u>						
19.06	+	+	+	- (c)	+	+
16.18	+	+	+	- (c)	+	+
10.22	+	-	+	-	+	+
<u>gène de fusion</u>						
19.05F	+	+	-	+	-	-
16.04F	+	+	+	+	+	-
10.07F	-	+	-	+	-	-

(c): contamination très légère

OMP de *Brucella*	exposition en surface (ELISA indirect et MET) (Cloeckaert et al., 1990)	partition au Triton X-114		maturation influencée par la globomycine
		phase aqueuse	phase détergente	
19	+	-	+	+
16.5	+	-	+	+
10	+	-	+	+

Face aux résultats obtenus dans la partition de phases au Triton X-114 et lors du test de l'effet de la globomycine sur la maturation des protéines, nous pouvons tirer deux conclusions:

1) Les molécules des 3 OMPs synthétisées après l'addition de globomycine au milieu de culture n'ont pas été clivées de leur peptide-signal. La globomycine est décrite comme étant un inhibiteur de la peptidase signal II (SPase spécifique des lipoprotéines) chez les microorganismes testés. La SPase II serait donc responsable du clivage du peptide-signal des 3 OMPs. Cet effet inhibiteur de la globomycine constitue l'un des quatre arguments repris dans la littérature pour identifier des lipoprotéines.
   Il serait intéressant de tester l'effet de la globomycine sur la maturation d'OMPs non lipoprotéiques (les OMP 25 et 36) afin de s'assurer que chez *Brucella* aussi la globomycine n'interagit pas avec la SPase I mais affecte spécifiquement la SPase II.
2) La répartition des 3 OMPs dans la phase détergente ne s'explique pas par les propriétés de leur séquence en acides aminés. En effet, des protéines de fusion contenant la majorité de la séquence des OMPs matures se localisent dans la phase aqueuse. D'autant plus que selon le profil d'hydrophobicité (Kyte et Doolittle), seul le peptide-signal de la séquence protéique présente des propriétés hydrophobes. La modification covalente des OMPs par un lipide expliquerait leur localisation en phase détergente; second argument en faveur de leur nature lipoprotéique.

L'expérience de marquage métabolique des 3 OMPs par de l'acide palmitique tritié sera nécessaire pour confirmer leur identification comme lipoprotéines. Par ailleurs, le palmitate est reconnu comme hautement spécifique des liens thioéther (Olson et al., 1985) et il existe une acylation préférentielle des protéines de la membrane externe avec le palmitate (Thirkell et al., 1991).

Considérons que ces 3 OMPs sont processées et modifiées chez *Brucella* suivant le même schéma que la lipoprotéine de Braun (à l'exception de la liaison covalente au peptidoglycane) (Braun, 1975). La membrane cytoplasmique de *Brucella* serait le siège de cette maturation.

Comment ces lipoprotéines traversent-elles le périplasme et la membrane externe de sorte que des épitopes peptidiques soient exposés en surface ?
L'hypothèse proposée pour le passage du périplasme par Pugsley (1993) suggère qu'il existerait un signal du tri des lipoprotéines qui pourrait activement les diriger vers la membrane externe. Alternativement, le signal du tri (résidu aspartate en position +2)

peut conduire à ce que les lipoprotéines restent ancrées à la membrane cytoplasmique au lieu de rejoindre le flux de lipoprotéines allant vers la membrane externe. Ce modèle pour le tri des protéines implique l'existence d'un transporteur hypothétique qui reconnaîtrait le signal de rétention/tri. Chez les 3 OMPs de *Brucella* qui font l'objet de ce travail, on ne retrouve pas ce résidu aspartate en position +2.
L'étape menant à l'exposition en surface de la membrane externe de boucles peptidiques (épitopes spécifiques) des lipoprotéines pose encore de multiples questions. On propose que cette sécrétion aboutit à l'ancrage de l'OMP dans le feuillet externe de la membrane externe par la partie lipidique.

Les 3 OMPs de *Brucella* sont exprimées à la surface d'*E. coli* à partir de leur gène entier (clones 19.06, 16.18 et 10.07). Après partition au Triton X-114, elles sont principalement détectées en phase détergente et la globomycine inhibe le clivage de leur peptide-signal. La maturation hétérologue des 3 OMPs de *Brucella* par les enzymes de clivage et de modification des *E. coli* est donc efficace. Ceci indique que le peptide-signal, la séquence consensus et les enzymes impliqués dans le phénomène de maturation sont très proches d'un genre à l'autre.

La seule lipoprotéine décrite à ce jour chez *Brucella* est l'équivalent de la lipoprotéine de Braun (Gomez-Miguel et al., 1987; Gomez-Miguel and Moryion, 1986) , dont le gène, à notre connaissance, n'a pas été cloné. Aucune étude concernant la machinerie de maturation ou les séquences consensus de lipoprotéines n'a été rapportée à ce jour chez *Brucella*. Nos résultats montrent que *Brucella* utilise également cette voie de modification des protéines extracytoplasmiques. Le processus de maturation paraît semblable à celui classiquement décrit chez d'autres microorganismes comme *Haemophilus influenzae*, *Treponema pallidum* ou *Serpulina hyodysenteriae*,..(Akins et al., 1993; Thomas and Sellwood, 1992; Janson et al., 1992).

Le fait qu'une partie des molécules d'OMP puisse se retrouver en phase soluble (clones 19.06 et 16.18) pourrait signifier qu'elles ont été clivées de leur partie lipidique ou que malgré le clivage du peptide-signal, le résidu cystéine n'aurait pas été modifié. Ces deux hypothèses sont toutefois en contradiction avec l'absence quasi complète de la protéine en phase aqueuse après la partition de phases au Triton X-114. Nous pensons donc plutôt qu'il s'agit d'une contamination de la fraction dite soluble et une méthode de fractionnement en conditions plus drastiques permettrait peut-être de diminuer ces artéfacts expérimentaux.

L'OMP recombinante exprimée sans peptide-signal devrait rester dans le cytoplasme et être soluble. Elle ne subit en effet pas de modification lipidique, car elle ne contient ni tétrapeptide consensus ni cystéine. De plus, sa séquence en acides aminés est hydrophile.
En effet, les protéines de fusion exprimées par les clones 19.05F et 10.07F restent dans le cytoplasme et se comportent comme des protéines solubles, à l'exception du clone 19.05F, dont la protéine recombinante est également localisée dans la fraction insoluble lors du fractionnement. Plusieurs éléments sont proposés pour expliquer ce résultat:

- soit les fractions sont très contaminées et le protocole de fractionnement grossier n'est pas adéquat;
- soit l'OMP 19, par sa séquence en acides aminés, interagit avec certains constituants insolubles lors du protocole de fractionnement. Elle ne serait cependant pas insoluble par elle-même, car elle se retrouve en phase aqueuse après partition de phases au Triton X-114.

Par contre, les résultats obtenus pour la protéine exprimée sans peptide-signal par le clone 16.04F, concernant son exposition à la surface et sa répartition en phases insoluble et détergente contrarient de façon importante les hypothèses émises précédemment. Ainsi, trois éléments apparaissent inexpliqués et sont sans aucun doute liés:

- comment cette protéine dépourvue de peptide-signal peut-elle être transloquée à travers la membrane cytoplasmique ?
- de quelle manière la protéine peut-elle former des structures amphiphiles lui permettant de s'associer avec le détergent; la séquence de la protéine ne comportant pas de zone hydrophobe ?
- comment cette protéine qui ne devrait pas être modifiée par un lipide (pas de séquence consensus, pas de résidu cystéine) est-elle ancrée dans la membrane externe ?

Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer l'exposition en surface:

1) Ces résultats constitueraient un artéfact expérimental, mais la protéine de fusion est mise en évidence alors que le test de fixation à la glutaraldéhyde ou de détection du peptidoglycane ne permettent pas de mettre en doute l'intégrité de la membrane externe.
2) Un signal intrinsèque à l'OMP 16.5 ou formé suite à la fusion génique existerait et serait reconnu par des protéines de la voie de sécrétion. Une recherche de motifs caractéristiques des protéines n'a pas permis de mettre en évidence un tel élément.
3) Les premiers acides aminés apportés par la ß-galactosidase formeraient un pseudo peptide-signal. Ces acides aminés sont aussi exprimés en fusion avec l'OMP 10

dans le clone 10.07F, alors que la protéine de fusion n'y est pas accessible en surface.

4) L'OMP recombinante s'associerait à d'autres composants du cytoplasme exportés en surface et elle resterait attachée à eux tout au long du processus de sécrétion. Les travaux de Fuchs et al. (1991) montrent que la lipoprotéine associée au peptidoglycane (PAL) d'*E. coli* semble être un excellent vecteur pour le transport de protéines recombinantes. Rappelons que la séquence de l'OMP 16.5 présente un haut degré de similarité avec cette PAL d'*E. coli.* Ces auteurs ont construit une protéine de fusion constituée de 3 parties: peptide-signal non lipoprotéique, séquence mature de PAL où le résidu cystéine amino-terminal est remplacé par le résidu glycine et la portion d'immunoglobuline (Ig) mature avec attachement de l'Ig à l'extrémité amino-terminale de la PAL. Cette construction est différente de la nôtre puisque l'OMP 16.5 recombinante du clone 16.04F ne possède pas de peptide-signal. Les auteurs suggèrent que la PAL faciliterait le passage de la protéine de fusion à travers les membranes externe et interne. Ils n'expliquent cependant pas en quoi la fusion avec PAL permet l'exposition en surface.

La liaison au peptidoglycane (feuillet interne de la membrane externe) et l'exposition en surface (feuillet externe de la membrane externe) semblent être deux phénomènes incompatibles, peut-être que les molécules de cette protéine sont réparties en deux populations. Cette contradiction est également signalée pour l'équivalent de la lipoprotéine de Braun chez *Brucella* où la lipoprotéine est exposée en surface et liée de façon covalente au peptidoglycane (Gomez-Miguel et al., 1987). La protéine adopte peut-être une structure amphiphile transmembranaire qui conduit à l'exposition en surface de certains épitopes peptidiques de la protéine ou peut-être l'association au peptidoglycane est-elle un artéfact expérimental de la préparation qui ne se retrouve pas *in vivo* ?

Le fait de retrouver la protéine exprimée par 16.04F dans les fractions insoluble et soluble, détergente et aqueuse, signifie peut-être que la protéine adopte une structure amphiphile, c'est-à-dire que la séquence en acides aminés contiendrait une région capable d'adopter une structure secondaire amphiphile pour permettre l'insertion de la protéine dans la membrane externe. Nous n'avons pas pu le mettre en évidence.

