



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Construction et évaluation d'un système d'identification de gènes spécifiquement induits chez *Brucella melitensis* 16M

Danese, Isabelle

*Award date:*  
1995

*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.



52-20142 281

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

-----

**Construction et évaluation d'un système  
d'identification de gènes spécifiquement induits  
chez *Brucella melitensis* 16M**

Mémoire présenté pour l'obtention du  
grade  
de Licencié en Sciences  
biologiques  
**Isabelle DANESE**  
1995

## Construction et évaluation d'un système d'identification de gènes spécifiquement induits chez *Brucella melitensis* 16M

DANESE Isabelle

### Résumé

Très peu de facteurs de virulence ont été clairement identifiés chez *Brucella* sp. et de nombreuses questions restent posées quant à la relation de ce pathogène avec son hôte.

Dans le but futur d'identifier ces gènes impliqués dans la virulence, nous avons créé une banque de mutants transpositionnels de *B. melitensis* 16M. Cette banque a été obtenue suite à l'insertion aléatoire du transposon miniTn5cat dans le génome de *Brucella melitensis*. Ce transposon contient le gène marqueur Km (encodant la résistance à la kanamycine) et le gène reporter *cat* (encodant la résistance au chloramphénicol). Il est porté par un plasmide non répliquatif qui a été introduit par conjugaison dans *Brucella melitensis*. Le génotype de certains de ces mutants a été analysé par southern blot et a prouvé la transposition aléatoire et unique dans le génome.

Cette transposition aléatoire peut placer le gène reporter *cat* sous le contrôle d'un promoteur de *B. melitensis*. Nous avons validé la création de notre banque en identifiant des clones transpositionnels chez qui l'expression du gène *cat* est induite préférentiellement en fonction de différentes conditions d'activation *in vitro* (température, composition du milieu).

L'application de la technique de PCR inverse, nous a ensuite permis d'isoler rapidement la portion d'ADN génomique située en amont du transposon.

Les outils génétiques que nous avons développés permettront, par la suite, l'identification de gènes de virulence chez *B. melitensis*.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1995

Promoteur : J. Vandehaute

Co-promoteur : J.-J. Letesson

Merci au Professeur Jean-Jacques Letesson de m'avoir plus que tolérée au laboratoire de Microbiologie-Immunologie.

Merci, Anne!  
Merci, Philippe!

Merci à toutes ces personnes qui ont fait de ce mémoire une partie de plaisir (ou presque): Fabrice, Dominique, Vincent, Isabelle, Jean-Philippe, Karl, Daniel, Martine, Christian et Monsieur Faber.  
Véronique, Pascal et Chantal.

Merci au Professeur H. De Greeve et aux membres de son laboratoire pour m'avoir plus d'une fois conseillée.

Merci enfin à mes parents et aux *Brucella* sans qui ce mémoire ne serait pas.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>Introduction</b> .....	1
I. <i>Brucella</i> sp. bactérie pathogène.....	1
I.1. Caractéristiques générales .....	1
I.2. Caractéristiques génétiques .....	3
II. La virulence chez <i>Brucella</i> sp.....	5
II.1. Les facteurs de virulence.....	5
II.2. La pathogénie de la brucellose.....	6
II.3. Phagocytose et bactéricidie.....	7
II.4. Survie de <i>Brucella</i> sp. dans les phagocytes.....	9
II.5. Les facteurs de virulence identifiés ou étudiés chez <i>Brucella</i> sp. ....	9
III. Stratégies génétiques de recherche de gènes de virulence .....	13
<b>Matériel et Méthodes</b> .....	21
I. Souches bactériennes et plasmides.....	21
I.1. Souches bactériennes.....	21
I.2. Plasmides bactériens.....	21
II. Milieux de culture .....	23
III. Identification de <i>Brucella</i> sp. par agglutination sur lame .....	23
IV. Conjugaison.....	24
V. Techniques d'ADN recombinant.....	25
V.1. Extraction d'ADN plasmidique.....	25
V.1.1. Minipréparation d'ADN plasmidique d' <i>E.coli</i> .....	25
V.1.2. Midipréparation d'ADN plasmidique d' <i>E.coli</i> .....	26
V.1.3. Isolement d'ADN plasmidique de <i>Brucella</i> sp. ....	27
V.2. Restriction de l'ADN .....	27
V.3. Electrophorèse en gel d'agarose .....	28
V.4. Extraction d'ADN d'un gel d'agarose.....	29
V.5. Réaction de ligation.....	29
V.6. Réaction d'extension et de rognage .....	30
V.7. Transformation bactérienne .....	30
V.8. Electroporation bactérienne .....	31
V.9. Amplification d'ADN par PCR .....	32
VI. Analyse de l'ADN génomique de <i>Brucella</i> sp. par Southern blot .....	33
VI.1. Extraction de l'ADN génomique de <i>Brucella</i> sp.....	33
VI.2. Restriction de l'ADN génomique par Hind III ou Taq I.....	34
VI.3. Electrophorèse en gel d'agarose .....	34
VI.4. Transfert et immobilisation .....	34
VI.5. Marquage de la sonde et vérification .....	35
VI.6. Hybridation .....	36
VI.7. Détection et révélation .....	36
VI.8. Stripping et réhybridation de la membrane.....	37
VII. Isolement de fragments génomiques par IPCR.....	38

<b>Résultats</b> .....	39
Stratégie globale .....	39
I. Utilisation du transposon miniTn5Km lacZ1 chez <i>Brucella melitensis</i> 16M.....	40
I.1. Isolement de clones de <i>B. melitensis</i> Km <sup>R</sup> .....	40
I.2. Les clones Km <sup>R</sup> issus de la conjugaison appartiennent à l'espèce <i>B. melitensis</i> .....	41
I.3. Southern blot sur l'ADN génomique des clones Km <sup>R</sup> de <i>B. melitensis</i> .....	43
I.4. Essai de récupération du plasmide dans le génome des clones Km <sup>R</sup> Amp <sup>R</sup> de <i>B. melitensis</i> .....	44
I.5. Essai de récupération d'un plasmide réplcatif à partir des clones Km <sup>R</sup> Amp <sup>R</sup> de <i>B. melitensis</i> .....	46
II. Utilisation du plasmide pUTminiTn5Kmcats.....	47
II.1. Construction du plasmide pUTminiTn5Kmcats.....	47
II.2. Isolement de clones Km <sup>R</sup> de <i>B. melitensis</i> .....	48
II.3 Southern blot sur l'ADN génomique de clones de <i>B. melitensis</i> Km <sup>R</sup> Amp <sup>S</sup> .....	48
II.4. Création d'une banque de mutants de <i>B. melitensis</i> par transposition du miniTn5Kmcats.....	50
II.5. Analyse par southern blot de clones de <i>B. melitensis</i> Km <sup>R</sup> Amp <sup>R</sup> .....	50
III. Induction in vitro du gène reporter cat des mutants transpositionnels de <i>B. melitensis</i> 16M .....	51
III.1. Mise en évidence de l'expression du gène <i>cat</i> .....	51
III.2. Effet de la composition du milieu sur l'expression du gène <i>cat</i> . .....	52
III.3. Effet de la température sur la croissance des mutants transpositionnels et sur l'expression de <i>cat</i> .....	53
IV. Isolement de l'ADN génomique situé directement en amont du transposon.....	55
IV.1. Principe de la PCR inverse ou IPCR .....	55
IV.2. Restriction de l'ADN génomique des clones Amp <sup>S</sup> par <i>Taq</i> I.....	56
IV.3. IPCR sur l'ADN génomique restreint par <i>Taq</i> I.....	57
<b>Conclusions et Perspectives</b> .....	58

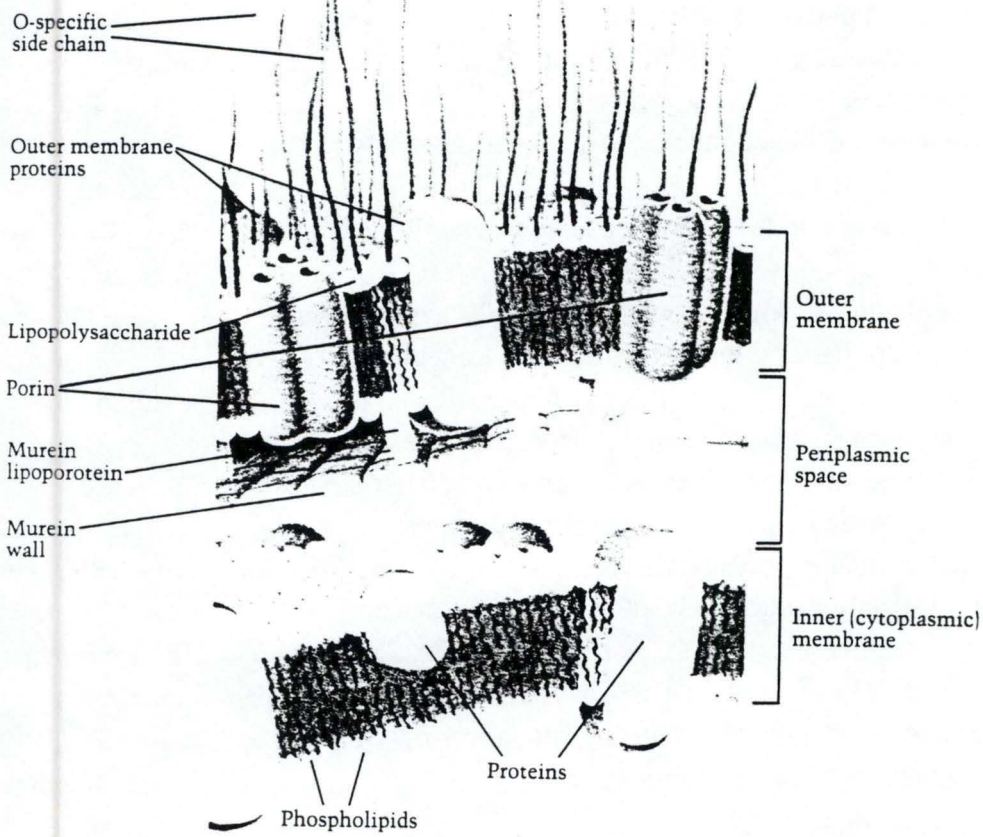


Figure 1.1: Modèle de la paroi d'une bactérie gram-négative (d'après Neidhardt *et al.*, 1990).

# INTRODUCTION

## I. *Brucella* sp. : bactérie pathogène

### I.1. Caractéristiques générales

Les bactéries du genre *Brucella* sp. sont des coccobacilles gram-négatifs immobiles, asporulés et strictement aérobies. Ces bactéries sont des parasites intracellulaires facultatifs responsables d'une zoonose de répartition mondiale.

Sur base de la séquence de l'ARN ribosomal 16S et de la composition du lipide A, Moreno *et al.* (1990) ont proposé que le genre *Brucella* soit lié à la subdivision alpha-2 de la classe des *Proteobacteriae* (précédemment nommées bactéries photosynthétiques pourpres et les bactéries apparentées non-phototrophes comme *Rickettsia*, *Agrobacteria*, *Rhizobia*).

Le genre *Brucella* est divisé en 6 espèces: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* et *B. neotomae*. L'identification des espèces de *Brucella* sp. est basée sur deux types de propriétés: la sensibilité à certains phages et le profil d'oxydation d'une série d'acides aminés et de sucres. Pour l'identification des biovars au sein des espèces, des tests biochimiques et des tests d'agglutination par des anticorps spécifiques sont utilisés (Alton *et al.*, 1988).

Néanmoins, Verger *et al.* (1985) proposent de rassembler les *Brucella* sp. en une seule espèce, *B. melitensis*, sur base de l'homologie supérieure à 87 % lors d'une hybridation d'ADN génomique entre les souches représentatives des espèces du genre *Brucella* sp.

La paroi des bactéries gram-négatives est constituée d'une membrane interne (cytoplasmique) et d'une membrane externe, séparées par l'espace périplasmique contenant le peptidoglycane (figure I.1). La membrane externe est asymétrique: le feuillet interne contient des phospholipides alors que le feuillet externe est constitué de lipopolysaccharide (LPS).

Le LPS est constitué de 3 éléments (figure I.2):

- le lipide A qui l'ancre dans la membrane et qui confère la toxicité au LPS.
- une courte série de sucres, le core.
- une longue chaîne de sucres, la chaîne O.

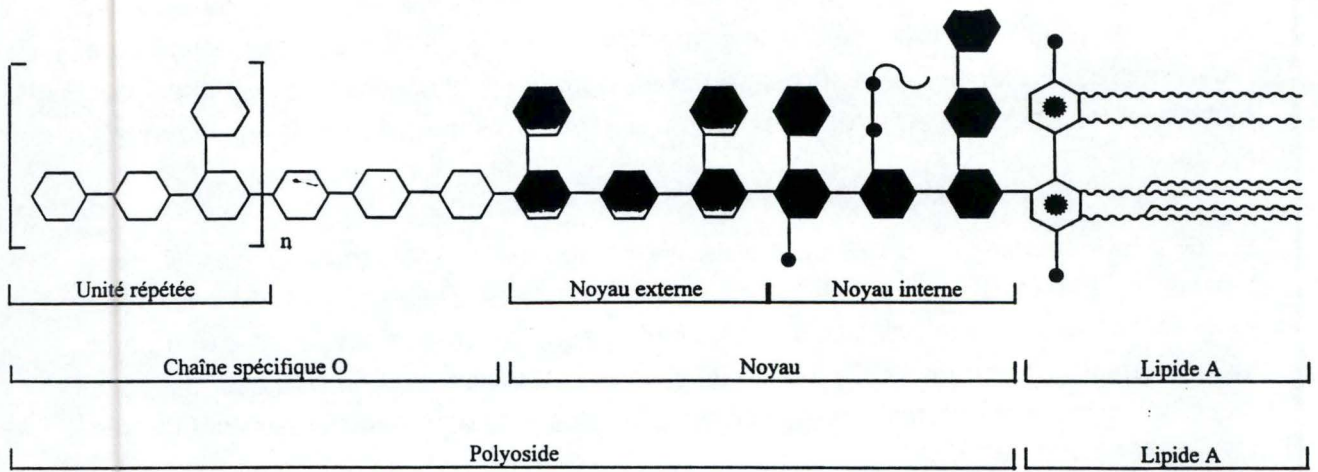


Figure 1: Structure du lipopolysaccharide d'Entérobactérie.