Un profil de bandes multiples est observé pour les protéines exprimées par les clones 16.04F et 10.07F. Des bandes distinctes apparaissent et on n'observe pas de traînée de dégradation. Deux explications peuvent être avancées:

1) Ces bandes pourraient être le résultat d'une dégradation par des protéases d'*E. coli* à des sites spécifiques.Des travaux ont montré la production importante de protéases dans les bactéries *E. coli* exprimant des protéines étrangères.
2) la séquence nucléotidique peut aussi contenir différents codons ATG (ou GTG) qui seraient utilisés comme initiateurs alternatifs de traduction.

Clone	position du codon	taille de la protéine (Da)
16.04	1 (ATG)	18995
	7 (ATG)	18763
	70 (GTG)	16575*
	91 (GTG)	15907
10.07	1 (ATG)	14138
	7(ATG)	13905
	70 (GTG)	11717*
	91 (ATG)	11050

Les 98 premiers nucléotides apportés par le gène de la ß-galactosidase sont identiques pour les clones 16.04F et 10.07F.
Parmi les différents codons ATG et GTG contenus dans cette séquence de 98 nucléotides, seul le codon GTG en position 70 est précédé de la séquence GGAG qui répond au consensus du site de fixation du ribosome à l'ARN messager (= séquence de Shine-Dalgarno). La présence de cette séquence signal fait de ce GTG un codon initiateur potentiel. Cependant, elle est localisée 10 nucléotides en amont du GTG alors que la distance classiquement décrite (Lewin, 1987) est de 7 nucléotides. Si ce codon alternatif est utilisé lors de la traduction, la protéine résultante présenterait une masse moléculaire de 2500 Da inférieure à la protéine entière. Ceci correspond à la taille observée, mais cette hypothèse devrait être confirmée.

Nous pouvons à présent examiner la question de la fonction de ces lipoprotéines bactériennes. Pour les OMPs 19 et 10, il nous est difficile de déduire leur fonction, ne disposant pas de données pour des protéines similaires décrites chez d'autres microorganismes. Quant à l'OMP 16.5, elle montre une similarité importante

avec 3 lipoprotéines associées au peptidoglycane (PAL) chez d'autres microorganismes (*E. coli, Haemophilus influenzae* et *Legionella pneumophila*). Bien que la fonction des protéines PAL chez les bactéries Gram-négatives ne soit pas définie, elles semblent essentielles à la survie chez *E. coli* et *H. influenzae* et elles joueraient un rôle dans le maintien de la structure de la paroi de la bactérie (Chen and Henning, 1987; Green et al., 1990), peut-être l'OMP 16.5 a-t-elle un rôle similaire chez *Brucella*.

Le rôle des LP's dans l'interaction avec le système immunitaire est également posé: tous les AcMo, à notre disposition, dirigés contre ces 3 OMPs reconnaissent des épitopes exposés en surface. Cette observation signifierait-elle que l'entièreté de la séquence peptidique est exposée en surface ? Cette reconnaissance d'épitopes exposés en surface aurait-elle une signification biologique particulière dans l'interaction du système immunitaire de l'hôte avec le pathogène *Brucella* ?

L'utilisation de l'extraction et de la partition de phases au Triton X-114 dans ce travail nous a permis d'étudier la nature biochimique des 3 OMPs. En réalisant un marquage métabolique de *Brucella* à l'acide palmitique, on pourrait dénombrer les protéines présentes dans cette phase détergente de *Brucella* après élimination du LPS et des phospholipides par délipidation (extractions au méthanol-chloroforme) ce qui conduirait à l'identification d'autres lipoprotéines de *Brucella*. On peut aussi utiliser la phase détergente comme source de protéines de *Brucella* pour identifier des antigènes de diagnostic sérologique intéressants. Il faudrait tester si les sérums d'animaux infectés contiennent des anticorps dirigés contre des protéines présentes dans la phase détergente.

PERSPECTIVES

L'étude des 3 protéines mineures de la membrane externe de *Brucella* peut se poursuivre selon trois axes de recherche: confirmation de la nature lipoprotéique, détermination de leurs fonctions et utilisation potentielle de ces 3 OMPs pour la mise au point de tests de diagnostic et de vaccination compatibles.

Tout d'abord, on doit réaliser le marquage métabolique des *Brucella* à l'acide palmitique tritié et réaliser une radioimmunoprécipitation des 3 OMPs mineures à l'aide d'AcMo anti-OMP. Cette expérience permettra de vérifier la liaison covalente des 3 OMPs à l'acide palmitique. Le marquage métabolique permettra également d'identifier les autres lipoprotéines de *Brucella,* mais une délipidation doit être envisagée pour se débarrasser du LPS et des phospholipides, c'est-à-dire tous les lipides qui ne sont pas attachés de manière covalente aux protéines.
On pourrait aussi évaluer l'importance du résidu cystéine dans la maturation des lipoprotéines de *Brucella,* en remplacant, dans les 3 OMPs, le résidu cystéine par un autre résidu comme la glycine par mutagenèse dirigée sur le clone recombinant. Ceci permettrait de voir si la modification lipidique du résidu cystéine est essentielle à la mise en membrane et à l'exposition en surface d'épitopes peptidiques de la protéine.

L'OMP 16.5 de *Brucella* présentant un haut degré de similarité avec trois lipoprotéines associées au peptidoglycane (PALs) chez d'autres microorganismes, il serait intéressant de montrer son éventuelle association avec le peptidoglycane. Dans la littérature, cette affirmation repose sur la localisation de la PAL dans une fraction obtenue à partir des enveloppes cellulaires et décrite comme contenant les protéines associées au peptidoglycane (Ludwig et al., 1991).

On pourrait également déterminer si ces 3 OMPs sont essentielles à la survie de *Brucella* en construisant des souches de *Brucella* délétées du gène de l'OMP. Si le délétant est viable, cela signifie que l'OMP n'est pas essentielle à la survie de la bactérie. Mais, il est également intéressant de vérifier que la bactérie n'a pas réagit à la mutation en régulant différemment le taux d'expression des autres protéines membranaires, à l'aide des AcMo à notre disposition. Des études morphologiques, des tests de sensibilité aux phages décrits comme infectieux chez *Brucella* pourront être menées. Ces délétants devraient donc permettre d'étudier le rôle de ces OMPs dans la virulence et dans la protection; il a été décrit pour beaucoup de microorganismes (*Legionella pneumophila*, *Serpulina hyodysentariae,...*) que les OMPs jouent un rôle majeur dans la pathogénie de la maladie (Thomas and Sellwood, 1993; Ludwig et al., 1991).

Le but poursuivi en brucellose est de trouver des antigènes de diagnostic différents des antigènes protecteurs pour permettre la mise au point d'un vaccin et d'un test de dépistage compatibles. Les OMPs pourraient également s'avérer intéressantes pour la mise au point d'un vaccin si elles ne sont essentielles ni à la survie des *Brucella* ni au pouvoir protecteur du vaccin. On envisagerait alors la production d'un vaccin vivant par délétion dans les souches vaccinales de *Brucella* du gène codant pour une protéine utile pour le diagnostic. Les tests diagnostiques viseraient alors la détection d'anticorps ou de cellules T induits par ces antigènes présents uniquement dans les souches infectieuses.

On pourrait aussi tester l'utilité des 3 OMPs de *Brucella* caractérisées dans ce travail, les OMPs de 19-, 16.5- et 10-kDa en diagnostic sérologique et allergique.
On évaluerait, par test ELISA indirect utilisant comme antigènes les OMPs recombinantes (surexprimées et purifiées par Innogenetics), la présence d'anticorps dirigés contre ces OMPs chez les animaux infectés par *Brucella*. Cependant, la sensibilité du test (c'est-à-dire voir si le test permet la détection d'un maximum d'animaux infectés) et la spécificité vis-à-vis d'une infection brucellique d'un test de dépistage utilisant les OMPs devront être vérifiées.
Les protéines recombinantes peuvent aussi être testées dans des épreuves d'immunité cellulaire comme l'épreuve allergique en intradermo réaction (IDR) ou dans un test d'interferon-γ. Ce test vise la détection de l'interferon-γ dans le plasma sanguin des animaux. En effet, les recherches menées chez l'homme et la souris indiquent que les lymphocytes impliqués dans une réaction d'hypersensibilité retardée, comme c'est le cas en brucellose, sont du type TH_1, c'est-à-dire sécréteurs d'interleukine-2 et d'interferon-γ.

BIBLIOGRAPHIE

AKINS, D.R., PURCELL, B.K., MITRA, M.M., NORGARD, M.V., and RADOLF, J.D. 1993.
Lipid Modification of the 17-Kilodalton Membrane Immunogen of *Treponema pallidum* Determines Macrophage Activation.
Infect. Immun., **6 1**: 1202-1210.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., and WATSON, J.D. 1989.
Biologie moléculaire de la cellule.
Médecine-Sciences Flammarion.

ALLARDET-SERVENT, A., BOURG, G., RAMUZ, M., PAGES, M., BELLIS, M., and ROIZES, G. 1988.
DNA Polymorphism in Strains of the Genus *Brucella.*
J. Bacteriol., **1 7 0** : 4603-4607.

ALTON, G.G., JONES, L.M., ANGUS, R.D., VERGER, J.M. 1988.
Techniques for the brucellosis laboratory.
Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.

ANONYME. 1992a.
Le problème sanitaire dans le secteur animal.
Agricontact, 245.

ANONYME. 1992b.
Evolution des structures de lutte contre les maladies des animaux.
Agricontact, 242.

ANONYME. 1991.
SANITEL offrira de nouvelles possibilités pour la politique en matière de santé des animaux.
Agricontact, 226.

ANONYME. 1988.
Lutte contre la brucellose bovine - Hiver 1988-89.
Agricontact, 199.

ANONYME. 1977.
Brucellosis : a veterinian's guide to the litterature.
Ministry of agriculture and fisheries. New Zealand.

BALDWIN, C.L., JIANG, X., and FERNANDES, D.M. 1993.
Macrophage control of *Brucella abortus*: influence of cytokines and iron.
Trends in Microbiol., **1** : 99-104.

BANG, B. 1897.
The Ethiology of epizootic abortion.
J. Comp. Path., **1 0**: 125-149.

BAUMLER, A.J., and HANTKE, K. 1992.
A Lipoprotein of *Yersinia enterocolitica* Facilitates Ferrioxamine Uptake in *Escherichia coli.*
J. Bacteriol., **1 7 4** : 1029-1035.

BECK, B.L., TABATABAI, L.B., and MAYFIELD, J.E. 1990.
A protein isolated from *Brucella abortus* is a Cu-Zn superoxide dismutase.
Biochem., **2 9** : 372-376.

BERCHE, P., GAILLARD, J-L., and SIMONET, M. 1989.
Les Brucelles.
Dans "Bactériologie. Bactéries des infections humaines".
Médecine-Sciences Flammarion, 189-199.

BERTHELOT, X., and GARIN-BASTUJI, B. 1993.
La brucellose : dépistage et prophylaxie.
Le Point Vétérinaire, **25** : 13-37.

BERTHOT, V. 1985.
La police sanitaire.
Agricontact, 165.

BETTS, M., BEINING, P., BRUNSWICK, M., INMAN, J., ANGUS, R.D., HOFFMAN, T., and GOLDING, B. 1993.
Lipopolysaccharide from *Brucella abortus* Behaves as a T-Cell-Independent Type 1 Carrier in Murine Antigen-Specific Antibody Responses.
Infect. Immun., **61**: 1722-1729.

BIESERT, L., SCHEVER, W., and BESSLER, W.G. 1987.
Interaction of mitogenic bacterial lipoprotein and a synthetic analogue with mouse lymphocytes.
Eur. J. Biochem., **162** : 651-657.

BOOTH, R.J., WILLIAMS, D.L., MOUDGIL, K.D., NOONAN, L.C., GRANDISON, P.M., McKEE, J.J., PRESTIDGE, R.L., and WATSON, J.D. 1993.
Homologs of *Mycobacterium leprae* 18-Kilodalton and *Mycobacterium tuberculosis* 19-Kilodalton Antigens in Other Mycobacteria.
Infect. Immun., **61** : 1509-1515.

BORDIER, C. 1981.
Phase Separation of Integral Membrane Proteins in Triton X-114 Solution.
J. Biol. Chem., **256** : 1604-1607.

BRANDT, M.E., RILEY, B.S., RADOLF, J.D., and NORGARD, M.V. 1990.
Immunogenic Integral Membrane Proteins of *Borrelia burgdorferi* Are Lipoproteins.
Infect. Immun., **58** : 983-991.

BRAUN, V., ROTERIN, H., OHMS, J-P., and HAGENMAIER, H. 1976.
Conformational Studies on Murein-Lipoprotein from the Outer Membrane of *Escherichia coli.*
Eur. J. Biochem., **70** : 601-610.

BRAUN, V. 1975.
Covalent Lipoprotein from the Outer Membrane of *Escherichia coli.*
Bioch. Biophys. Acta, **415** : 335-377.

BRAUN, V., and SIEGLIN, U. 1970.
The Covalent Murein-Lipoprotein Structure of the *Escherichia coli* Cell Wall.
Eur. J. Biochem., **13** : 336-346.

BRAUN, V., and REHN, K. 1969.
Chemical Characterization, Spatial Distribution and Function of a Lipoprotein (Murein-Lipoprotein) of the *E. coli* Cell Wall. The Specific Effect of Trypsin on the Membrane Structure.
Eur. J. Biochem., **10** : 426-438.

BRUCE, D. 1887.
Note on the discovery of a micro-organism in Malta fever.
Practitioner, **39** : 161.

CANNING, P.C. 1990.
Phagocyte Function in Resistance Brucellosis.
In "Advances in Brucellosis Research"; Adams, L.G. 1990; Texas A & M University Press: 157-163.

CHAMBERLAIN, N.R., BRANDT, M.E., ERWIN, A.L., RADOLF, J.D., and NORGARD, M.V. 1989.
Major Integral Protein Immunogens of *Treponema pallidum* Are Proteolipids.
Infect. Immun., **57** : 2872-2877.

CHAMBERLAIN, N.R., RADOLF, J.D., HSU, P.L., SELL, S., and NORGARD, M. 1988.
Genetic and Physiochemical Characterization of the Recombinant DNA-Derived 47-Kilodalton Surface Immunogen of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*.
Infect. Immun., **56** : 71-78.

CHEN, R., and HENNING, U. 1987.
Nucleotide sequence of the gene for the peptidoglycan-associated lipoprotein of *Escherichia coli* K12.
Eur. J. Biochem., **163** : 73-77.

CHART, H., OKUBADEJO, O.A., and ROWE, B. 1992.
The serological relationship between *Escherichia coli* O157 and *Yersinia enterocolitica* O9 using sera from patients with brucellosis.
Epidemiol. Infect., **108** : 77-85.

CHATTOPADHYAY, P.K., and WU, H.C. 1977.
Biosynthesis of the covalently linked diglyceride in murein lipoprotein of *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74** : 5318-5322.

CHERWONOGRODZKY, J.W., DUBRAY, G., MORENO, E., and MAYER, H. 1990.
Antigens of *Brucella*.
In "Animal Brucellosis"; Nielsen, K., and Duncan, J.R.1990; CRC Press: 19-64.

CHRISTIE, A.B. 1980.
Brucellosis. Undulant Fever. Malta or Mediterranean Fever.
In "Infectious Diseases: Epidemiology and Clinical Practice" (third ed.),
Churchill Livingstone, 824-844.

CLOECKAERT, A. 1992.
Identification, à l'aide d'anticorps monoclonaux, d'antigènes de la membrane externe de *Brucella* utilisables pour le développement d'un vaccin ou d'un test de diagnostic.
Thèse de doctorat, UCL.

CLOECKAERT, A., ZYGMUNT, M.S., NICOLLE, J-C., DUBRAY, G., and LIMET, J.N. 1992a.
O-chain expression in the rough *Brucella melitensis* strain B115: induction of O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies and intracellular localization demonstrated by immunoelectron microscopy.
J. Gen. Microbiol., **138** : 1211-1219.

CLOECKAERT, A., KERKHOFS, P., and LIMET, J.N. 1992b.
Antibody Response to *Brucella* Outer Membrane Proteins in Bovine Brucellosis: Immunoblot Analysis and Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Monoclonal Antibodies.
J. Clin. Microbiol., **30** : 3168-3174.

CLOECKAERT, A., JACQUES, I., BOSSERAY, N., LIMET, J.N., BOWDEN, R., DUBRAY, G., and PLOMMET, M. 1991.
Protection conferred on mice by monoclonal antibodies directed against outer-membrane-protein antigens of *Brucella*.
J. Med. Microbiol., **34** : 175-180.

CLOECKAERT, A., de WERGIFOSSE, P., DUBRAY, G., and LIMET, J.N. 1990.
Identification of Seven Surface-Exposed *Brucella* Outer Membrane Proteins by Use of Monoclonal Antibodies: Immunogold Labeling for Electron Microscopy and Enzyme-Linked

Immunosorbent Assay.
Infect. Immun., **58** : 3980-3987.

CRAWFORD, R.P., HUBER, J.D., and ADAMS, B.S. 1990.
Epidemiology and Surveillance.
In "Animal Brucellosis"; Nielsen, K., and Duncan, J.R. 1990; CRC Press.

CUMMINS, C.S. 1990.
Bacterial Cell Wall.
In "General Microbiology", Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., and Lukeelis, M.L., Mac Millan.

DEES, S.B., HOLLIS, D.G., WEAVER, R.E., and MOSS, C.W. 1981.
Cellular Fatty Acids of *Brucella canis* and *Brucella suis*.
J. Clin. Microbiol., **14** : 111-112.

de WERGIFOSSE, P. 1992.
Analyse génétique et immunologique de deux protéines de la membrane externe de *Brucella abortus*: l'OMP 25 et l'OMP 36.
Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Siences zoologiques.

DEICH, R.A., METCALF, B.J., FINN, C.W., FARLEY, J.E., and GREEN, B.A. 1988.
Cloning of Genes Encoding a 15,000-Dalton Peptidoglycan-Associated Outer Membrane Lipoprotein and an Antigenically Related 15,000-Dalton Protein from *Haemophilus influenzae*.
J. Bacteriol., **170** : 489-498.

DEV, I.K., HARVEY, R.J., and RAY, P.H. 1985.
Inhibition of Prolipoprotein Signal Peptidase by Globomycin.
J. Biol. Chem., **260** : 5891-5894.

DEV, I.K., and RAY, P.H. 1984.
Rapid Assay and Purification of a Unique Signal Peptidase that Processes the Prolipoprotein from *Escherichia coli* B.
J. Biol. Chem., **259** : 11114-11120.

ENRIGHT, F.M. 1990.
The Pathogenesis and Pathobiology of *Brucella* Infections in Domestic Animals.
In "Animal Brucellosis"; Nielsen, K., and Duncan, J.R. 1990; CRC Press:301-320.

EVANS, A.C. 1918.
Further Studies on *Bacterium abortus* and related bacteria. A comparison of *Bacterium abortus* with *Bacterium bronchinyticum* and with the organism which causes Malta Fever.
J. Infect. Dis., **2**: 580.

FICHT, T.A., BEARDEN, S.W., SOWA, B.A., and ADAMS, L.G. 1988.
A 36-Kilodalton *Brucella abortus* Cell Envelope Protein Is Encoded by Repeated Sequences Closely Linked in the Genomic DNA.
Infect. Immun., **56**: 2036-2046.

FLESK, I.E.A., and KAUFMANN, S.H.E. 1990.
Cell-Mediated Immunity Against Intracellular Bacteria.
In "Advances in Brucellosis Research"; Adams, L.G. 1990; Texas A & M University Press.

FUCHS, P., BREITLING, F., DUBEL, S., SEEMANS, T., and LITTLE, M. 1991.
Targeting Recombinant Antibodies to the Surface of *Escherichia coli*: fusion to a peptidoglycan associated lipoprotein.
Bio/Technology, **9** : 1369-1372.

GAMAZO, C., WINTER, A.J., MORIYON, I., RIEZU-BOJ, J.I., BLASCO, J.M., and DIAZ, R. 1989.

Comparative Analyses of Proteins Extracted by Hot Saline or Released Spontaneously into Outer Membrane Blebs from Field Strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*.
Infect. Immun., **57**: 1419-1426.

GARIN-BASTUJI, B., BOWDEN, R.A., DUBRAY, G., and LIMET, J.N. 1990.
Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Immunoblotting Analysis of Smooth-Lipopolysaccharide Heterogeneity among *Brucella* Biovars Related to A and M Specificities.
J. Clin. Microbiol., **28**: 2169-2174.

GIAM, T.Z., CHAI, T., HAYASHI, S., and WU, H.C. 1984.
Prolipoprotein modification and processing in *Escherichia coli*.
Eur. J. Biochem., **141** : 331-337.

GOMEZ-MIGUEL, M.J., MORIYON, I., and LOPEZ,J. 1987.
Brucella Outer Membrane Lipoprotein Shares Antigenic Determinants with *Escherichia coli* Braun Lipoprotein and Is Exposed on the Cell Surface.
Infect. Immun., **55** : 258-262.

GOMEZ-MIGUEL, M.J., and MORIYON, I. 1986.
Demonstration of a Peptidoglycan-Linked Lipoprotein and Characterization of Its Trypsin Fragment in the Outer Membrane of *Brucella spp.*
Infect. Immun., **53** : 678-684.

GOODMAN, L.S., and GILMAN, A. 1975.
The Pharmacological Basis of Therapeutics.
Mac Millan, New-York.