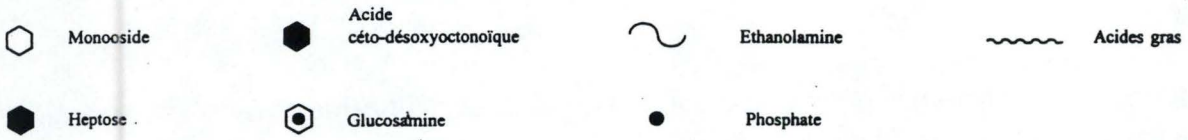


Figure I.2: Structure du LPS (lipopolysaccharide).

Chez *Brucella* sp. comme chez beaucoup de bactéries gram-négatives deux types de LPS sont observés. Le LPS de type "rough" dépourvu de chaîne O confère aux colonies un phénotype rugueux (R) et le LPS de type "smooth" contenant une chaîne O, un phénotype lisse (S).

La brucellose humaine (ou fièvre de Malte ou encore fièvre ondulante) s'accompagne de divers symptômes non-spécifiques à l'infection tels que fièvre, sueurs, anorexie, asthénie, problèmes musculaires et articulaires. Le traitement actuel pour l'homme est basé sur la prise de doses importantes de tétracycline et de streptomycine (Baldwin et Winter, 1993). L'homme s'infecte par contact direct avec un animal brucellique ou suite à la consommation de produits contaminés (comme le lait cru). D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, dans 6 des 25 pays du Moyen-Orient déclarant la présence de la brucellose, 90.000 nouveaux cas humains principalement dus à *B. melitensis* sont recensés chaque année (communiqué de presse O.M.S., 6 septembre 1993).

Chez les animaux, les principales conséquences de l'infection brucellique sont l'avortement chez la femelle gestante et la stérilité chez le mâle. La dissémination de la bactérie pathogène se fait lors des avortements de femelles contaminées, ainsi que par le lait, les matières fécales, les sécrétions vaginales ou par contamination *in utero*.

Le dépistage de la maladie se fait principalement par la mise en évidence d'anticorps anti-LPS dans le lait ou le sang, car les symptômes ne sont pas assez spécifiques pour permettre un diagnostic clinique.

Les programmes d'éradication de la brucellose se font sur base de vaccinations des jeunes animaux et des adultes et/ou le dépistage suivi de l'abattage des animaux infectés ou exposés (le traitement antibiotique étant interdit pour le bétail).

Les problèmes majoritaires liés aux vaccins sont que:

- même s'ils sont utilisés avec succès ils n'assurent la protection que de 60 à 75% d'animaux.
- ils restent infectieux pour l'homme
- la différenciation entre un animal infecté et un animal vacciné n'est pas assurée par le diagnostic sérologique.

De plus, le diagnostic sérologique ne permet pas de détecter tous les animaux brucelliques et les anticorps induits par une infection due à une autre bactérie (*Yersinia enterocolitica* O:9) peuvent interférer avec le test, entraînant une réponse sérologique faussement positive.

La brucellose demeure donc un problème médical et économique important.

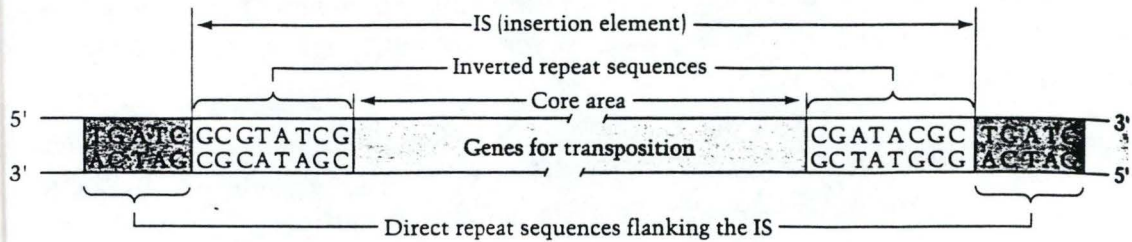


Figure I.3: Structure d'un élément transposable IS (séquence d'insertion) (d'après Neidhardt *et al.*, 1990).

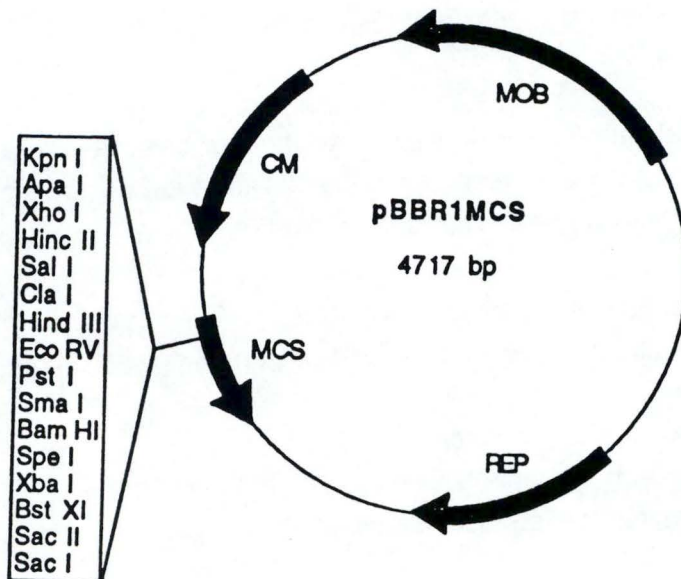


Figure I.4: Carte plasmidique du pBBR1MCS.

Ce vecteur qui contient le site multiple de clonage du plasmide pBluescript II KS-*lac Z* $\alpha$  facilite le clonage et la mutagenèse de gènes de bactéries gram-négatives. Le MCS possède 16 sites de restriction uniques qui interrompent le fragment *lac Z* $\alpha$  (d'après Kovach *et al.*, 1994).

**MOB:** gène permettant la mobilisation du plasmide. **REP:** gène permettant la réplication du plasmide. **CM:** gène encodant la chloramphénicol acétyl transférase qui confère la résistance au chloramphénicol.

## I.2. Caractéristiques génétiques

Le génome de *Brucella* sp. a une taille d'environ  $3.1 \times 10^6$  paires de bases (pb) et son contenu en bases G et C est élevé (57-59 %) (De Ley *et al.*, 1987) (Allardet-Servent *et al.*, 1991). Il serait constitué de deux chromosomes circulaires de 2100 et 1150 kb (Allardet-Servent *et al.*, 1991) (Michaux *et al.*, 1993). Jusqu'à présent, la présence naturelle de plasmides dans *Brucella* sp. n'a pas pu être démontrée.

Dans ce génome, des séquences similaires aux séquences d'insertion (IS) (figure I.3) détectées chez d'autres bactéries ont été mises en évidence. Les IS de *Brucella* sp. sont délimitées par de courtes répétitions inversées et contiennent une ORF codant probablement pour une transposase. Plusieurs IS dont les séquences sont très similaires ont été isolées chez *Brucella* sp. Le nombre de copies d'IS détecté chez *B. ovis* (20 à 35) est plus élevé que dans les autres espèces (5 à 15) (Ouahrani *et al.*, 1993).

Les IS sont décrites comme étant des séquences mobiles autonomes pouvant engendrer des événements génomiques, tels que des délétions, duplications ou inversions, donc une introduction de variabilité dans le génome. Mais à ce jour la mobilité des IS n'a pas été montrée chez *Brucella* sp.

Le développement de techniques d'analyse et de manipulation génétique chez *Brucella* sp. devrait permettre une meilleure compréhension de sa virulence. Les outils génétiques disponibles chez *Brucella* sp. sont présentés dans les paragraphes suivants.

Parmi les marqueurs de sélection, l'utilisation des antibiotiques tels que la streptomycine et la tétracycline est interdite étant donné leur utilisation dans le traitement de la brucellose.

Six groupes de phages ont été identifiés chez *Brucella* sp. (ils sont utilisés pour le typage), mais aucune donnée ne permet d'affirmer qu'ils seraient des véhicules d'ADN chez la bactérie.

Comme cela a été dit, *Brucella* sp. ne posséderait pas de plasmides et le protocole de transformation (traitement au  $\text{CaCl}_2$ ) couramment appliqué à *E. coli* reste sans résultat chez *Brucella* sp. Par contre, des plasmides à large spectre d'hôtes ont été introduits dans cette bactérie pathogène par électroporation ou par conjugaison et s'y maintiennent de façon stable (Rigby et Fraser, 1989) (Verger *et al.*, 1993). Ces plasmides étant de grande taille (>50 kb), ils sont d'une utilité restreinte.

Récemment, un plasmide de 4,7 kb qui se maintient dans *Brucella* sp. en une dizaine de copies a été décrit: pBBR1MCS (Elzer *et al.*, 1995) (figure I.4). Ce plasmide est utilisé comme véhicule pour introduire de l'ADN dans *Brucella* sp.

<i>E. coli</i> donor strain	Suicide plasmid	Transposon	Frequency of Km <sup>r</sup> colonies*
S17-1	pSUP2021	Tn5	$3.6 \times 10^{-6}$
S17-1 SM10	pJFF350 pUT/Km	Omegon-Km Tn5 derivative	$3.5 \times 10^{-9}$ $2.7 \times 10^{-5}$

Tableau I.1: Efficacité de transposition chez *B. abortus* 2308 de 3 systèmes de transfert de transposon (d'après Sangari et Agüero, 1991).

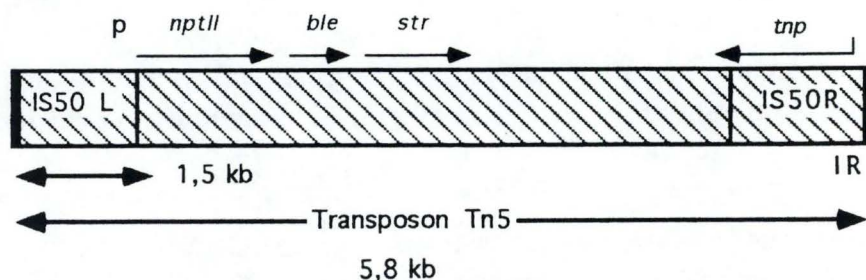


Figure I.5: Structure du transposon Tn5.

La transposition est une insertion autonome et quasi aléatoire d'un transposon dans l'ADN. Le transposon Tn5 comprend les gènes:

*tnp*: encodant la transposase, *nptII*: encodant la résistance à la néomycine/kanamycine, *ble*: encodant la résistance à la bléomycine, *str*: encodant la résistance à la streptomycine. *p* est le promoteur de l'opéron encodant les trois antibiotiques. Le transposon Tn5 est flanqué d' IS50 de 1,5 kb (dont les IR sont de 19 pb).

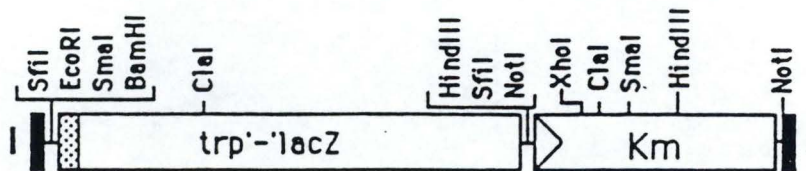


Figure I.6: Composition d'un dérivé du transposon Tn5.

Le mini Tn5 (flanqué des séquences inversément répétées I et O end de 19 pb) possède une complète capacité de transposition. Les I et O end ne possèdent aucun codon stop ou terminateur de transcription. Les sites de restriction uniques internes (*Sfi* I et *Not* I) du transposon permettent le clonage de gènes de sélection (gène encodant la résistance à la kanamycine) et de gènes reporter (gène *cat* ou *lacZ1*).

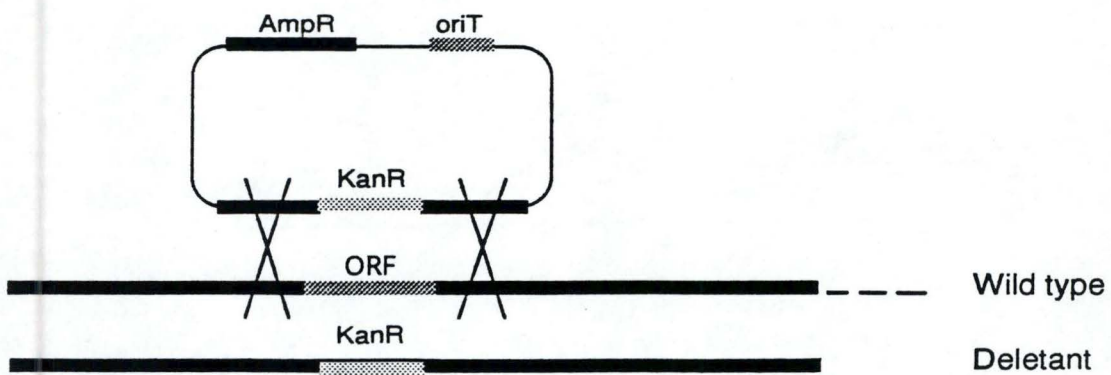


Figure 1.7: Schéma explicatif du "gene replacement" ou délétion par remplacement.