GREEN, B.A., METCALF, B.J., QUINN-DEY, T., KIRKLEY, D.H., QUATAERT, S.A., and DEICH, R.A. 1990.
A Recombinant Non-Fatty Acylated Form of the Hi-PAL (PG) Protein of *Haemophilus influenzae* Elicits Biologically Active Antibody against Both Nontypeable and Type b *H. influenzae*.
Infect. Immun., **58** : 3272-3278.

GREEN, B.A., QUINN-DEY, T., and ZLOTNICK, G.W. 1987.
Biologic Activities of Antibody to a Peptidoglycan-Associated Lipoprotein of *Haemophilus influenzae* against Multiple Clinical Isolates of *H. influenzae* Type b.
Infect. Immun., **55** : 2878-2883.

GREENWOOD, D., SLACK, R., and PEUTHERER, J. 1992.
Medical Microbiology. A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control.
Churchill Livingstone.

GRIMONT, F., VERGER, J.M., CORNELIS, P., LIMET, J.N., LEFEVRE, M., GRAYON, M., REGNAULT, B., VAN BROECK, J., and P.A.D. GRIMONT. 1992.
Molecular typing of *Brucella* with cloned DNA probes.
Ins. Pasteur/Elsevier, **143** : 55-65.

HARDY, A.V., JORDAN, C.F., BORTS, I.H., et al. 1931.
Undulant fever : With special reference to a study of *Brucella* infections in Iowa.
US Natl. Inst. Health Bull., 158: 89.

HAYASHI, S., and WU, H.C. 1990.
Lipoproteins in Bacteria.
J. Bioenerg. and Biomembr., **22**: 451-471.

HIRSCHFIELD, G.R., McNEIL, M., and BRENNAN, P.J. 1990.
Peptidoglycan-Associated Polypeptides of *Mycobacterium tuberculosis*.
J. Bacteriol., **172** : 1005-1013.

HORROCKS, W.H. 1905.
Preliminary note on goats as a means of propagation of mediterranean fever.
In "Reports Med Fever Commission" Part III. Harrison and Sons, St Martins Lowe, London : 84-90.

HUBBARD, C.L., GHERARDINI, F.C., BASSFORD, P.J., JR., and STAMM, L.V. 1991.
Molecular Cloning and Characterization of a 35.5-Kilodalton Lipoprotein of *Treponema pallidum.*
Infect. Immun., **59** : 1521-1528.

HUSSAIN, M., ICHIHARA, S., and MIZUSHIMA, S. 1980.
Accumulation of Glyceride-containing Precursor of the Outer Membrane Lipoprotein in the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli* Treated with Globomycin.
J. Biol. Chem., **255** : 3707-3712.

ICHIHARA, S., HUSSAIN, M., and MIZUSHIMA, S. 1981.
Characterization of New Membrane Lipoproteins and Their Precursors of *Escherichia coli.*
J. Biol. Chem., **256** : 3125-3129.

INNIS, M.A., MYAMBO, K.B., GELFAND, D.H., and BROW, M.A.D. 1988.
DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**: 9436-9440.

INOUYE, S., VLASUK, G.P., HSIUNG, H., and INOUYE, M. 1984.
Effects of Mutations at Glycine Residues in the Hydrophobic Region the *Escherichia coli* Prolipoprotein Signal Peptide on the Secretion across the membrane.
J. Biol. Chem., **259** : 3729-3733.

INUKAI, M., TAKEUCHI, M., SHIMIZU, K., and ARAI, M. 1978.
Mechanism of Action of Globomycin.
The Journal of Antibiotics, **31**: 1203-1205.

JANSON, H., HEDEN, L.O., and FORSGREN, A. 1992.
Protein D, the Immunoglobulin D-Binding Protein of *Haemophilus influenzae*, Is a Lipoprotein.
Infect. Immun., **60**: 1336-1342.

KYTE, J., and DOOLITTLE, R.F. 1982.
A Simple Method for Displaying the Hydropathic Character of a Protein.
J. Mol. Biol., **157** : 105-132.

KRIEG, N.R., and HOLT, J.G. 1984.
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. I.
Williams & Wilkins Ed. Baltimore, USA.

LAI, J-S., SARVAS, M., BRAMMAR, W.J., NEUGEBAUER, K., and WU, H.C. 1981.
Bacillus licheniformis penicillinase synthesized in *Escherichia coli* contain covalently linked fatty acid and glyceride.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **78** : 3506-3510.

LATIMER, E., SIMMERS, J., SRIRANGANATHAN, N., ROOP II, R.M., SCHURIG, G.G., and BOYLE, S.M. 1992.
Brucella abortus deficient in copper/zinc superoxide dismutase is virulent in BALB/c mice.
Microbial Pathogenesis, **12**: 105-113.

LEWIN, B. 1983.
Gene III.
Wiley J. & Sons, Inc. New-York.

LIMET, J.N., VO, T.K.O., SAEGERMAN, C., and LETESSON, J.J. 1991.
La recherche en Brucellose entreprise par le CEB.
Les élevages belges, **6** : 17-23.

LIMET, J.N., VO,T.K-O, SAEGERMAN, C., DE WAELE, L., TIBOR, A., CLOECKAERT, A., de WERGIFOSSE, P., TRUNDE, J-M., ZYGMUNT, M., LETESSON, J-J., and DUBRAY, G. 1991.
Prevention of Brucellosis in the Mediterranean Countries .
Proceedings of the International Seminar Valletta, Malta, 28-30 october 1991.

LIN, J.J.C., KANAZAWA, H., OZOLS, J., and WU, H.C. 1978.
An *Escherichia coli* mutant with an amino acid alteration within the signal sequence of outer membrane prolipoprotein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **7 5** : 4891-4895.

LUDWIG, B., SCHMID, A., MARRE, R., and HACKER, J. 1991.
Cloning, Genetic Analysis, and Nucleotide Sequence of a Determinant Coding for a 19-Kilodalton Peptidoglycan-Associated Protein (Ppl) of *Legionella pneumophila.*
Infect. Immun., **5 9** : 2515-2521.

LUGTENBERG, B., and VAN ALPHEN, L. 1983.
Molecular Architecture and Functioning of the Outer Membrane of *Escherichia coli* and other Gram-Negative Bacteria.
Bioch. Biophys. Acta, **7 3 7** : 51-115.

MAC MILLAN, A. 1990.
Conventional Serological Tests.
In "Animal Brucellosis"; Nielsen, K., and Duncan, J.R. 1990; CRC Press: 153-197.

MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., and SAMBROOK, J. 1989.
Molecular cloning, a laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd Ed.

MARGOLIS, N., and ROSA, P.A. 1993.
Regulation of Expression of Major Outer Surface Proteins in*Borrelia burgdorferi.*
Infect. Immun., **6 1** : 2207-2210.

MARSTON, J.A. 1861.
Report on fever (Malta).
Great Britain Army Med Dept Rep., **3** : 486.

MARTIN, N.L., and HANCOCK, R.E.W. 1990.
Function and Structure of the Major Components of the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria.
In "Advances in Brucellosis Research"; Adams, L.G. 1990; Texas A & M University Press: 77-88.

MEYER, M.E. 1990.
Current concepts in the taxonomy of the genus *Brucella.*
In "Animal Brucellosis"; Nielsen, K., and Duncan, J.R.1990; CRC Press: 2-13.

MICHAUX, S., PAILLISSON, J., CARLES-NURIT, M.J., ALLARDET-SERVENT, A., and RAMUZ, M. 1993.
Presence of Two Independent Chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M Genome.
J. Bacteriol., **1 7 5**: 701-705.

MIMS, C.A. 1987.
The Pathogenesis of Infectious Diseases.
3rd edition, Academic Press, London.

MIZUNO, T., KAGIYAMA, R., and KAGEYAMA, M. 1982.
The Peptidoglycan-Associated Lipoprotein (PAL) of the *Proteus mirabilis* Outer Membrane: Characterization of the Peptidoglycan-Associated Region of PAL.
J. Biochem., **91** : 19-24.

MIZUNO, T. 1981.
A Novel Peptidoglycan-Associated Lipoprotein (PAL) Found in the Outer Membrane of *Proteus mirabilis* and Other Gram-Negative Bacteria.
J. Biochem., **89** : 1039-1049.

MORENO, E., STACKEBRANDT, E., BORSCH, M., WOLTERS, J., BUSCH, M., and MAYER, H. 1990.
Brucella abortus 16S rRNA and Lipid A Reveal a Phylogenetic Relationship with Members of the Alpha-2 Subdivision of the Class *Proteobacteria*.
J. Bacteriol., **172** : 3569-3576.

MURPHY, T.F., NELSON, M.B., DUDAS, K.C., MYLOTTE, J.M., and APICELLA, M.A. 1985.
Identification of a Specific Epitope of *Haemophilus influenzae* on a 16,000-Dalton Outer Membrane Protein.
The Journal of Infectious Diseases, **152** : 1300-1307.

NAIR, J., ROUSE, D.A., and MORRIS, S.L. 1993.
Nucleotide Sequence Analysis and Serologic Characterization of a 27-Kilodalton *Mycobacterium intracellulare* Lipoprotein.
Infect. Immun., **61** : 1074-1081.

NICOLETTI, P. 1990.
Vaccination.
In "Animal Brucellosis"; Nielsen, K., and Duncan, J.R. 1990; CRC Press: 283-296.

NIELSEN, J.B.K., and LAMPEN, J.O. 1982.
Glyceride-Cysteine Lipoproteins and Secretion by Gram-Positive Bacteria.
J. Bacteriol., **152** : 315-322.

NIELSEN, J.B.K., CAULFIELD, M.P., and LAMPEN, J.O. 1981.
Lipoprotein nature of *Bacillus licheniformis* membrane penicillinase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **78** : 3511-3515.

NIELSEN, K., and DUNCAN, J.R. 1990.
Animal Brucellosis.
CRC Press.

O'HARA, M.J., COLLINS, D.M., and DE LISLE, G.W. 1985.
Restriction Endonuclease Analysis of *Brucella ovis* and other *Brucella* species.
Veterinary Microbiology, **10** : 425-429.

O'LEARY, W.M. 1989.
Practical Handbook of Microbiology,
CRC Press.

OLSON, E.N., TOWLER, D.A., and GLASER, L. 1985.
Specificity of Fatty Acid Acylation of Cellular Proteins.
J. Biol. Chem., **260** : 3784-3790.

PERRY, M.B., and BUNDLE, D.R. 1990.
Lipopolysaccharide Antigens and Carbohydrates of *Brucella*.
In "Advances in Brucellosis Research"; Adams, L.G. 1990; Texas A & M University Press.

PUGSLEY, A.P. 1993.
The Complete General Secretory Pathway in Gram-Negative Bacteria.
Microbiol. Reviews, **5 7**: 50-108.

PURCELL, B.K., CHAMBERLAIN, N.R., GOLDBER, M.S., ANDREWS, L.P., ROBINSON, E.J., NORGARD, M.V., and RADOLF, J.D. 1989.
Molecular Cloning and Characterization of the 15-Kilodalton Major Immunogen of *Treponema pallidum.*
Infect. Immun., **5 7** : 3708-3714.

RAWN, J.D. 1990.
Traité de Biochimie.
De Boeck Université.

ROSENGARTEN, R., THEISS, P.M., YOGEV, D., and WISE, K.S. 1993.
Antigenic Variation in *Mycoplasma hyorhinis*: Increased Repertoire of Variable Lipoproteins Expanding Surface Diversity and Structural Complexity.
Infect. Immun., **6 1** : 2224-2228.

SAEGERMAN, C., DEWAELE, L., GILSON, D., BASTIN, A., VO, T.K.O., and LIMET, J.N. 1991.
Amélioration du diagnostic de la brucellose bovine: amélioration des tests ELISA, évaluation de l'intradermoréaction du brucellergène de Rhône-Mérieux, vérification sur génisses gestantes du pouvoir protecteur de fractions SDS-I de *Brucella* et de sa compatibilité avec l'intradermoréaction utilisant le brucellergène.
Convention I.R.S.I.A. 5387A.

SAHA, A.K., MUKHOPADHYAY, N.K., DOWLING, J.N., FICHT, T.A., ADAMS, L.G., and GLEW, R.H. 1990.
Characterization of a Phosphomonoestérase from *Brucella abortus.*
Infect. Immun., **58**: 1153-1158.

SALATA, R.A., and RAVDIN, J.I. 1985.
Brucella Species (Brucellosis).
In "Principles and Practice of Infectious Diseases" (second ed.), Mandell, G.L., Douglas, R.G., and Bennett, J.E.
Churchill Livingstone, 1283-1290.

SCHOENAERS, F., et KAECKENBEECK, A. 1972.
Maladies infectieuses des animaux domestiques.
Editions Derouaux, Liège.

SJOSTEDT, A., SANDSTROM, G., and TARNVIK, A. 1992.
Humoral and Cell-Mediated Immunity in Mice to a 17-Kilodalton Lipoproteins of *Francisella tularensis* Expressed by *Salmonella typhimurium.*
Infect. Immun., **60** : 2855-2862.

SJOSTEDT, A., TARNVIK, A., and SANDSTROM, G. 1991.
The T-Cell-Stimulating 17-Kilodalton Protein of *Francisella tularensis* LVS Is a Lipoprotein.
Infect. Immun., **5 9** : 3163-3168.

SJOSTEDT, A., SANDSTROM, G., TARNVIK, A., and JAURIN, B. 1990.
Nucleotide Sequence and T Cell Epitopes of a Membrane Protein of *Francisella tularensis.*
J. of Immunol., **1 4 5** : 311-317.

SMITH III, R. 1990.
T Lymphocyte-Mediated Mechanisms of Acquired Protective Immunity Against Brucellosis in Cattle.
In "Advances in Brucellosis Research"; Adams, L.G. 1990; Texas A & M University Press.

SMITH, L.D., and FICHT, T.A. 1990.
Pathogenesis of *Brucella*.
Critical Reviews in Microbiology, vol.**1 7**, issue 3: 209-226.

SMITH, W.P., TAI, P.C., and DAVIS, B.D. 1981.
Bacillus licheniformis penicillinase: Cleavages and attachment of lipid during cotranslational secretion.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **7 8** : 3501-3505.

SONNTAG, I., SCHWARZ, H., HIROTA, Y., and HENNING, V. 1978.
Cell Envelope and Shape of *Escherichia coli*: Multiple Mutants Missing the Outer Membrane Lipoproteins and Other Major Outer Membrane Proteins.
J. Bacteriol., **1 3 6** : 280-285.

SOWA, B.A. 1990.
Membrane Proteins of *Brucella spp.*
In "Advances in Brucellosis Research"; Adams, L.G. 1990; Texas A & M University Press.

SOWA, B.A., KELLY, K.A., FICHT, T.A., FREY, M., and ADAMS, L.G. 1991.
SDS-soluble and peptidoglycan-bound proteins in the outer membrane-peptidoglycan complex of *Brucella abortus.*
Vet. Microbiol., **2 7** : 351-369.

SRIRANGANATHAN, N., BOYLE, S.M., SCHURIG, G., and MISRA, H. 1991.
Superoxide dismutase of virulent and avirulent strains of *Brucella abortus.*
Veterinary Microbiology, **2 6**: 359-366.

STABEL, T.J., MAYFIELD, J.E., MORFITT, D.C., and WANNEMUEHLER, M.J. 1993.
Oral Immunization of Mice and Swine with an Attenuated *Salmonella cholerasuis* [*Δcya*-12 Δ(*crp-cdt)19*] Mutant Containing a Recombinant Plasmid.
Infect. Immun., **6 1**: 610-618.

SUNG, C.Y., GENNITY, J.M., POLLITT, N.S., and INOUYE, M. 1992.
A Positive Residue in the Hydrophobic Core of the *Escherichia coli* Lipoprotein Signal Peptide Suppresses the Secretion Defect Caused by an Acidic Amino Terminus.
J. Biol. Chem., **2 6 7** : 997-1000.

SUTCLIFFE, I.C., TAO, L., FERRETTI, J.J., and RUSSELL, R.R.B. 1993.
MsmE, a Lipoprotein Involved in Sugar Transport in *Streptococcus mutans.*
J. Bacteriol., **1 7 5** : 1853-1855.

SUZUKI et al. 1989.
An introduction to genetic analysis.
4th Ed. W.H. Freeman and Company.

TANFORD, C., and REYNOLDS, J.A. 1976.
Characterization of Membrane Proteins in Detergent Solutions.
Bioch. Biophys. Acta, **4 5 7** : 133-170.

TATUM, F.M., DETILLEUX, P.G., SACKS, J.M., and HALLING, S.M. 1992.
Construction of Cu-Zn Superoxide Dismutase Deletion Mutants of *Brucella abortus*: Analysis of Survival *In Vitro* in Epithelial and Phagocytic Cells and *In Vivo* in Mice.
Infect. Immun., **6 0**: 2863-2869.

THEISEN, M., RIOUX, C.R., and POTTER, A.A. 1993.
Molecular Cloning, Nucleotide Sequence, and Characterization of *IppB*, Encoding an Antigenic 40-Kilodalton Lipoprotein of *Haemophilus somnus.*
Infect. Immun., **6 1** : 1793-1798.

THEISEN, M., RIOUX, C.R., and POTTER, A.A. 1992.
Molecular Cloning, Nucleotide Sequence, and Characterization of a 40,000-Molecular-Weight Lipoprotein of *Haemophilus influenzae*.
Infect. Immun., **60** : 826-831.

THIRKELL, D., MYLES, A.D., and RUSSELL, W.C. 1991.
Palmitoylated Proteins in *Ureaplasma urealyticum*.
Infect. Immun., **59** : 781-784.

THOMAS, W., and SELLWOOD, R. 1993.
Molecular Cloning, Expression, and DNA Sequence Analysis of the Gene That Encodes the 16-Kilodalton Outer Membrane Lipoprotein of *Serpulina hyodysenteriae*.
Infect. Immun., **61** : 1136-1140.

TOKUNAGA, M., LORANGER, J.M., and WU, H.C. 1984.
Prolipoprotein Modification and Processing Enzyme in *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem., **259** : 3825-3830.

TOKUNAGA, H., and WU, H.C. 1984.
Studies on the Modification and Processing of Prolipoprotein in *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem., **259** : 6098-6104.

TOWBIN, H., STAEHELIN, T., and GORDON, J. 1979.
Electrophoretic transfert of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **76** : 4350-4354.

VERGER, J.M., GRIMONT, F., GRIMONT, P.A.D., and GRAYON, M. 1987.
Taxonomy of the Genus *Brucella*.
Ann. Inst. Pasteur/Microbiol., **138** : 235-238.

VERGER, J.M., GRIMONT, F., GRIMONT, P.A.D., ang GRAYON, M. 1985.
Brucella, a Monospecific Genus as Shown by Deoxyribonucleic Acid Hybridization.
International Journal of Systematic Bacteriology, **35** : 292-295.

WEBER, K., and OSBORN, M. 1969.
The Reliability of Molecular Weight Determination by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis.
J. Biol. Chem., **244** : 4406-4412.

WEIGEL, L.M., BRANDT, M.E., and NORGARD, M.V. 1992.
Analysis of the N-Terminal Region of the 47-Kilodalton Integral Membrane Lipoprotein of *Treponema pallidum*.
Infect. Immun., **60** : 1568-1576.

WEINBERG, G.A., TOWLER, D.A., and MUNSON, R.S. 1988.
Lipoproteins of *Haemophilus influenzae* Type b.
J. Bacteriol., **170** : 4161-4164.

World Health Organization/ WHO. 1993.
Who plans renewed attack on animal disease that threatens millions of people.
Press Release WHO/68.

World Health Organization. 1964. Joint FAO/WHO.
Expert Committee on Brucellosis.
4th Report. Tech. Rep. Ser. Wld. Hlth Org. N. 289.

WU, H.C., and TOKUNAGA, M. 1986.
Biogenesis of Lipoproteins in Bacteria.
Current Topics in Microbiology and Immunology, **125** : 127-157.

YOUNG, D.B., and GARBE, T.R. 1991.
Lipoproteins antigens of *Mycobacterium tuberculosis*.
Insitut Pasteur/Elsevier, **1 4 2** : 55-65.

YU, F., INOUYE, S., and INOUYE, M. 1986.
Lipoprotein-28, a Cytoplasmic Membrane Lipoprotein from *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem., **2 6 1** : 2284-2288.

ANNEXES

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : les formes de brucellose humaine I

Annexe 2 : les brucelloses animales II

Annexe 3 : antibiotiques utilisés dans le traitement de la brucellose humaine et protocole préconisé III

Annexe 4 : les tests bactériologiques utilisés V

Annexe 5 : les tests sérologiques VI

Annexe 6 : le test allergique VIII

Annexe 7 : approches vaccinales envisagées IX

Annexe 8 : comparaison des bactéries Gram-négatives et Gram-positives X

Annexe 9 : construction d'une banque génomique dans λgt11 XI

Annexe 10 : criblage immunologique d'une banque XII

Annexe 1 : les formes de brucellose humaine.

1. Les formes inapparentes

Elles méritent d'être individualisées en premier lieu, car elles sont sans doute très fréquentes, notamment avec *B. abortus*. L'infection est inapparente ou méconnue. Le diagnostic de ces infections repose sur la mise en évidence d'anticorps sériques spécifiques. Une sérologie positive isolée est ainsi décrite chez 30 à 50 % des personnes exerçant certaines professions à haut risque d'infection brucellique.