Le remplacement d'un gène sauvage génomique bactérien (ORF) peut se faire par deux recombinaisons homologues entre les parties flanquantes du gène délété (par un gène de sélection, ici Kan<sup>R</sup>). La copie mutée du gène est clonée dans un plasmide qui est introduit dans la bactérie et le gène sauvage génomique.

Les plasmides dérivés du pBR322 (origine de répllication ColE1) sont suicides dans *Brucella* sp. (c'est-à-dire non-réplicatifs) et sont donc des outils génétiques utiles dans la création de mutants (ce sujet est développé plus loin) (Halling *et al.*, 1991).

L'identification de gènes régulateurs ou de structure est facilitée par la création de mutants bactériens. Chez *Brucella* sp., des mutants naturels existent (variants rugueux, souches vaccinales).

Des mutants aléatoires ont été obtenus par la transposition du Tn5 dans le génome de *Brucella abortus* (Smith et Heffron, 1987). Dans cette étude, le transposon Tn5 (figure I.5) encodant le gène de la résistance à la kanamycine ( $Km^R$ ) et un gène reporter *lacZ* (encodant la  $\beta$ -galactosidase) sans promoteur, a été introduit dans *Brucella* sp. par infection par le phage P1 ou par transfert conjugatif d'un plasmide. Dans les deux cas des mutants transpositionnels ont été isolés mais à faible fréquence. Des mutants transpositionnels ont aussi été isolés par Lai *et al.* en 1990 après électroporation dans *B. abortus*. d'un plasmide suicide portant le Tn5.

Sangari et Aguëro ont comparé en 1991, 3 systèmes de transposition. Dans les 3 cas, il s'agissait de plasmides suicides transférés par conjugaison dans *B. abortus*. La fréquence de transposition la plus élevée est obtenue avec un dérivé du Tn5, le mini Tn5 ( $Km^R$ ) (tableau I.1). Au cours du mémoire nous avons utilisé un type de mini Tn5 (figure I.6) dont les particularités sont décrites dans le chapitre Matériel et Méthodes (de Lorenzo *et al.*, 1990).

Parallèlement à l'obtention de mutants aléatoires s'est développée la construction de mutants par délétion ou disruption de gènes spécifiques. L'étude de ces mutants permet d'évaluer le rôle du gène d'intérêt dans la virulence de *Brucella* sp. La stratégie de mutation est basée sur l'introduction dans *Brucella* sp. d'un plasmide suicide (origine de répllication ColE1) contenant une copie mutée du gène étudié. Dans cette copie mutée, la séquence codante est remplacée par le marqueur  $Km^R$  par exemple. Le remplacement dans le génome de *Brucella* sp. du gène sauvage par le gène muté se fait par deux recombinaisons homologues entre les parties flanquantes du gène muté et le génome (figure I.7).

La complémentation de ces mutants spécifiques peut se faire grâce à une copie du gène sauvage portée par le plasmide pBBR1MCS.

Le tableau I.2 présente la liste des différents gènes clonés chez *Brucella* sp.

Gène	Espèce	Fonction	Δ	Référence
groEL	<i>B. abortus</i>	Hsp 60, chaperonine		Lin <i>et al.</i> , 1992; Roop <i>et al.</i> , 1992; Gor & Mayfield, 1992
groES	<i>B. abortus</i>	Hsp 10, chaperonine		Lin <i>et al.</i> , 1992; Gor & Mayfield, 1992
dnaK-dnaJ	<i>B. ovis</i>	Hsp 70, chaperonine, synthèse d'ADN & Hsp 40		Cellier <i>et al.</i> , 1992
htrA	<i>B. abortus</i>	protéine nécessaire à haute température, sérine protéase périplasmique	+	Roop <i>et al.</i> , 1994; Tatum <i>et al.</i> , 1994
htrA-like	<i>B. abortus</i>		+	Tatum <i>et al.</i> , 1994
gène de catalase	<i>B. abortus</i> 19	catalase		Sha <i>et al.</i> , 1994
sodC	<i>B. abortus</i>	Cu-Zn superoxyde dismutase	+	Bricker <i>et al.</i> , 1990; Latimer <i>et al.</i> , 1992
leuB	<i>B. abortus</i>	beta-isopropyl malate, biosynthèse de leucine		Essenberg & Sharma, 1993
proA	<i>B. abortus</i>	glutamyl phosphate réductase, biosynthèse de proline		Essenberg & Sharma, 1993
opéron purEK	<i>B. melitensis</i>	purE: 5'-phosphoribosyl-5-amino-4-imidazole carboxylase purK: protéine de liaison au CO2	+	Drazek <i>et al.</i> , 1995
bfr	<i>B. melitensis</i>	bactéioferritine, stockage du fer	+	Denoël <i>et al.</i> , 1995
recA	<i>B. abortus</i>	recombinase A	+	Tatum <i>et al.</i> , 1993
uvrA	<i>B. abortus</i>	sous-unité A de la nucléase d'excision ABC		Zhu <i>et al.</i> , 1993
ssb	<i>B. abortus</i>	liaison à l'ADN bicaténaire, déstabilise l'hélice		Zhu <i>et al.</i> , 1993
p17	<i>B. abortus</i>	protéine membranaire (?)		Hemmen <i>et al.</i> , 1994
BCSP31	<i>B. abortus</i>	31-kDa, protéine de surface	+	Mayfield <i>et al.</i> , 1988

Gène	Espèce	Fonction	Δ	Référence
omp2a & omp2b	<i>B. abortus</i>	porine		Ficht <i>et al.</i> , 1989; Marquis & Ficht, 1993
omp25	<i>B. abortus</i>	protéine membranaire exposée à la surface		de Wergifosse <i>et al.</i> , 1995
pal	<i>B. abortus</i>	lipoprotéine associée au peptidoglycane, exposée à la surface		Tibor <i>et al.</i> , 1994
ARN ribosomal 5S	<i>B. abortus</i>			Minnick & Stiegler, 1993
ARN ribosomal 16S				Dorsch <i>et al.</i> , 1989; Liesack & Finster, 1994
opéron rplJL, gènes L10 & L7/L12	<i>B. abortus</i> & <i>B. melitensis</i>	protéines ribosomales		Olivera <i>et al.</i> , 1994; Bachrach <i>et al.</i> , 1994
IS711	<i>B. ovis</i>	séquence d'insertion		Halling <i>et al.</i> , 1993
IS6501	<i>B. ovis</i>	séquence d'insertion, transposase de 26 kDa		Ouahrani <i>et al.</i> , 1993
bru-RS1 & bru-RS2	<i>Brucella</i> spp.	2 éléments d'ADN répétés et palindromiques		Halling & Bricker, 1994

Tableau I.2 : Gènes clonés chez *Brucella* sp.. Leur fonction est mentionnée lorsqu'elle est connue. Colonne Δ: + si un délétant a été décrit.

## II. La virulence chez *Brucella* sp.

### II.1. Les facteurs de virulence

Les mécanismes de virulence d'une bactérie peuvent être très divers, comprenant entre autres: l'adhérence aux cellules mucosales (par des pili (fimbriae), des adhésines...), la survie intracellulaire, la mobilité et la chémotaxie (permettant à la bactérie de se situer dans un environnement riche en nutriments...), la production d'exotoxines (des protéines attaquant les phagocytes, les IgA protéases...), l'évitement des défenses de l'hôte (par camouflage, production d'une capsule, variation des antigènes de surface, localisation intracellulaire...), l'acquisition de fer (grâce au sidérophore ou aux protéines de l'hôte comme la transferrine...) (Finlay et Falkow, 1989) (Salyers et Whitt, 1994). Ces nombreux facteurs permettent au pathogène d'infecter l'hôte, c'est-à-dire de s'y installer. L'infection peut parfois engendrer la maladie qui est l'ensemble des symptômes en découlant (Salyers et Whitt, 1994).

Comme on peut le constater, l'infection bactérienne est tellement complexe que des mutations de plusieurs gènes qui contribuent à la virulence sont souvent nécessaires afin d'observer une atténuation appréciable de la virulence. En effet les analyses biochimiques et génétiques montrent qu'au cours d'une infection les bactéries répriment la production de beaucoup de protéines et induisent la synthèse de beaucoup d'autres.

Le pathogène à l'intérieur de son hôte est confronté à différents environnements; la colonisation optimale des différentes niches de l'hôte dépend de la régulation de gènes codant pour les facteurs de virulence. *Salmonella typhimurium* aurait besoin de plus de 200 produits de gènes pour quelques étapes d'adaptation dans le corps humain (Salyers et Whitt, 1994). Le locus *vir* chez *Bordetella pertussis* serait responsable de la régulation de l'expression d'au moins 20 gènes de virulence (Finley et Falkow, 1989). La connaissance de cette régulation génétique permettrait de comprendre comment l'infection s'établit (Salyers et Whitt, 1994).

Les gènes de virulence peuvent être définis comme étant:

- les gènes dont la délétion diminue la virulence bactérienne.
- ou/et les gènes qui, exprimés dans une bactérie avirulente, la rendent virulente.

Ces gènes qui sont exprimés à un moment de l'infection de l'hôte peuvent être classés en différentes catégories:

- les gènes encodant des facteurs d'agression de l'hôte (codant pour des exotoxines, endotoxines (LPS), enzymes (coagulase)...).
- les gènes encodant des facteurs d'invasivité et de résistance aux défenses de l'hôte (codant pour la superoxyde dismutase (SOD), la catalase...).
- les gènes de maintenance qui, lorsqu'ils sont délétés, diminuent souvent la survie et donc la virulence (par exemple, les gènes encodant des enzymes de voies métaboliques nécessaires à la survie dans l'hôte...).

## **II.2. La pathogénie de la brucellose**

La pathogénie de la brucellose est similaire chez tous les animaux domestiques. Le plus souvent, la brucellose des animaux domestiques est une infection chronique qui persiste tout au long de la vie de l'animal.

Comme toutes les infections, l'infection brucellique est un compromis entre le degré de virulence de la bactérie et le degré de susceptibilité ou de résistance de l'hôte. Au niveau de *Brucella* sp., des facteurs comme la dose, l'espèce et la souche conditionnent la virulence. En ce qui concerne l'hôte naif le degré de susceptibilité dépend de facteurs génétiques (35% du bétail est résistant naturellement), de l'âge, du sexe et de l'état de reproduction. La susceptibilité est maximale chez les femelles gestantes, étant donné la présence d'érythritol dans le placenta. L'érythritol est un polyol (CH<sub>2</sub>OH-CHOH-CHOH-CH<sub>2</sub>OH) préférentiellement catabolisé par *Brucella* sp., dont il favoriserait la croissance (Smith et Ficht, 1990).

L'infection mucoale se fait grâce à la capacité d'attachement de *Brucella* sp., elle peut créer une brèche et pénétrer dans l'épithélium (Nielsen et Duncan, 1990). Beaucoup d'espèces de *Brucella* sp. sont capables d'envahir la conjonctive, les muqueuses buccale, pharyngienne, intestinale, respiratoire et des voies génitales.

Les *Brucella* sp. qui ont échappé à la réaction inflammatoire peuvent atteindre libres ou dans des cellules phagocytaires les ganglions proches du site initial d'infection par le drainage lymphatique. De moins en moins de bactéries colonisent les ganglions plus éloignés.

La muqueuse représente donc la première ligne de défense de l'hôte. Les réactions inflammatoires dans la sous-muqueuse et dans les ganglions drainant le site d'invasion sont respectivement la seconde et la troisième ligne de défense. Si les *Brucella* sp. ne sont pas détruites dans les ganglions, l'infection persiste et peut se généraliser via le sang. Durant cette phase, *Brucella* sp. survit dans les macrophages et les neutrophiles de l'hôte.

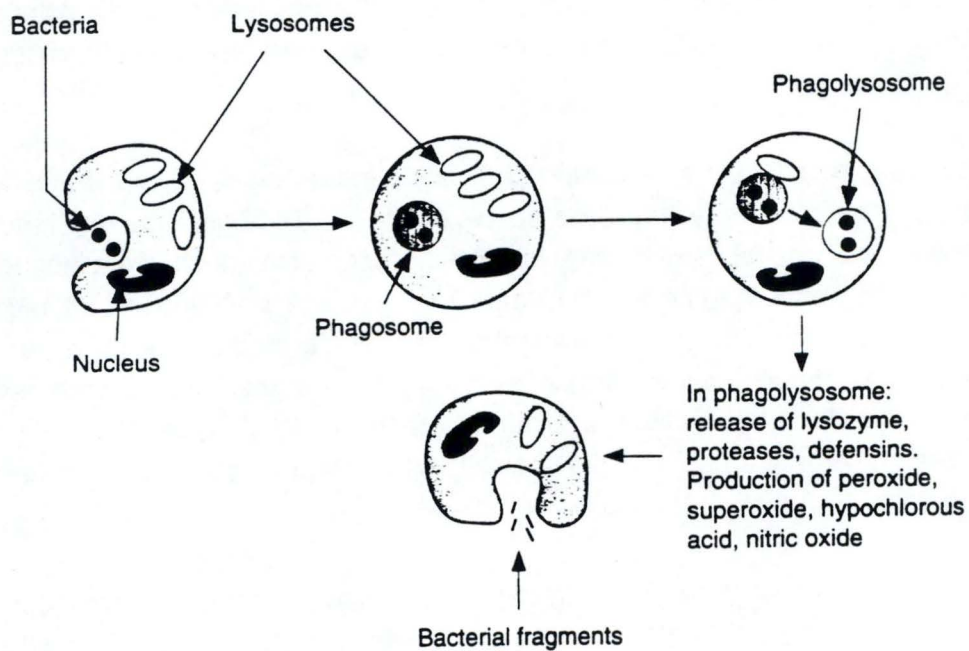


Figure 1.8: Etapes d'ingestion et d'élimination d'une bactérie par les cellules phagocytaires (d'après Salyers et Whitt, 1994).