2. Les formes septicémiques

Après la pénétration et la multiplication ganglionnaire, les *Brucella* se dispersent par voie sanguine. Après une incubation de deux à trois semaines, le début de la maladie est souvent insidieux et se marque par des symptômes peu évocateurs : fièvre d'intensité variable, sueurs, asthénie, amaigrissement, douleurs musculaires, articulaires, névralgiques. L'espèce en cause est presque toujours *B. melitensis*. L'examen clinique est souvent pauvre, mais on peut retrouver des adénopathies, une splénomégalie et, plus rarement, une hépatomégalie, voire dès ce stade, un foyer métastasique .

3. Les formes localisées

La plupart de ces formes sont liées à de véritables métastases septicémiques lors de la dispersion sanguine des *Brucella*. Elles touchent pratiquement tous les organes. Les atteintes les plus fréquentes sont ostéoarticulaires (20 % des cas), surtout au niveau lombaire, où elles débutent par l'atteinte d'un disque puis s'étendent aux vertèbres adjacentes. Les atteintes uro-génitales sont fréquentes, mais souvent méconnues: épididimyte, orchites, prostatite, localisations rénales; sans oublier les autres localisations brucelliques, qui peuvent être pulmonaires, hépatiques, spléniques et cutanées.

4. Les formes à rechute ou à évolution prolongée

Dans un nombre considérable de cas, les manifestations brucelliques persistent plusieurs mois voire plus d'un an, qu'il s'agisse de signes généraux (fièvre) ou d'une atteinte locale. De plus, chez des sujets particulièrement exposés, des réinfections peuvent survenir, difficiles à distinguer de véritables rechutes d'origine endogène.

5. La brucellose chronique

Elle peut survenir chez des patients qui ont présenté cette maladie, surtout si l'évolution de la maladie a été longue et ils continuent à se plaindre de manifestations non spécifiques: céphalées, asthénie, malaises, troubles visuels; mais on doit souvent mettre en cause l'évolution lente de la maladie, qui influe sur le psychisme des malades. Plus rarement, on considère qu'il peut s'agir de signes liés à une sensibilisation contre certains antigènes brucelliens; ainsi, cette pathologie peut alors être considérée comme une véritable allergie, due à la présence d'IgE spécifiques anti-*Brucella*.

Annexe 2 : les brucelloses animales

1. La brucellose porcine

Elle s'observe dans divers pays européens, mais elle est plus répandue dans les centres d'élevage aux Etats-Unis. Elle est causée par *B. suis*, même si des cas dus à *B. melitensis* voire *B. abortus* ont été signalés. La contamination se produit par l'urine, le sperme, les sécrétions vaginales, les enveloppes et les lochies; peut-être aussi par la peau.
Les manifestations cliniques sont très variables: atteintes des ganglions, des os, des articulations; avec dans certains cas une paralysie, quand la möelle osseuse est atteinte. Chez la femelle, on note l'avortement, la mise bas de porcelets chétifs ou non viables, la stérilité. Chez le mâle, le système génital est atteint dans une plus grande proportion des cas avec des inflammations locales (orchites, épididimytes) et une stérilité marquée .

2. Les brucelloses caprine et ovine

B. melitensis est la souche principalement mise en cause dans cette affection. La contamination est surtout indirecte (aliments, boissons), parfois aussi directe (accouplements, mise bas). Dans cette maladie, les lésions sont: splénomégalie, congestion hépatique et tuméfaction des ganglions lymphatiques. Chez les ovins, *B. ovis* est souvent responsable de l'infection et ce germe a une plus grande affinité pour le tractus génital mâle. Epididimyte et stérilité sont les conséquences les plus fréquentes et les plus graves de l'infection par ce germe .

3. La brucellose canine

Le chien est réceptif à *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* et *B. canis*, ce qui se traduit par des avortements et des inflammations (orchites et épididimytes avec foyers purulents). Dans presque tous les cas, l'infection canine a pour origine l'ingestion de matières provenant d'animaux domestiques ou sauvages infectés. Pour *B. canis*, la transmission a lieu principalement par l'intermédiaire de tissus placentaires et des pertes vaginales suivant un avortement.

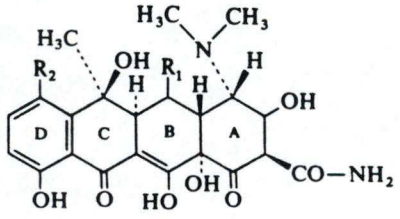
4. La brucellose des autres animaux

De nombreux autres animaux peuvent être infectés, nous pouvons citer les équidés, les rongeurs, le gros gibier (cerf, buffle, renne, bison,...), les gallinacés.

Annexe 3 : antibiotiques utilisés dans le traitement de la brucellose humaine et protocole préconisé

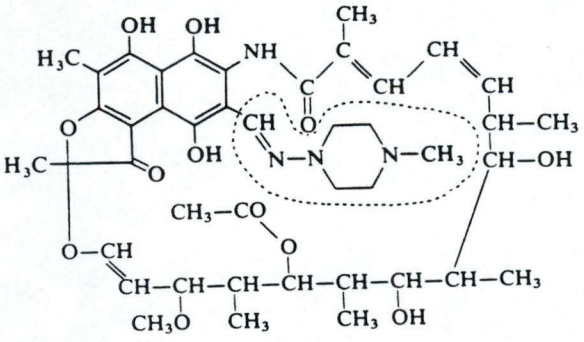
A. Structure et caractéristiques de ces antibiotiques

- Les tétracyclines inhibent l'élongation des chaînes polypeptidiques en se fixant à la sous-unité 30 S du ribosome.

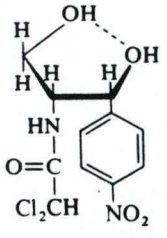


Tetracycline $R_1 = R_2 = H$

- Les rifamycines empêchent l'initiation de la synthèse de l'ARN en bloquant l'ARN polymérase; il n'y a donc plus transcription de l'information fournie par l'ADN.

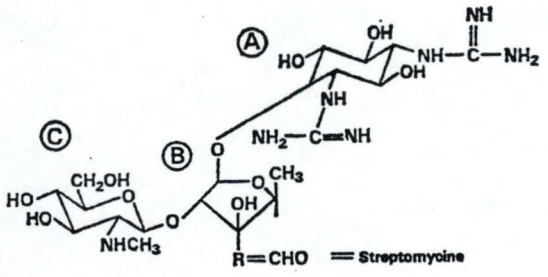


- Le chloramphénicol se fixe de façon spécifique à la sous-unité 50 S du ribosome bactérien. On sait qu'il inhibe une polymérase responsable de la formation de liaisons peptidiques de la chaîne en formation et portée par le site P (peptidyl) ou donneur du ribosome bactérien.



Chloramphenicol

- La streptomycine se fixe à la sous-unité 30 S du ribosome et la déforme. Il y a alors erreur dans la lecture de certains codons de l'ARN messager lors de la traduction, conduisant à la synthèse d'une protéine anormale. Cette erreur est généralement mortelle pour la bactérie.



B. Protocole préconisé en cas de diagnostic de la maladie (d'après Mr. Smet du laboratoire de biologie clinique de la Clinique Reine Fabiola à Auvelais, 1993)

- Doxycicline : 0.2-0.3 gr en 2 prises pendant 6 semaines associé à:
- Rifampicine : 900 mg/24h pendant 6 semaines.
- si mal supporté : à remplacer par le Bactrim à dose usuelle, mais moins efficace.

Annexe 4 : Les tests bactériologiques utilisés. (Alton et al.,1988).

Ils demandent l'isolement de *Brucella* au niveau des sites susceptibles d'être touchés par l'infection chez l'hôte (sang, ganglions lymphatiques, rate,...) et la mise en culture sur des milieux sélectifs.

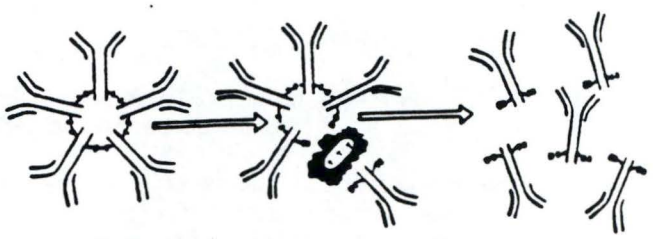
L'identification du genre *Brucella* repose sur les épreuves et caractéristiques suivantes:
- état frais et coloration de Gram;
- morphologie des colonies et caractéristiques de croissance;
- oxydase et catalase;
- agglutination par un sérum total anti-*Brucella*.

Ces cultures sont très lentes (6 à 8 semaines) et présentent des risques non négligeables de contamination pour le personnel de laboratoire. Cependant, leurs grands avantages sont :
- la certitude que la maladie est bien due à *Brucella*.
- la possibilité de pouvoir typer les souches responsables de la maladie, ce qui est important, notamment au niveau épidémiologique.

Ils ne répondent pas au besoin rapide de certitude en cas de suspicion de contamination d'un élevage par *Brucella* , afin de prendre les mesures qui s'imposent.

Rôle du DTT et cinétique de production des anticorps.
(Limet et al - CEB, 1991)

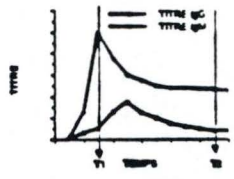
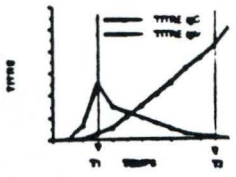
1) Action du DTT sur les IgM :



IgM pentamérique
AGGLUTINANTE

IgM monomérique
NON AGGLUTINANTE

2. Cinétique de production des anticorps :

ANIMAL VACCINE			ANIMAL INFECTE		
					
AGGLUTINATION			AGGLUTINATION		
Exemple	SERUM NON TRAITE	SERUM TRAITE AU DTT	Exemple	SERUM NON TRAITE	SERUM TRAITE AU DTT
AU TEMPS = T1	100	25	AU TEMPS = T1	50	25
AU TEMPS = T2	50	12,5	AU TEMPS = T2	⩾ 400	⩾ 400

3. Conclusions :

- La différenciation entre animaux vaccinés et animaux infectés est possible par la comparaison entre l'agglutination normale et l'agglutination après traitement au DTT des IgM en présence du facteur rhumatoïde (voir analyses au temps T2);
- Cette différenciation devient difficile dans le cas d'infection débutante (voir analyses au temps T1), mais la *répétition des examens sanguins* permet néanmoins de contourner cet obstacle.

Annexe 5 : Les tests sérologiques. (Christie,1980; Salata et al.,1989; Alton et al., 1988; Mac Millan, 1990)

Les tests sérologiques se basent sur la mise en évidence d'anticorps spécifiques dans le sérum ou le lait. Ils sont dirigés contre le lipopolysaccharide (LPS) de *Brucella*, reconnu comme l'antigène dominant. Malheureusement, ces tests sont limités au niveau de la sensibilité et de la spécificité, c'est-à-dire respectivement, le pourcentage d'animaux positifs dans les tests pour une population d'animaux infectés et le pourcentage d'animaux négatifs pour une population indemne de brucellose.
Ces limites de spécificité des tests classiques s'expliquent par la présence d'anticorps IgM, relativement bien détectés, mais qui sont généralement moins spécifiques. Lorsqu'un animal est infecté par une bactérie dont la chaîne O du LPS-S présente certains épitopes similaires à celui de *Brucella*, son sérum peut induire une réaction sérologique faussement positive (réaction croisée) lors de ces tests. C'est le cas lors d'infections par *Salmonella urbana O:30*, *Escherichia coli O:116*, *Pseudomonas maltophila*, *Yersinia enterocolitica O:9* (Chart et al.,1992), *Vibrio cholerae* (maladie et vaccination).

De même, dans la séroagglutination de Wright, des faux négatifs ont été décelés, à cause de la présence d'anticorps bloquants (ce sont des anticorps non agglutinants de classe IgA ou IgG, qui sont associés dans la réaction sérologique *in vitro)*.

Enfin, il faut noter la grande difficulté de distinguer des animaux vaccinés d'animaux malades. En effet, les anticorps persistant après la vaccination sont responsables de la positivité du test de diagnostic sérologique. Une demi-solution est apportée par le test d'agglutination du sérum en présence de dithiotréitol (DTT), qui permet de distinguer une réaction post-vaccinale d'une réaction infectieuse; mais la différenciation n'est pas bonne en cas d'infection débutante **(figure)** (Limet et al.,1991).

Ainsi, aujourd'hui, plusieurs tests ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ont été développés. Le premier est un test ELISA indirect. L'antigène LPS-S est adsorbé sur la surface des puits de microplaques. Le sérum ou lait à tester est ajouté et les anticorps éventuellement présents peuvent se fixer sur l'antigène. La fixation des anticorps est révélée par une anti-immunoglobuline bovine couplé à une enzyme (peroxydase) qui catalyse la formation d'un produit coloré. L'absorbance de ce composé (à la longueur d'onde adéquate) est alors mesurée (Alton et al.,1988).
Cependant, ce test présente certaines limites. Sa spécificité semble réduite par deux types de réactions non spécifiques : les premières sont d'origine inconnue et semblent variables d'un lot de LPS-S à l'autre; les secondes sont liées aux réactions croisées avec *Yersinia enterocolitica O:9*. De plus, il permet de détecter les IgG_1 ou IgG_2 présentes dans les sérums à tester, or ces dernières n'apparaissent que plus tardivement lors de la réponse infectieuse (Saegerman et al.,1991).
Il serait intéressant de détecter les IgM, plus précoces lors de la réponse immunitaire, mais le volume important et l'affinité moins grande de ces Ig rendent cette détection difficile.
Le second test développé est un ELISA de compétition où les puits des microplaques sont coatés avec du LPS-S. Ensuite, le sérum bovin à tester est ajouté conjointement à des anticorps monoclonaux anti-LPS-S, couplés à la peroxydase. Ainsi, les Ac Mo entrent en compétition avec les anticorps du sérum pour la fixation au LPS-S et si le sérum comprend beaucoup d'anticorps, la réponse colorée est inhibée; on peut alors considérer l'animal comme positif. Le principal avantage de ce test est la rapidité. En utilisant des anticorps dirigés contre un épitope spécifique de*Brucella*, on devrait en théorie éviter les réactions croisées avec d'autres espèces bactériennes. Cependant, il semble que des anticorps sériques reconnaissant des épitopes du LPS voisins d'épitopes spécifiques provoquent également une inhibition de la fixation de l'AC Mo (sans doute par encombrement stérique).

Le nombre important de tests sérologiques développés ces dernières années montre bien qu'aucun test à lui seul ne permet de détecter à la fois les animaux récemment infectés et les porteurs latents ou chroniques.

1. Le test au Rose Bengale

Il consiste en une agglutination d'anticorps du sérum, IgG_1 et IgM, avec des bactéries *B.abortus* tuées et colorées au Rose Bengale, à pH acide (3,65). C'est un test très performant, mais sensible à la vaccination.

2. La séroagglutination de Wright

Les *Brucella* sont agglutinées par les anticorps (IgM et IgG_2), présents dans le sérum des individus suspects. Ce test présente de nombreux défauts de sensibilité et de spécificité; chez les animaux infectés, il donne de nombreux résultats négatifs par excès.

3. La réaction de fixation du complément

Ce test est considéré depuis longtemps comme le test de référence en matière de brucellose. Le sérum est incubé avec l'antigène (*B. abortus*) et une source de complément à haute activité hémolytique. La réaction est révélée par l'addition d'un système antigène-anticorps (globules rouges de mouton, anticorps anti-globules rouges de mouton). En absence d'anticorps dans le sérum, le complément resté libre, va se fixer sur les globules rouges de mouton, recouverts d'anticorps anti-globules rouges de mouton et les lyse. Ce test très sensible est aussi très spécifique, il est notamment beaucoup moins sensible aux séquelles vaccinales et aux réactions croisées.

4. Le test de Coombs

Il permet de détecter des anticorps incomplets, c'est-à-dire des anticorps incapables d'agglutiner bien que capables de se fixer à l'antigène. Une antiglobuline provoque une agglutination visible des complexes, formés par les anticorps sériques (IgG_1, IgG_2 ou IgM) complexés à *B. abortus*.

5. Immunofluorescence

Des *Brucella* sont étalées et fixées à l'alcool éthylique sur des lames de microscope. Les anticorps du sérum viennent se fixer sur les bactéries et la révélation se déroule grâce à un anticorps anti-Ig, marqué à la fluorescéine.

6. ELISA indirect

L'antigène LPS-S est adsorbé au fond des puits de microplaques. Le sérum ou le lait à tester est ajouté et les anticorps éventuels se fixent sur l'antigène. La révélation se fait par une anti-Ig couplée à une enzyme, comme la peroxydase qui catalysera la réaction du substrat en un composé coloré.

7. Test de l'anneau sur le lait (ring-test)

Une goutte de suspension de *Brucella* colorée est ajoutée à 1 ml de lait. Le lait contenant des anticorps anti-*Brucella* présente un anneau de crème coloré, alors que le lait n'en contenant pas est uniformément coloré. Cette épreuve peut être réalisée sur le lait individuel ou sur le lait de mélange de l'ensemble des vaches en production d'une exploitation. C'est le test de dépistage le plus pratique et le plus économique.

Annexe 6 : test allergique

Le test cutané met en évidence une réation d'hypersensibilité retardée, appelée intradermo-réaction. Il consiste en une injection intradermique de brucellergène (allergène commercialisé par Rhône-Mérieux), composé de protéines solubles, semi-purifiées à partir de *Brucella* en phase R et dépourvu de LPS-S (théoriquement, car la souche de *B. melitensis* B115, utilisée pour la production du brucellergène comprend du LPS-S dans le cytoplasme). Cette réaction cutanée se marque par une rougeur et une induration de la peau au site de l'injection, avec un maximum après 72 heures. Cette épreuve présente certains avantages :

- une bonne spécificité,
- une détection précoce des infections récentes et des infections chroniques,
- une réaction visible sur le bétail, convaincante pour le fermier.

Mais, certains inconvénients sont à signaler :

- le délai de reproduction du test est assez long (3-4 semaines),
- un retour sur le terrain pour la lecture du test 3 jours après l'injection,
- une réponse faible par rapport au test tuberculine,
- la mauvaise reproductibilité du test car :
  - * variations d'un animal à l'autre,
  - * différences de sensibilité pour un même animal selon le stade de la maladie,
  - * variabilité de composition d'un lot de brucellergène à l'autre.

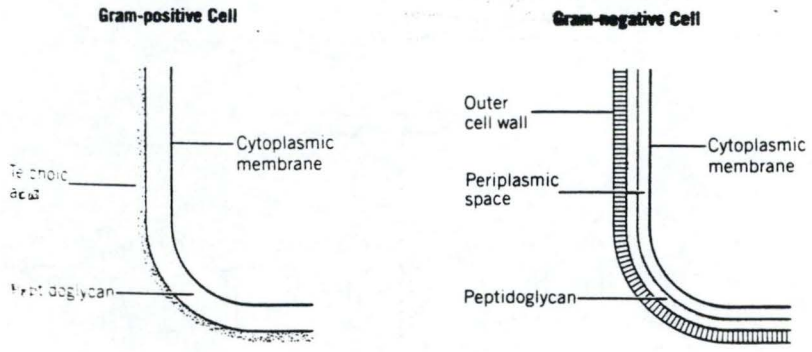
Annexe 7 : approches vaccinales envisagées

Aujourd'hui, grâce au développement du génie génétique, la tendance est de développer des vaccins vivants manipulés qui induisent une réponse clairement différentiable de la réponse infectieuse.
D'une part, l'utilisation d'un vaccin vivant délété est particulièrement enthousiasmante. Cette approche consiste à identifier des antigènes de diagnostic qui ne sont essentiels ni à la survie des *Brucella* ni au pouvoir protecteur du vaccin ainsi qu'à déléter les gènes codant pour ces protéines dans la souche vaccinale. Les tests diagnostiques viseraient alors la détection d'anticorps ou de cellules T induits par ces antigènes présents dans les souches infectieuses uniquement. Les résultats obtenus par l'équipe américaine de Halling ne font que conforter cette voie. Ils ont cloné le gène codant pour une protéine périplasmique de 31 kDa et de fonction inconnue. La délétion du gène dans la souche vaccinale B19 n'altère pas la capacité de survie intracellulaire du mutant (Halling et al., 1991); mais, il n'existe aucune donnée publiée sur la capacité protectrice de ce délétant. Une souche vaccinale délétée serait très proche du vaccin vivant actuel et ceci permettrait de limiter les mises au point des conditions de vaccination, telles que : liaison à un carrier, adjuvantation, doses et rappels, qui accompagnent le développement d'un vaccin sous-unitaire.