Les phagocytes facilitent la dispersion de la bactérie ingérée, de plus elle y est protégée des attaques par le complément et des anticorps.

La bactérie peut ainsi aller se localiser dans divers organes (entre autres dans le placenta, les mamelles, les organes génitaux, les yeux, la rate, le foie, la moëlle osseuse et occasionnellement dans le cerveau). Les animaux infectés développent une réponse inflammatoire granulomateuse souvent localisée dans les tissus lymphoïdes et le foie (Nielsen et Duncan, 1990).

La localisation dans les organes génitaux est responsable des symptômes cliniques principaux de l'infection par *Brucella* sp., l'avortement chez la femelle et la stérilité chez le mâle.

Ce bref descriptif du cycle infectieux de *Brucella* sp. permet de mettre en évidence la capacité de cette bactérie de survivre dans les cellules de l'hôte infectées qu'elles soient ou non phagocytaires.

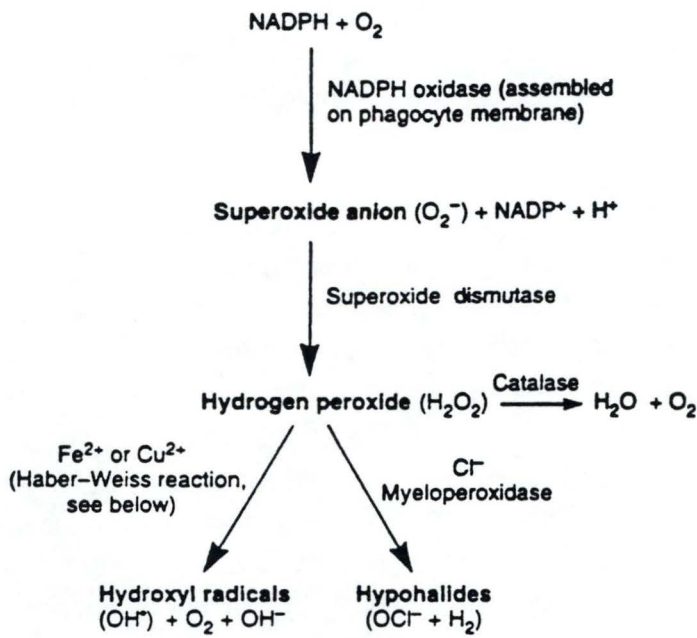
Les *Brucella* sp. pour survivre dans les cellules non-phagocytaires (cellules trophoblastiques, cellules hépatiques...) se répliqueraient dans les citernes du réticulum endoplasmique rugueux (RER). *Brucella* sp. serait transportée par des vésicules jusque dans la lumière du RER, les *Brucella* sp. intracellulaires ne seraient jamais libres mais toujours entourées d'une membrane (Detilleux *et al.*, 1990) (Baldwin et Winter, 1993). Detilleux (1990) propose aussi que ce transfert vers le RER serait *Brucella* sp.-induit.

La colonisation de ces cellules par *Brucella* sp., la met à l'abri des mécanismes immunitaires humoraux (complément et anticorps) ou cellulaires (macrophages) de l'hôte. De plus, les cellules non-phagocytaires déploient de moindres défenses par rapport aux défenses cellulaires que rencontre *Brucella* sp. dans les cellules phagocytaires.

Néanmoins, les parasites intracellulaires dont *Brucella* sp. fait partie ont une préférence marquée pour les phagocytes, qui leur permettent une dissémination dans l'hôte. *Brucella* sp. se trouve dans des vacuoles d'endocytose des macrophages ou des neutrophiles, où elle doit résister aux mécanismes de défense cellulaire pour survivre (figure 1.8).

### **II.3. Phagocytose et bactéricidie**

Le mécanisme conduisant à la destruction par le phagocyte suit ce schéma: la migration au hasard ou chémo-tactique des cellules phagocytaires, l'adhésion, l'ingestion, une explosion respiratoire, une dégranulation et enfin la mort du pathogène (Canning, 1990).



Haber-Weiss reaction:..



Figure I.9: Réactions de l'explosion respiratoire (d'après Baldwin *et al.*, 1993).  
 Conversion de l'oxygène en métabolites actifs anti-microbiens.

L'adhésion d'une bactérie pathogène est médiée par des molécules appelées adhésines. Deux types d'interactions sont décrites. Une interaction protéines-protéines: une protéine de la surface bactérienne reconnaît une protéine ou un peptide membranaire (intégrines, glycoprotéines...) de la cellule cible. Afin d'adhérer aux intégrines les bactéries se masquent avec le ligand de l'intégrine ou se fixent aux intégrines grâce à un ligand auxiliaire (invasine, fimbriae...) ou encore, miment un ligand des intégrines. La seconde interaction est de type lectine-adhésine polyosidique: un sucre de la bactérie reconnaît une protéine membranaire de la cellule cible ou vice versa.

Des facteurs nommés opsonines qui se lient à la surface bactérienne ("lipopolysaccharide-binding protein" ou LBP, ainsi que des protéines comme les anticorps ou le complément) facilitent l'adhésion bactérienne via un récepteur spécifique.

Les cellules phagocytaires activées par l'environnement inflammatoire et par l'adhésion déclenchent le processus d'ingestion et des réactions bactéricides. La bactérie est donc ingérée par la cellule et se localise dans un phagosome. Ensuite la fusion de granules cytoplasmiques (dont les lysosomes) et le largage des enzymes et protéines qu'ils contiennent s'effectue simultanément à l'explosion respiratoire.

Les activités antimicrobiennes des cellules peuvent en fait être classées en un système dépendant de l'oxygène ( $O_2$ ), un système dépendant de l'azote (N) et un système indépendant de l' $O_2$  et de l'N. Pour ce qui est du système dépendant de l'oxygène, l'explosion respiratoire est une augmentation de la consommation d'oxygène qui conduit à la production de divers métabolites actifs antimicrobiens dérivés de l' $O_2$ . Le radical superoxyde  $O_2^-$  (produit par la NADPH oxydase) est à l'origine des autres dérivés (figure 1.9).

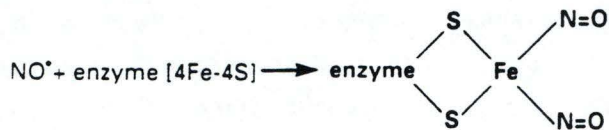
Lors de l'explosion respiratoire, le système de la myéloperoxydase-péroxyde d'hydrogène-halide (MPO- $H_2O_2$ -halide) constitue la principale défense antimicrobienne des neutrophiles. Ce système met en jeu la myéloperoxydase des granules primaires, l' $H_2O_2$  dérivé de l'explosion respiratoire et des ions tels que  $ClO^-$  ou  $IO^-$ . Les produits de la réaction antimicrobienne du système MPO- $H_2O_2$ -halide créent des liaisons entre ces ions et les résidus tyrosine ou histidine des protéines du parasite. Du système dépendant de l'N dérivent différents métabolites actifs tels que NO,  $NO_3^-$  et  $NO_2^-$ . Le dérivé hautement réactif NO (dont la production dans les macrophages humains n'est pas démontrée) provient de la conversion de la L-arginine et de l'oxygène (par l'oxyde nitrique synthase); d'autres intermédiaires azotés réactionnels dérivent du NO (figure 1.10) (Austin et Wood, 1993).

Quant aux défenses indépendantes de l'oxygène et de l'azote, elles comprennent entre autres: les enzymes hydrolytiques (le lysozyme et notamment des protéases et des cathepsines), de petits peptides cationiques (des défensines qui ne sont pas présentes

1. The cytosolic enzyme nitric oxide synthase catalyzes the conversion of L-arginine and molecular oxygen to L-citrulline and nitric oxide (NO)



2. NO can react with Fe-S groups, resulting in the inactivation and degradation of prosthetic groups of certain enzymes in the mitochondrial electron transport chain, thus inhibiting oxidative metabolism



3. Alternatively, NO can react with the superoxide anion radical to form the peroxynitrite anion – this decays rapidly after protonation to form the reactive hydroxyl radical HO<sup>•</sup> and the nitric oxide free radical NO<sub>2</sub>

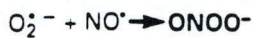


Figure I.10: Réactions produisant les métabolites actifs antimicrobiens dérivés de l'azote (d'après Austyn et Wood, 1993).

dans les macrophages), une acidification de la vacuole d'endocytose et une diminution drastique du fer libre ou lié intracellulaire (Salyers et Whitt, 1994)(Austin et Wood, 1993).

#### **II.4. Survie de *Brucella* sp. dans les phagocytes**

Les *Brucella* sp. sont de faibles activateurs des phagocytes. En effet, l'une des intégrines ( $\alpha_{\text{mac}}\beta_2$ ) intervenant dans l'adhérence de *Brucella* sp. aux phagocytes permet à la bactérie de ne pas activer différentes défenses cellulaires (comme la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et d'autres dérivés de l' $\text{O}_2$ ) (Campbell *et al.*, 1994) (Isberg et Tran Van Nhieu, 1994).

De plus, le lipide A du LPS de *Brucella* sp. contrairement à celui de beaucoup d'autres bactéries pathogènes, est un faible stimulateur du largage de lysosome et de la production de superoxyde par les neutrophiles (Baldwin et Winter, 1993) (Rasool *et al.*, 1992).

Dans les cellules phagocytaires, *Brucella abortus* vivante ou morte a comme capacités de résistance, la réduction de la dégranulation et donc du largage d'enzymes lysosomiales (Riley *et al.*, 1984). La fusion phagolysosomale serait inhibée par un facteur soluble qui n'est pas produit par la souche *B. abortus* B19 (Smith et Ficht, 1990) (Baldwin et Winter, 1993).

*Brucella* sp. opsonisée peut activer l'explosion respiratoire mais elle produit un composant inhibiteur de l'activité MPO- $\text{H}_2\text{O}_2$ -halide (Baldwin et Winter, 1993). Le composant responsable de l'inhibition de l'activité MPO- $\text{H}_2\text{O}_2$ -halide a pu être identifié. Il s'agit du 5'-guanosine monophosphate (**GMP**) et de l'**adénine**, qui sont tous deux relargués par *Brucella* sp. Le GMP et l'adénine inhibent le système MPO- $\text{H}_2\text{O}_2$ -halide en supprimant le largage de l'enzyme MPO des granules primaires (Canning *et al.*, 1986) (Nielsen et Duncan, 1990).

Jusqu'à présent aucun mécanisme toxique (par exemple, la production d'une exotoxine) pour l'hôte n'a été identifié chez *Brucella* sp. Aucune adhésine n'a été décrite pour *Brucella* sp. qui en tout cas ne possède pas de fimbriae.

#### **II.5. Les facteurs de virulence identifiés ou étudiés chez *Brucella* sp.**

Parmi les facteurs permettant l'infection brucellique, on peut citer: une endotoxine (LPS) et la capacité de cataboliser l'érythritol, qui sont tous deux, des facteurs étudiés chez des mutants naturels atténués de *Brucella* sp.

le **LPS** ou endotoxine (toxine glucido-lipidique qui n'est libérée qu'après lyse de la bactérie) de la membrane externe confère aux colonies brucelliques leur aspect rugueux

virulence si ce n'est pour les espèces *B. ovis* et *B. canis* qui sont rugueuses mais virulentes. Les souches lisses virulentes de *Brucella* sp. seraient plus aptes à survivre dans les macrophages que leur correspondantes rugueuses.

La souche B19 est un mutant spontané qui diffère des autres souches de *B. abortus* par sa sensibilité à l'**érythritol**. L'érythritol est un polyol à 4 carbones dont le catabolisme est limité chez les procaryotes. Ce composant est utilisé par toutes les *Brucella* sp. isolées sauf par *B. ovis* et par quelques souches de *B. canis*.

*Brucella* sp. utilise une kinase constitutive pour phosphoryler l'érythritol (en érythritol-1-phosphate), l'oxydation complète de l'érythritol nécessitant 5 enzymes. La souche vaccinale B19 est déficiente pour l'une des enzymes (la D-érythrulose 1-P déshydrogénase) du catabolisme de l'érythritol. La croissance de B19 en présence d'érythritol est apparemment inhibée par l'accumulation d'un intermédiaire toxique (le D-érythrulose 1-P) et par une diminution du taux d'ATP. En effet chez *Brucella* sp., le catabolisme de l'érythritol fournit en théorie plus d'énergie que celui du glucose (27 ATP/ molécule d'érythritol et 12 ATP/ molécule de glucose).

Chez la souche B19, le clonage de la région contenant les gènes du catabolisme de l'érythritol révèle une délétion de 702 pb (Sangari *et al.*, 1994).

L'implication du catabolisme de l'érythritol dans une virulence accrue reste une question importante. L'érythritol n'est pas présent dans les macrophages et est difficilement mis en évidence chez d'autres animaux que les ongulés (il n'est pas décrit dans les tissus de la souris et du cobaye mais a été isolé chez l'homme).

Quatre mutants transpositionnels incapables de cataboliser l'érythritol ont été testés. Ces 4 mutants ne semblent pas montrer une survie réduite ni en culture de macrophage ni en souris (Smith et Ficht, 1990). L'érythritol ne serait donc pas un facteur de virulence important chez les animaux autres que les ongulés.

D'autres facteurs ont été étudiés sur base d'a priori, comme les facteurs impliqués dans la détoxification de dérivés de l'O<sub>2</sub> (superoxyde dismutase et catalase), des facteurs permettant à la bactérie de subvenir à ses besoins en fer (sidérophore et bactérioferritine), des protéines de stress (hsp) ou encore des enzymes de maintenance (enzymes du métabolisme des purines).

Dans l'hôte, le taux de fer libre est très bas à cause des protéines qui le séquestrent comme par exemple la transferrine. Un système d'acquisition du fer est donc indispensable à la pathogénicité bactérienne.

*Brucella* sp. possède un **sidérophore** (2,3-Dihydroxybenzoic acid, 2,3-DHBA) qui en chélatant le fer lui permet de capter le fer indispensable à sa croissance. De plus, ce

*Brucella* sp. possède un **sidérophore** (2,3-Dihydroxybenzoic acid, 2,3-DHBA) qui en chélatant le fer lui permet de capter le fer indispensable à sa croissance. De plus, ce sidérophore est un scavenger de radicaux libres qui participe donc à la protection de *Brucella* sp. contre l'attaque des cellules phagocytaires (Lopez-Goni *et al.*, 1992) (Baldwin *et al.*, 1993).

*Brucella* sp. possède aussi une protéine dont le rôle est de stocker le fer sous une forme intracellulaire non toxique. Cette protéine est une homologue de la **bactérioferritine** d'*E. coli* (Denoël *et al.*, 1995).

La superoxyde dismutase (**SOD**) et la **catalase** de *Brucella* sp. joueraient un rôle détoxifiant, protégeant *Brucella* sp. des anions superoxydes ( $O_2^-$ ) et du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) des cellules phagocytaires. Une catalase périplasmique a été purifiée et son gène cloné chez *B. abortus* (Sha *et al.*, 1994).

Sriranganathan *et al.* (1991) n'ont pas réussi à mettre en évidence de différence dans l'activité SOD de souches de *B. abortus* de virulence variable. Des résultats contradictoires ont été obtenus chez la souris dans l'étude des délétants du gène de la SOD (Bricker *et al.*, 1990). Tatum *et al.* (1992) montrent que la survie du délétant est moindre chez la souris alors que Latimer *et al.* (1992) ne sont pas parvenus à mettre en évidence une différence de survie entre le délétant SOD et la souche sauvage.

La protéine de stress **HtrA** (high-temperature-requirement A) a été identifiée chez *Brucella* sp. car elle est facilement reconnue par des anticorps présents dans le sérum d'animaux hyperinfectés (Roop *et al.*, 1994). Cette sérine protéase périplasmique dégrade les protéines endommagées par le stress dont l'accumulation serait toxique pour la bactérie. La survie chez la souris d'une souche de *Brucella* sp. délété du gène *htrA* a été comparée à une souche de *Brucella* sp. sauvage. La croissance du délétant *htrA* semble retardée mais après 60 jours aucune différence n'est observée entre le mutant et la souche sauvage (Elzer *et al.*, 1994) (Tatum *et al.*, 1994).

Ce mutant *htrA* qui est plus sensible à la destruction par le macrophage (évaluée en culture de macrophages de souris) conduit néanmoins à l'avortement des chèvres gestantes qu'il infecte (tout comme la souche sauvage *B. abortus*) (Elzer *et al.*, 1995).

Afin de déterminer si la recombinaise **RecA** intervient dans la virulence de *Brucella* sp., le gène a été cloné et un mutant a été construit. RecA est une enzyme multifonctionnelle essentielle dans les processus de recombinaison. Elle intervient entre autre dans l'amplification du gène de la toxine du cholera (par *V. cholerae*) et dans la variabilité antigénique de *Neisseria gonorrhoeae*. Une souche *B. abortus* délétée du gène *recA* persiste dans de souris mais à des taux un peu inférieurs à ceux de la souche sauvage. RecA ne jouerait donc pas un rôle crucial dans l'adaptation nécessaire à la survie

dans la souris. La faible réduction de la survie du délétant *in vivo* pourrait être attribuée en partie à une sensibilité accrue aux mutations oxydatives causées par les cellules phagocytaires (Tatum *et al.*, 1992).

L'opéron **purEK** encodant des enzymes intervenant dans le métabolisme des purines a été cloné et séquencé chez *Brucella melitensis* 16M. Les mutants *purE* sont auxotrophes pour les purines (ils ont donc besoin de purines dans leur milieu de croissance) et sont incapables de se répliquer dans des macrophages (dérivés de monocytes humains). Ces constatations *in vitro* faites sur les mutants *purE* laissent supposer qu'ils seraient atténués dans l'animal et l'homme, et seraient ainsi utilisables comme vaccins atténués (Drazek *et al.*, 1995). Ces mutants sont en effet atténués dans la souris (Crawford *et al.*, 1995). Cette atténuation pourrait être due au fait que l'environnement intracellulaire occupé par *Brucella* sp. est pauvre en purines. Une autre hypothèse serait que *Brucella* sp. pourrait inhiber la fusion phagolysosomale en largant des purines, or les mutants *purE* en sont incapables (Drazek *et al.*, 1995).

Ces approches ont conduit à des résultats relativement décevants; le seul mutant significativement atténué était le mutant *purE*. L'étude a priori de différents facteurs n'a pas encore permis de comprendre la pathogénicité de *Brucella* sp.

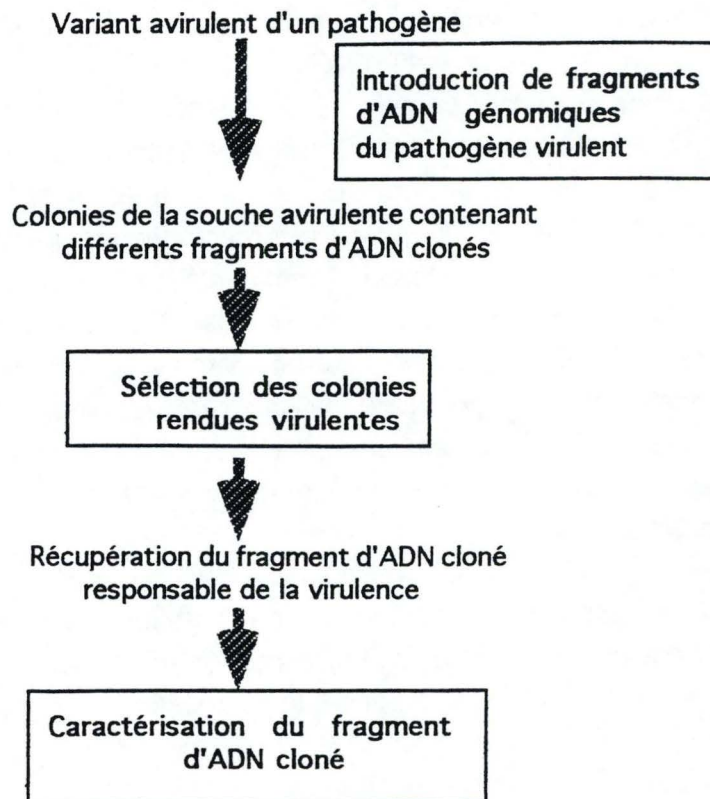
Deux approches impliquant une recherche de virulence moins restrictive ont été appliquées à *Brucella* sp. La première approche est biochimique.

Les protéines synthétisées par *B. abortus* après croissance sur milieu bactériologique ou dans une lignée phagocytaires ont été analysées par électrophorèse à une ou deux dimension par Lin et Ficht (1995). La plupart des protéines détectées sont des **hsp** (heat shock protein), des protéines dont la synthèse accrue est supposée protéger le micro-organisme au cours de condition de stress. Les protéines identifiées par Lin et Ficht sont: la Hsp62, une homologue à la famille des GroEL d'*E. coli*, identifiée par immunoprécipitation avec un anticorps monoclonal spécifique, la DnaK (ou Hsp70) (Cellier *et al.*, 1992) et la Asp24 (acid shock protein). Le gène codant pour la Asp24 a été cloné, et la séquence déduite montre une similarité significative avec des protéines liant le calcium et dont l'expression est induite par la déficience en calcium (Ficht *et al.*, 1995).

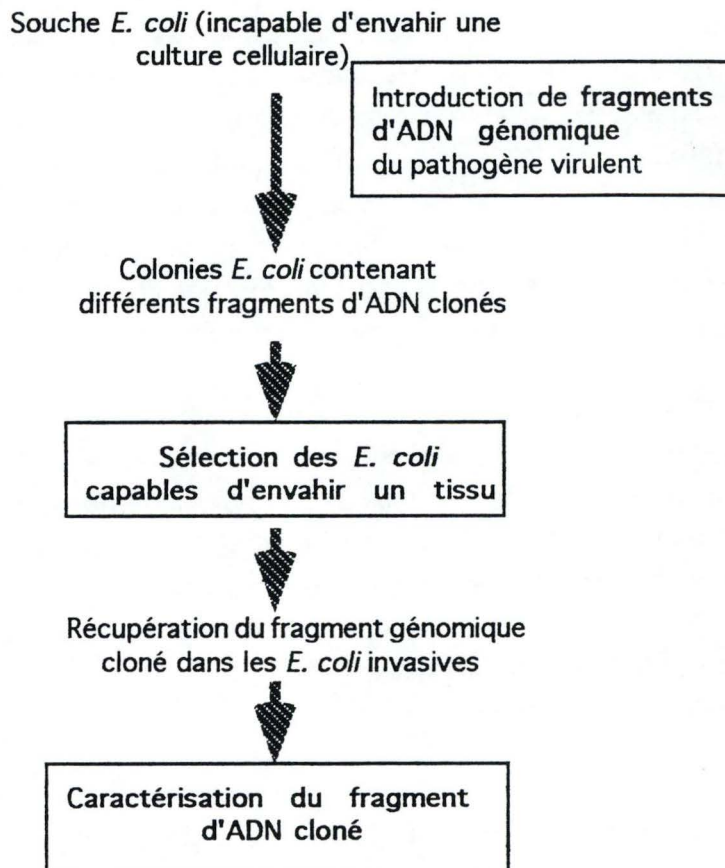
Environ 48 protéines nouvellement synthétisées en macrophages bovins ont été détectées par cette même technique biochimique par Rafie *et al.* (1994). Par contre, 81 protéines exprimées sur un milieu bactériologique ne le sont plus en macrophages. Pour 14 protéines, le taux d'expression augmente et pour 54 autres, il diminue. Chacun des stress appliqués à *Brucella* sp. induit de nouvelles protéines.

La seconde approche est génétique et exploite une banque de mutants de *B. abortus* obtenus par l'insertion du Tn5.

**Figure I.11:** Identification de gènes de virulence par complémentation dans une souche avirulente.



**Figure I.12:** Identification de gènes de virulence par complémentation dans une souche d'*E. coli*.



Après l'analyse de mutants transpositionnels, Ficht *et al.* (1995) ont classés certains mutants en fonction de leur déficience:

- des mutants auxotrophes (c'est-à-dire, inaptes à pousser sur milieu minimum).
- des mutants "rough" extrêmement sensibles au complément du bovin et dont la survie dans la souris est réduite.
- et des mutants hypersensibles au pH acide: résistants au complément comme la souche sauvage mais incapables de croître à pH<5,3. Les multiples changements dans les profils protéiques SDS-PAGE de ces mutants suggèrent qu'ils seraient affectés dans leur régulation génétique.

Pour trois de ces mutants hypersensibles à l'acidité, la région génomique flanquant le Tn5 a été séquencée et montre une homologie avec le gène de la **cytochrome d oxydase** d'*E. coli* et d'autres bactéries. Ces trois mutants sont considérés comme avirulents car ils ne survivent pas en culture de macrophage *in vitro* et ils sont rapidement éliminés de la souris: 3 à 6 semaines après l'infection aucune *Brucella* sp. n'est détectée dans la rate. Un des trois mutants montre une sensibilité accrue aux conditions de stress (l'acidité, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la déficience en nutriments) (Ficht *et al.*, 1995).

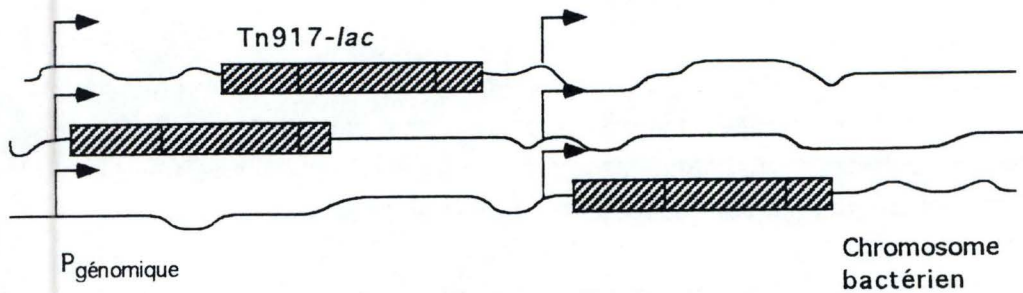
La connaissance des facteurs de virulence est importante pour la compréhension, le traitement et la prévention des maladies infectieuses. La recherche de nouveaux facteurs de virulence chez *Brucella* sp. se fait dans l'espoir de mieux comprendre sa pathogénie et aussi d'obtenir une souche mutante atténuée qui pourrait être utilisée comme vaccin.

### **III. Stratégies génétiques de recherche de gènes de virulence**

Nous présenterons dans ce chapitre quelques stratégies d'identification de gènes de virulence. Ce type d'approche a permis de récents progrès dans l'étude de la pathogénicité bactérienne.

Le premier système génétique que nous résumerons se base sur **le clonage de gènes par complémentation d'une souche avirulente**. Pratiquement, une banque de fragments du génome d'une bactérie virulente clonés dans un plasmide est introduite dans la souche avirulente (figure I.11). La collection de clones de cette souche (contenant chacun un fragment du génome de la souche virulente) est criblée afin d'identifier ceux qui sont devenus virulents. Le plasmide portant le gène responsable de cette virulence est récupéré et le fragment génomique est analysé.