D'autre part, l'utilisation d'un vecteur vivant comme *Salmonella typhimurium* atténué, exprimant un antigène de *Brucella* semble aussi être une approche très intéressante. En effet, cette souche atténuée vivante se multiplie dans l'organisme et induit une réponse immunitaire contre l'antigène exprimé. De plus, un tel organisme pourrait permettre une vaccination simultanée contre différents pathogènes. Ainsi, des expériences ont été menées chez la souris et le porc avec expression d'une protéine de 31 kDa périplasmique de *Brucella* par *Salmonella typhimurium*. Ils ont observé une réponse humorale contre la protéine recombinante, mais pas de réponse cellulaire aussi bien en test de transformation lymphoblastique qu'en réaction intradermique. Chez le porc, ils ont noté qu'une injection de la protéine de 31 kDa adjuvantée entraînait une stimulation des lymphocytes T; ceci suggère que la protéine de 31 kDa possède des épitopes T et que le problème réside sans doute dans la présentation par *S. typhimurium*, qui ne peut induire une réponse cellulaire (Stabel et al., 1990; Stabel et al., 1991). D'autres essais d'immunisation ont été menés chez le porc avec une souche atténuée de *Salmonella cholerasuis* exprimant la protéine de 31 kDa de *Brucella*. Ce vecteur *Salmonella* recombinant induit chez le porc une réponse immunitaire à médiation cellulaire contre la protéine de *Brucella*. Ces résultats suggèrent qu'il s'agit d'un vecteur de choix pour l'étude de l'efficacité vaccinale chez le porc, en particulier pour des maladies comme la brucellose qui requièrent l'immunité à médiation cellulaire (Stabel et al., 1993). Mais, il faut rester très prudent devant ces résultats car ils ne présentent pas d'épreuve virulente; ainsi, on n'a aucune idée de la protection conférée par un tel système.

Annexe 8 : Comparaison des bactéries Gram-négatives et Gram-positives. (O'Leary, 1989)

Les parois cellulaires des deux groupes présentent une série de différences chimiques et structurales.



Gram- positives

- épaisseur de la paroi: 200 Å; habituellement peu structurée.
- contenu en sucres aminés élevé: 10-30 %.
- contenu en lipides assez bas: 0 à 2 % (sauf mycobactéries, nocardias)

Gram-négatives

- épaisseur de la paroi: 100 à 150 Å; structure en double membrane assez évidente.
- contenu en sucres aminés bas: 1 à 10 %.
- contenu en lipides élevé: 10 à 20 %.

Les grandes différences au niveau de la structure se reflètent dans les polymères, qui composent la paroi cellulaire.

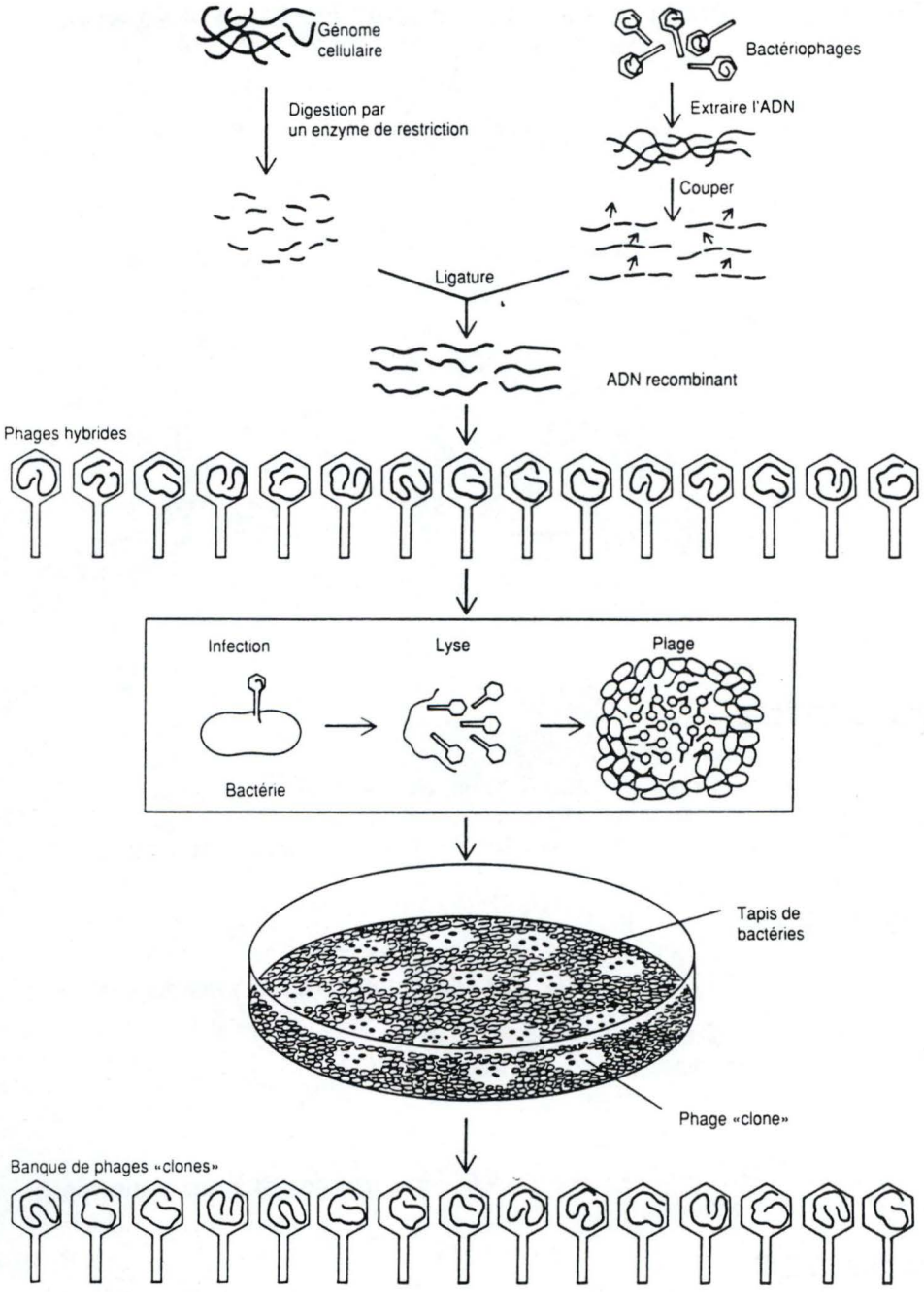
Gram-positives

- peptidoglycane (50 % ou plus)
- polysaccharides
- acides teichoiques
- acides teichuroniques
- glycolipides et mycosides (chez mycobacteria, corynebacteria et nocardias)

Gram-négatives

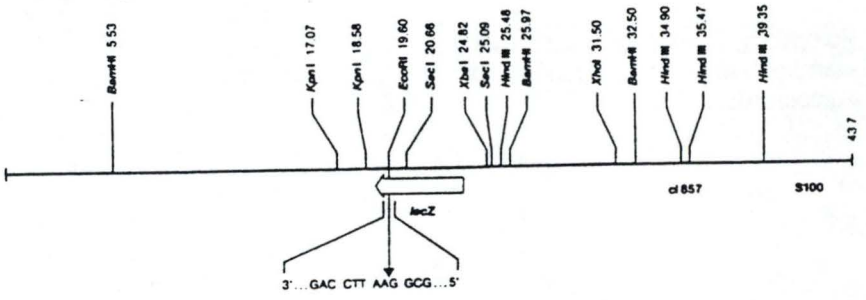
- peptidoglycane (moins de 10 %)
- complexe O antigénique (LPS)
- lipoprotéine

Construction d'une banque génomique dans le phage λ.



Représentation du phage λgt11.

La localisation des sites de restriction sur cette carte physique du phage λgt 11 est exprimée en kb à partir de l'extrémité gauche. L'orientation de *lac Z* est montrée par la flèche horizontale (Stratagène).



Annexe 9 : construction d'une banque génomique dans λgt11

La banque génomique de *B. abortus* a été construite par Philippe de Wergifosse (de Wergifosse, 1992) **(figure)**.
Elle a été réalisée à partir de l'ADN de *B.abortus* 544, lequel a été clivé partiellement par l'enzyme de restriction *Sau* 3A1 [qui reconnaît la séquence GATC et qui génère des bouts collants (courtes séquences d'ADN simple brin, capables de s'hybrider à de courtes séquences complémentaires d'autres molécules d'ADN)]. L'ADN polymérase de Klenow a permis de remplir les extrémités *Sau* 3A1 et les extrémités obtenues par clivage mécanique lors de l'extraction de l'ADN génomique. Les sites *Eco* RI internes de l'ADN de *B. abortus* 544 sont méthylés par l'*Eco* RI méthylase pour les protéger d'une future restriction par *Eco* RI.

Des séquences bicaténaires reconnues spécifiquement par l'enzyme de restriction *Eco* RI, appelées "linkers" ont été liées aux fragments de l'ADN de *B.abortus* grâce à la ligase du phage T4. Ensuite, les sites *Eco* RI des linkers ont été clivés pour libérer des bouts collants, complémentaires du site de clonage *Eco* RI du vecteur. Celui-ci est dans ce cas le bactériophage lgt11 **(figure)**, répertorié comme un vecteur d'insertion (l'intégration se faisant au niveau d'un site de restriction enzymatique) et d'expression simple (le gène inséré peut être transcrit et traduit).

Un vecteur répond aux conditions suivantes :

- contenir des séquences lui permettant de se répliquer de façon autonome dans la cellule hôte;
- posséder l'information permettant de mettre en place un système de discrimination entre les vecteurs recombinants et les vecteurs non recombinants; souvent ce sont des gènes de résistance aux antibiotiques, les vecteurs en possédant au moins deux, l'un permettant de sélectionner les bactéries ayant reçu le vecteur et l'autre, inactivé lors de l'intégration de l'ADN étranger, permettant de repérer les recombinants.
- contenir des sites de restriction uniques hors des gènes essentiels et de préférence dans les gènes de sélection.
- avoir éventuellement les éléments de contrôle (promoteurs, sites de fixation des ribosomes), permettant l'expression du gène inséré.

Les fragments d'ADN de taille comprise entre 2 et 7 kb sont liés à un excès de bras de phages lgt11, restreints par *Eco* RI et déphosphorylés (cette déphosphorylation les empêche de se réassocier, diminuant la proportion de phages non recombinants). Après la ligation, l'ADN a été encapsidé *in vitro* à l'aide des têtes et queues des phages. Ainsi, on obtient une collection de phages, dont la majorité contient un fragment d'ADN de *B.abortus* (= banque génomique de *Brucella*).

Annexe 10 : criblage immunologique d'une banque

Des bactéries *E. coli* (souche Y1090) ont été infectées par la banque de phages et étalées. Au cours de la croissance, des plages de lyse apparaissent dans le tapis bactérien. En effet, lors de la lyse, il y a libération du contenu bactérien qui se retrouve au niveau de la plage de lyse. On réplique les plages de lyse sur une feuille de nitrocellulose et on réalise un criblage de cette nitrocellulose avec des anticorps monoclonaux spécifiques de chacune des 3 OMPs mineures : anti-10, anti-16.5 et anti-19. La fixation de l'anticorps monoclonal est révélée par un anti-anticorps couplé à la phosphatase alcaline. La révélation se fait grâce aux substrats: BCIP (5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl, phosphate) et NBT (nitroblue tetrazolium) qui sont convertis par l'enzyme en un composé bleu intense (Stratagene). Cette technique permet donc de détecter la présence de ces OMPs au niveau de la plage de lyse.