Ce modèle nécessite donc une souche avirulente atténuée du pathogène ainsi qu'un criblage simple du caractère virulent. Un test *in vitro* doit être disponible pour différencier les bactéries virulentes et avirulentes. De plus, les fragments génomiques clonés dans le plasmide doivent être suffisamment longs pour pouvoir restaurer la virulence.



**Figure I.15:** Reproduction schématique de chromosome de 3 clones bactériens d'une banque de mutants transpositionnels.

La détection d'un gène de virulence se base dans cet exemple, sur l'expression de la fusion transcriptionnelle d'un gène bactérien et du gène reporter *lacZ*. Ce gène reporter est placé en aval d'un promoteur bactérien par la transposition du Tn917/*lacZ*.

Une variante de ce système consiste à transformer une souche d'*E. coli* avirulente avec la banque génomique d'une bactérie pathogène (figure I.12). La banque d'*E. coli* est ensuite criblée afin d'identifier les clones d'*E. coli* recombinants présentant un caractère virulent. La limitation de cette stratégie est que les gènes du pathogène doivent s'exprimer dans *E. coli*, l'application du modèle se limite donc souvent aux genres proches d'*E. coli*. Ici aussi le fragment doné doit être suffisamment long pour conférer le caractère virulent et la virulence doit être facilement évaluée par un test *in vitro* (dans l'exemple, le criblage se base sur la capacité d'invasion d'un tissu) (Salyers et Whitt, 1994). L'avantage de ces 2 systèmes est qu'ils permettent la manipulation de souches non virulentes.

Ce dernier principe a été appliqué à *B. abortus*. Le criblage a consisté à passer les clones d'*E. coli* recombinants en macrophage; le critère de virulence testé est donc la survie en macrophages. Au moins 5 fragments d'ADN de *Brucella* permettant la survie intracellulaire des clones d'*E. coli* qui les expriment ont été identifiés (Smith et Ficht, 1990).

Le second système génétique présenté est la création d'**une banque de mutants bactériens par transposition**. Le transposon (figure I.5) est un segment d'ADN pouvant s'intégrer de façon autonome et presque aléatoire dans l'ADN, disruptant le plus souvent les gènes où il s'intègre. Les transposons utilisés comme outils génétiques portent un marqueur de sélection, par exemple le gène encodant la résistance à la kanamycine ( $Km^R$ ).

Fields *et al.* (1986) ont utilisé la mutagenèse par transposition (Tn10) dans le but d'identifier des gènes requis pour la survie intracellulaire de *Salmonella typhimurium*. La survie en macrophage de 10 000 mutants a été étudiée et 112 mutants dont la survie en macrophage était modifiée ont ensuite été testés *in vivo* (dans la souris), où 83 mutants transpositionnels se sont révélés moins virulents. Des gènes de virulence ont ainsi été identifiés chez *S. typhimurium* (dont des gènes de maintenance...). Remarquons qu'il est difficilement envisageable de tester individuellement les 10.000 mutants obtenus par transposition directement dans la souris.

Ce système génétique ne nécessitant pas l'expression des gènes du pathogène chez *E. coli*, son application peut être étendue à une plus grande diversité de pathogènes. Un événement de transposition conduit le plus souvent à la disruption d'un gène et donc à un phénotype mutant à analyser. Cependant les gènes essentiels échappent à cette analyse car une insertion dans un gène essentiel est létale. De plus, l'insertion du transposon dans un opéron peut empêcher la transcription de gènes situés en aval. Signalons encore que la répartition des sites d'insertion d'un transposon ne semble pas être totalement aléatoire ("hot spot" et "cold spot").

Une troisième stratégie génétique consiste à détecter des gènes induits préférentiellement en exploitant **le principe de la fusion transcriptionnelle**. Une fusion

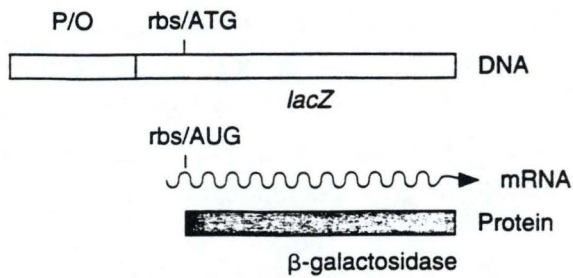


Figure I.13: Exemple d'une fusion transcriptionnelle (d'après Salyers et Whitt, 1994).

Fusion entre un promoteur bactérien (P/O) et un gène reporter (*lacZ*), mettant le gène *lacZ* sans promoteur sous le contrôle du promoteur de la bactérie.

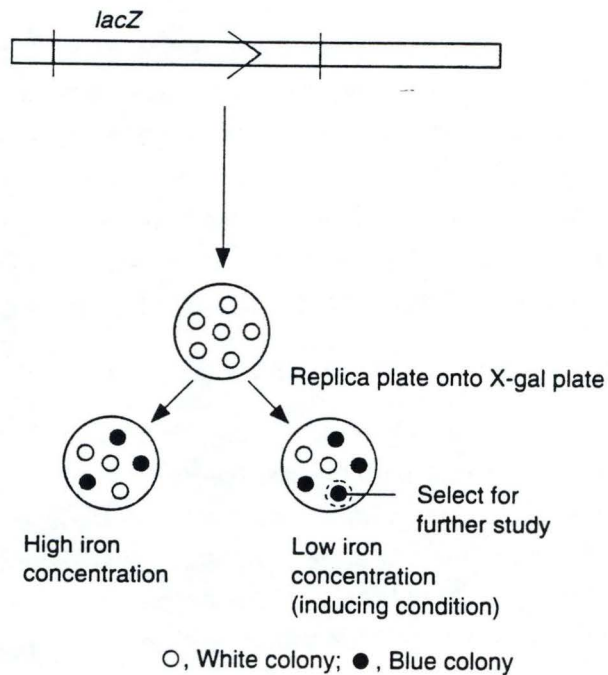


Figure I.14: Exemple de détection de l'induction du gène reporter *lac* (d'après Salyers et Whitt, 1994).

Le gène reporter *lac* encode la β-galactosidase. L'activité de la β-galactosidase est facilement détectée sur un milieu bactériologique contenant un chromogène (l'X-gal) qui dégradé, par l'enzyme, colore en bleu les colonies.

transcriptionnelle est composée d'un gène reporter sans promoteur et d'un fragment d'ADN génomique bactérien contenant un promoteur (figure I.13). Le gène reporter est un gène de structure dépourvu des signaux d'initiation à la transcription (promoteur et opérateur) mais qui contient le site de fixation du ribosome et un ATG (la traduction est donc possible). Il encode une enzyme dont l'activité est facilement mise en évidence (par exemple, le gène *lacZ*: encode la  $\beta$ -galactosidase, *cat*: encode la chloramphénicol acétyl transférase) (figure I.14).

*Listeria monocytogenes* est une bactérie pathogène qui se multiplie dans le cytosol de cellules eucaryotes. Klarsfeld *et al.* (1994) ont construit une banque de 2550 mutants de cette bactérie par insertion du Tn917-*lac* (figure I.15) Le criblage de la banque a consisté à identifier les mutants transpositionnels dont l'activité  $\beta$ -galactosidase est supérieure dans une lignée cellulaire phagocytaire que sur un milieu bactériologique. Cinq clones ont été sélectionnés, ils présentent une induction d'activité  $\beta$ -galactosidase d'un facteur 100 dans un environnement intracellulaire. Les gènes situés en amont du Tn917-*lac* dans ces 5 clones sont donc préférentiellement exprimés lorsque la bactérie infecte une cellule eucaryote.

Durant ce mémoire, l'approche que nous avons testée chez *Brucella melitensis* est basée sur la transposition du miniTn5 ( $Km^R$ ) contenant un gène reporter *lacZ1* ou *cat*. Le gène reporter n'est transcrit que si il est placé par la transposition en aval d'un promoteur de *Brucella* sp. activé dans les conditions testées *in vitro*.

Lors du criblage *in vitro* d'une banque de mutants transpositionnels, il est impossible de reproduire les environnements changeants et complexes que la bactérie rencontre dans l'hôte (*in vivo*). Malgré le choix d'un test *in vitro* représentatif de ce qui se passe *in vivo* (par exemple la survie en macrophage pour *Brucella*), les facteurs considérés comme importants d'après les résultats d'un criblage *in vitro* ne sont peut-être pas exprimés *in vivo*.

Afin de dépasser les limites du test *in vitro* une stratégie d'identification de gènes préférentiellement induits *in vivo* a été développée: **in vivo expression technology, IVET.**

La première application de l'IVET s'est faite chez *S. typhimurium* (Mahan *et al.*, 1993). Les auteurs ont tiré profit d'une souche de *S. typhimurium* auxotrophe pour les purines car mutée dans le gène *purA* (un des gènes de la voie de biosynthèse des purines). Cette souche PurA<sup>-</sup> ne survit pas *in vivo* (dans la souris). Pratiquement, une banque de fragments aléatoires d'ADN génomique de *Salmonella* a été clonée en amont d'un opéron reporter sur le plasmide pIVET1 (figure I.16). L'opéron reporter artificiel contient le gène *purA* sauvage et les gènes *lacZ* et *lacY*, tous dépourvus de leur promoteur. La collection de plasmide pIVET1 obtenue est introduite dans la souche

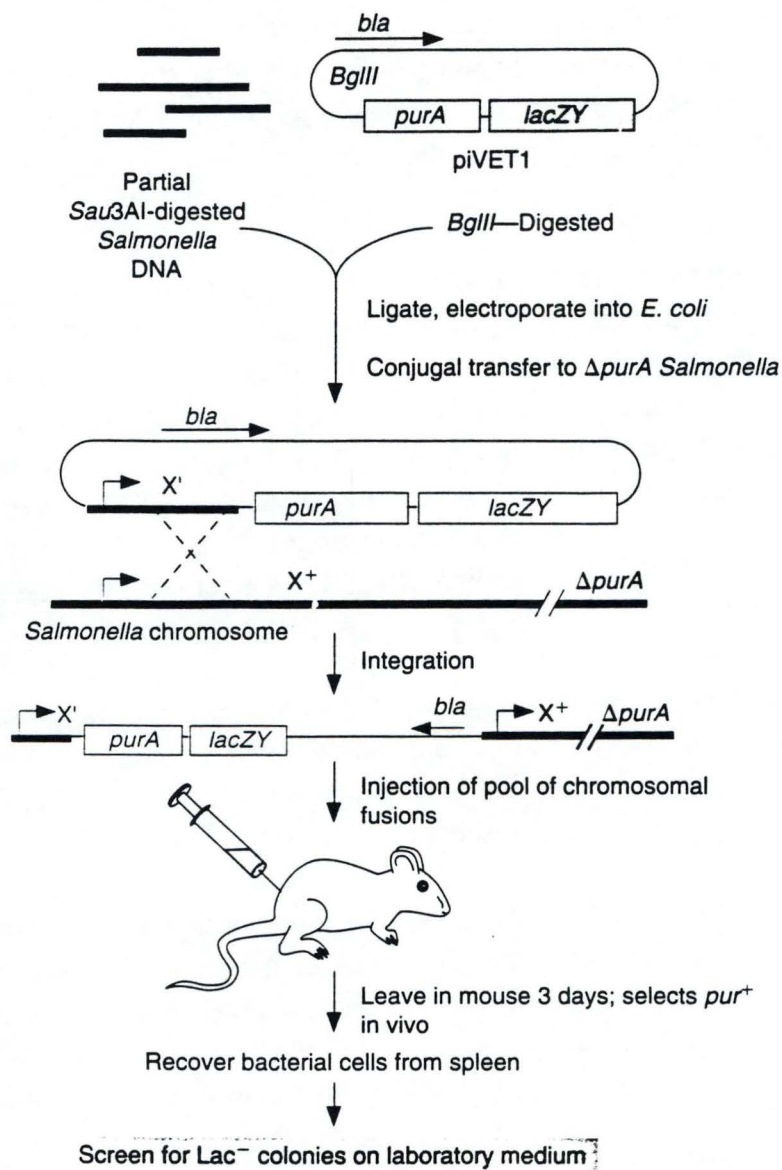


Figure I.16: *In vivo* expression technology IVET (piVET1) (d'après Mahan *et al.*, 1993).

Utilisation du plasmide piVET1 portant l'opéron reporter *purA-lacZ* dans une souche avirulente *PurA*<sup>-</sup> de *S. typhimurium* afin de détecter l'expression de gènes de virulence.

mutante *purA*<sup>-</sup> de *Salmonella*. Le plasmide étant non répliatif dans *Salmonella*, il ne se maintient que suite à une intégration.

L'insertion des gènes reporter *purA-lacZ* dans le génome de la bactérie *PurA*<sup>-</sup> se fait par une recombinaison homologue entre le fragment génomique cloné dans le plasmide et son homologue chromosomique bactérien. Une insertion par recombinaison homologue n'engendre pas la disruption du gène comme la transposition, mais crée une duplication du fragment cloné (sur la figure: X-X'). La banque de clones de *S. typhimurium* ayant intégré *purA-lac* est alors injectée dans la souris (par voie intrapéritonéale). La sélection des clones exprimant les gènes reporter se fait dans la souris où, seules survivent les bactéries *PurA*<sup>+</sup>. Le mutant *PurA*<sup>-</sup> pour survivre dans la souris doit donc être complété par une fusion transcriptionnelle avec le gène *purA*. Ce système génétique permet donc de sélectionner positivement les promoteurs bactériens qui s'expriment dans les tissus de l'hôte (souris) en les fusionnant à une copie du gène *purA* dépourvue de promoteur.

En pratique, les bactéries qui ont survécu sont récupérées dans la rate de la souris après 3 jours d'infection et réinjectées dans une souris pour une seconde sélection. Seules les bactéries exprimant *purA* à un taux suffisamment élevé pour compléter la déficience de la souche parentale *PurA*<sup>-</sup> devraient survivre et se multiplier dans la souris. Cependant une partie de ces bactéries expriment le gène reporter *purA* de façon constitutive. Il est donc encore nécessaire de sélectionner les clones chez lesquels le gène reporter est spécifiquement induit *in vivo*.

L'expression des gènes reporter *purA-lac* est analysée *in vitro* sur les bactéries récupérées de la souris. Un test coloré en milieu bactériologique permet de visualiser l'expression de *lac* et la croissance sur milieu minimum celle de *purA*. Les auteurs rapportent les résultats suivants: lors des tests *in vitro*, 95% des bactéries ont un phénotype *Lac*<sup>+</sup> (et donc *PurA*<sup>+</sup>; expression constitutive du gène reporter) et seuls 5% sont *Lac*<sup>-</sup>. Dans ces clones *Lac*<sup>-</sup> la transcription de *purA* était suffisante pour permettre la survie dans la souris mais en milieu bactériologique cette transcription est trop faible pour être détectée. Ces clones contiennent donc des fusions transcriptionnelles de l'opéron reporter avec des gènes spécifiquement induits *in vivo* (dans la souris).

Les fusions de 15 clones sélectionnés à phénotype *Lac*<sup>-</sup> *in vitro* ont été caractérisées, permettant l'identification de 5 gènes différents appelés *ivi* (pour *in vivo* induced). Deux de ces 5 gènes ne montrent pas d'homologie avec des séquences connues. Des souches mutantes ont été construites pour 3 gènes *ivi* et ces mutants sont atténués dans la souris. Le système IVET a donc permis de sélectionner des gènes importants pour la virulence de *S. typhimurium*.

Plusieurs variantes IVET ont été décrites récemment dont l'une se base sur l'utilisation du plasmide **pIVET8** qui porte les gènes reporter *cat-lac* (Mahan *et al.*, 1995)

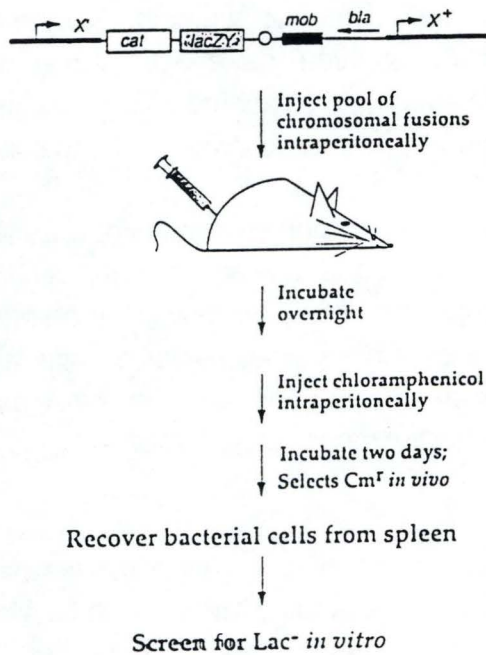


Figure I.17: *In vivo* expression technology IVET (pIVET8) (d'après Mahan *et al.*, 1995).

Le plasmide pIVET8 portant l'opéron reporter *cat-lac* est utilisé chez *S. typhimurium* afin de détecter l'induction de gènes *in vivo*. L'opéron reporter *cat-lac* est inséré en aval d'un promoteur bactérien (créant ainsi une fusion transcriptionnelle) par une recombinaison homologe entre le fragment génomique cloné ( $x^-$ ) et le gène sauvage ( $x^+$ ) du chromosome bactérien.

(figure I.17). L'insertion de l'opéron reporter *cat-lac* (le gène *cat* encode la chloramphénicol acétyl transférase qui confère à la bactérie la résistance au chloramphénicol) dans le chromosome de *S. typhimurium* se fait par simple recombinaison homologue. La sélection des bactéries exprimant *cat-lac* dans la souris s'est faite en injectant du chloramphénicol (Cm) à la souris. Les bactéries deviennent Cm<sup>R</sup> si le promoteur bactérien en amont de l'opéron reporter *cat-lac* est activé dans la souris. Cinq pourcents des clones bactériens Cm<sup>R</sup> dans la souris était Lac<sup>-</sup> *in vitro* (sur milieu bactériologique). Ils contiennent donc, en amont de *cat-lac*, un gène spécifique exprimé *in vivo*. Un de ces gènes *ivi* a été caractérisé, il encode une enzyme dégradant les acides gras.

Ce système ne nécessite donc pas de mutants bactériens atténués (comme PurA<sup>-</sup>), le gène reporter étant ici le gène *cat*. Il permet donc d'étendre la technique IVET à des pathogènes pour lesquels aucune souche atténuée génétiquement caractérisée n'est disponible. Il permet aussi de mieux définir l'environnement bactérien (ici, le compartiment parasité serait riche en acides gras). Mais, l'utilisation d'une sélection par un antibiotique (ici, le chloramphénicol) demande toujours des mises au point empiriques (par exemple déterminer la dose, la fréquence d'injection à l'hôte...).

Il est important de signaler qu'approximativement 50% des gènes *ivi* détectés chez *Salmonella* par l'opéron reporter *cat-lac* sont apparentés aux gènes *ivi* détectés par le système utilisant *purA-lac*. Ces gènes détectés par deux méthodes sont donc certainement des gènes importants. L'autre moitié des gènes *ivi* identifiés par le système *cat-lac* n'ont pas été détectés par le système *purA-lac*, cela prouve qu'une combinaison de diverses sélections permettra de détecter un maximum de gènes préférentiellement induits (Mahan *et al.*, 1994).

Une autre variante de la technique IVET a été appliquée à *Legionella pneumophila* (Rankin *et al.*, 1994). La complémentation de mutants atténués Thy<sup>-</sup> (auxotrophes pour la thymine) incapables de survivre en macrophage a permis de détecter des gènes spécifiquement induits dans les macrophages. L'opéron reporter utilisé est *thy-lacZ*.

L'originalité du système est que les clones dont la fusion transcriptionnelle est active (Thy<sup>+</sup>) sur milieu bactériologique peuvent être contre sélectionnés en présence de triméthoprim (figure I.18). Les clones Thy<sup>+</sup> sont en effet sensibles à cet antibiotique. Dès lors seuls les clones Thy<sup>-</sup>, sur milieu bactériologique, sont cultivés en macrophages. La différence par rapport aux systèmes précédents est que les clones dont l'opéron reporter est contrôlé par un promoteur constitutif sont éliminés avant la sélection en macrophages.

Lorsque l'opéron reporter est sous le contrôle d'un promoteur chromosomique activé spécifiquement dans les macrophages, son expression complémente le phénotype Thy<sup>-</sup>. La culture en macrophage sélectionne donc positivement les bactéries Thy<sup>+</sup>. Si l'induction est spécifique le phénotype bactérien doit être Thy<sup>-</sup> sur milieu bactériologique. La détection

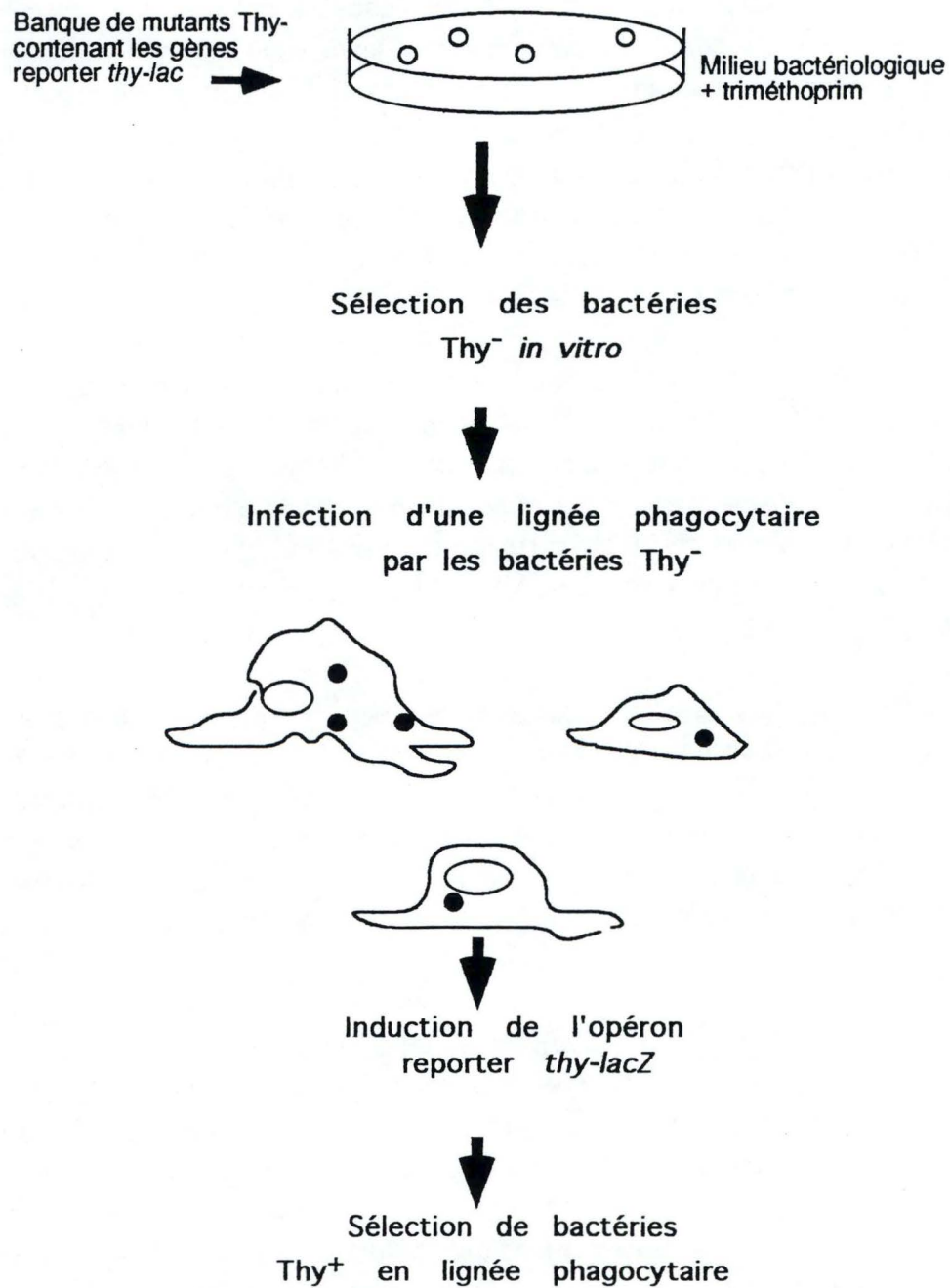


Figure I.18: Détection de l'expression de gènes préférentiellement induits

Utilisation d'une souche bactérienne mutante Thy<sup>-</sup>.

de l'activité  $\beta$ -galactosidase encodée par le gène *lacZ* permet de déterminer le niveau d'expression de la fusion transcriptionnelle *thy-lac* en macrophage ou sur milieu.

L'analyse de 90 clones identifiés par ce système de sélection est en cours et a déjà révélé une séquence homologue à un gène impliqué dans la réponse au stress oxydatif et plusieurs gènes sans similarité significative avec des séquences connues.

Dans les 2 systèmes de sélection *in vivo* décrits précédemment (*purA* et *cat*), la durée d'expression des gènes reporter doit être suffisante pour assurer la survie dans la souris. On peut supposer que dans le cas du gène reporter *cat*, les promoteurs bactériens sélectionnés doivent s'exprimer tout au long du traitement antibiotique. En ce qui concerne la complémentation du mutant *PurA*<sup>-</sup>, seules devraient être sélectionnées les fusions transcriptionnelles qui sont induites à toutes les étapes *in vivo* qui nécessite la synthèse de purines. Les gènes exprimés transitoirement ou à un taux trop faible échapperont donc à ce deux sélections.

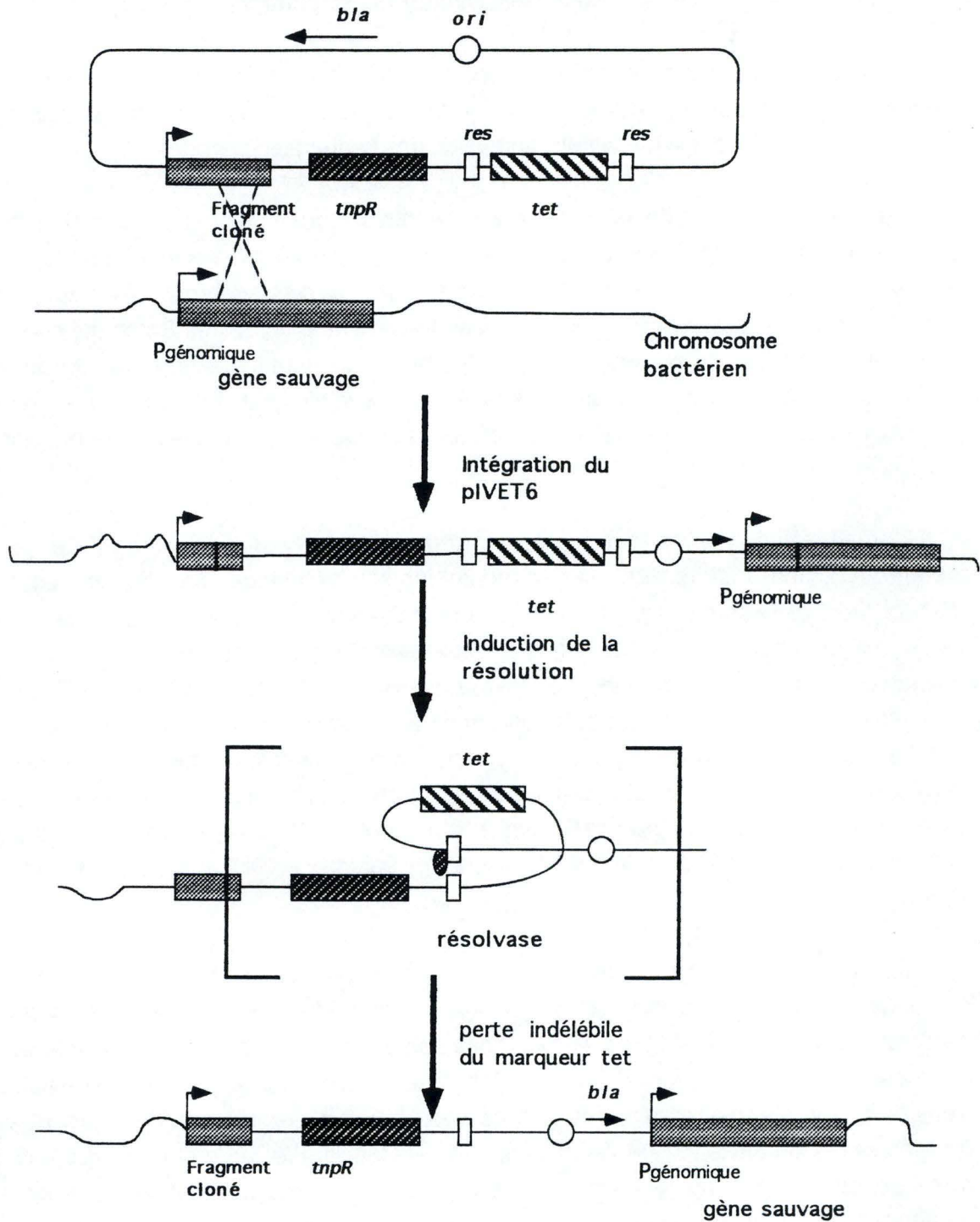
Camilli *et al.* (1994) ont testé un nouveau système de criblage de gènes préférentiellement induits basé sur la recombinaison génétique (figure 1.19). Le gène reporter *tnpR* qu'ils introduisent dans le génome bactérien code pour une résolvasse, c'est-à-dire une recombinase site-spécifique. L'expression du gène reporter contrôlée par un promoteur chromosomique conduit à la synthèse de la résolvasse qui catalyse l'excision d'un gène marqueur, *tet* (encodant la résistance à la tétracycline (*tet*)). Le gène *tet* est en effet flanqué des séquences *res* spécifiquement reconnues par la résolvasse. La perte de la résistance à la *tet* est donc la trace indélébile et transmissible d'une expression du gène bactérien situé en amont de *tnpR*. Les auteurs ont testé ce système en utilisant le promoteur du gène *irgA* de *Vibrio cholerae* dont on sait qu'il est induit sur un milieu pauvre en fer.

Ce dernier système génétique exposé présente plusieurs avantages. La perte du marqueur (*tet*) due à l'expression du promoteur en amont du gène reporter *tnpR* est stable. La détection de la sensibilité à la *tet* peut donc se faire longtemps après l'induction, ce qui n'est pas le cas des autres systèmes. Des gènes dont l'expression *in vivo* n'est que transitoire devraient être détectés par ce système *tnpR-tet* à condition que le taux d'expression soit suffisant. Ce système exposé par Camilli *et al.* permet d'étendre l'IVET à la détection d'autres promoteurs que ceux impliqués dans la relation hôte-bactérie pathogène, par exemple ceux intervenant dans le cycle parasitaire.

Lorsque l'on a détecté l'expression d'un gène par l'une de ces techniques, que reste t-il à faire?

Quelque soit le mode d'insertion du gène reporter, la récupération du fragment génomique situé en amont est facilitée en tirant profit du marqueur de sélection.

Figure I.19: Principe de l'IVET utilisant pour identifier les clones induits le couple résolvasse-marqueur Tet<sup>R</sup>. Le vecteur utilisé est le pIVET6.



L'IVET et ses variantes identifient des unités transcriptionnelles c'est-à-dire des opérons, le gène de l'opéron responsable de la virulence reste donc à déterminer. Pour évaluer l'importance de ce gène dans la virulence, on étudie par exemple l'impact d'une mutation de ce gène sur la survie chez la souris.

Lorsqu'un facteur de virulence a été identifié le lieu et le moment de son expression au cours de l'infection de l'hôte sont encore à établir. Son rôle précis dans la virulence (par exemple un rôle dans l'adhésion) et sa régulation peuvent aussi être étudiés.

Les conditions d'expression de 3 gènes de virulence connus de *L. monocytogenes* ont été analysées en utilisant un système de gène reporter. Le promoteur de chaque gène de virulence a été cloné en amont de l'opéron reporter *cat-lacZ* (dépourvu de promoteur). Chaque construction a été intégrée dans le chromosome par une recombinaison homologue. Les auteurs ont pu comparer l'induction des promoteurs des 3 gènes de virulence dans différentes conditions; en macrophage et sur différents milieux bactériologiques. Ce système a donc permis d'étudier les conditions et les taux d'expression de gènes d'intérêt (Moors et Youngman, 1995).

#### Possibilités et limites des techniques IVET.

Lors d'une sélection *in vivo*, l'animal hôte est pris comme un tout, la connaissance précise de l'environnement bactérien n'est donc pas nécessaire à l'application d'une technique IVET. Les techniques IVET renseignent non seulement sur la façon dont la bactérie survit mais également, sur la nature du compartiment où elle survit.

Des souches mutées dans les gènes de virulence identifiés par l'IVET peuvent conduire à l'obtention de nouveaux vaccins vivants atténués.

En conclusion, afin d'identifier un maximum de gènes intervenant dans la virulence d'un pathogène, plusieurs paramètres peuvent être modifiés créant ainsi des variantes du système IVET à utiliser en combinaison. Différents systèmes gènes reporter-sélection sont disponibles et sont caractérisés par un niveau de sensibilité propre. Différentes voies d'inoculation peuvent être testées. Un autre animal hôte peut-être utilisé comme modèle. De plus, la composition du milieu bactériologique influence les résultats de la discrimination des clones Lac<sup>+</sup> et Lac<sup>-</sup> *in vitro* (Lee, 1994).

Les développements futurs de cette technique aideront certainement à comprendre la complexité de l'adaptation bactérienne durant l'infection de l'hôte.

## BUT DU TRAVAIL

De nombreuses pistes restent à exploiter concernant les relations entre *Brucella* sp. et son hôte et très peu de facteurs ont été clairement définis comme étant impliqués dans la virulence de cette bactérie.

Le but de ce travail se résume en trois objectifs.

L'objectif prioritaire est de créer une banque de mutants transpositionnels de *B. melitensis* 16M. Cette étape pourra être réalisée par l'insertion aléatoire d'un transposon contenant un gène reporter. Celui-ci sera placé par la transposition sous le contrôle d'un promoteur de *B. melitensis*.

Le second objectif sera de valider la fonctionnalité de cette banque de mutants transpositionnels. Il s'agira de montrer que l'expression du gène reporter peut être induite préférentiellement chez des clones de la banque, en fonction des conditions de culture *in vitro*.

Le dernier objectif vise à montrer qu'il est possible d'isoler rapidement l'ADN situé en amont du transposon dans un clone particulier, en vue d'identifier le promoteur de *B. melitensis* contrôlant l'expression du gène reporter.

La réalisation de ces trois objectifs permettra d'utiliser ultérieurement les outils génétiques que nous aurons développés en vue d'identifier des gènes de virulence de *B. melitensis*. Les gènes spécifiquement induits dans différentes conditions *in vitro* ou au cours d'une infection de macrophages ou encore dans la souris, seront recherchés.

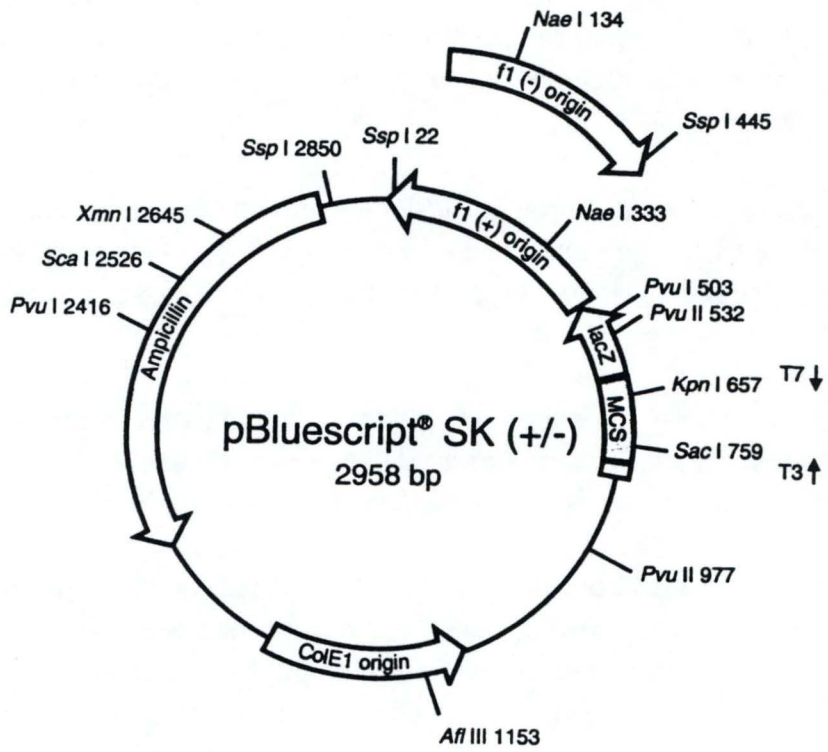


Figure II.1: Carte plasmidique du pBluescript (Stratagène).

# MATÉRIEL ET MÉTHODES

## I. Souches bactériennes et plasmides

### I.1. Souches bactériennes

#### *E. coli* XL1-blue

Quelques particularités intéressantes du génotype de cette souche.

recA1: réduit la recombinaison au millième de son taux normal, minimisant ainsi la recombinaison entre ADN endogène et exogène.

endA1: améliore le rendement et la qualité des préparations d'ADN plasmidique à petite échelle en diminuant le taux d'endonucléases.

La souche XL1-blue délétée au niveau de l'opéron lactose ( $\Delta$ lac), est incapable de métaboliser le lactose. L'épisome F' codant pour des pili sexuels présents en surface de la bactérie porte les caractères suivant:

Tn10: contient un marqueur de résistance à la tétracycline ( $Tet^R$ ) permettant de sélectionner les bactéries contenant l'épisome F'.

#### *E. coli* S17 $\lambda$ pir

La souche d'*E. coli* S17  $\lambda$ pir (Simon *et al.*, 1983) est résistante à la streptomycine ( $Sm^R$ ), spectinomycine ( $Sp^R$ ) et la timéthoprim ( $Tp^R$ ). Cette souche d'*E. coli* possède notamment les caractéristiques d'intérêt suivantes,

$\lambda$ pir: la bactérie produit la protéine  $\pi$  qui permet la réplication de tout plasmide à origine de réplication ori R6K.

RP4+: l'intégration du plasmide RP4 dans le chromosome bactérien permet le transfert d'ADN de la bactérie vers une bactérie receveuse.

#### *Brucella* sp.

La souche de *B. melitensis* 16M avec laquelle nous avons travaillé est représentative de l'espèce *B. melitensis* :

*B. melitensis* biovar 1 souche 16M  $Nal^R$  est une souche de phénotype "S", l'agglutination se produit avec un anti-sérum M. La souche est un mutant spontané résistant à l'acide nalidixique ( $Nal^R$ ).

Les autres souches utilisées sont:

*B. abortus* biovar 1 souche 544, souche lisse.

*B. melitensis* biovar 1 souche Rev.1, souche lisse.

### I.2. Plasmides bactériens

#### pBluescript

pBluescript (BS) (Stratagene) (figure II.1) est un phagemide, c'est-à-dire un hybride entre un plasmide et un phage, de 2,964 kb. Il porte une origine de réplication pour *E. coli* (colE1 ORI) et l'origine de réplication phagienne f1. Il porte aussi le gène *bla* encodant la résistance à l'ampicilline.

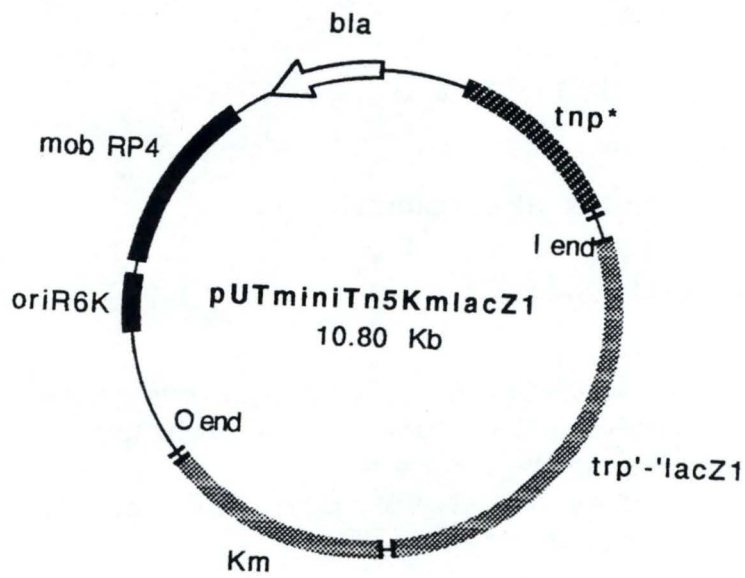


Figure II.2: Carte plasmidique du pUTminiTn5KmlacZ1 (d'après de Lorenzo *et al.*, 1990).

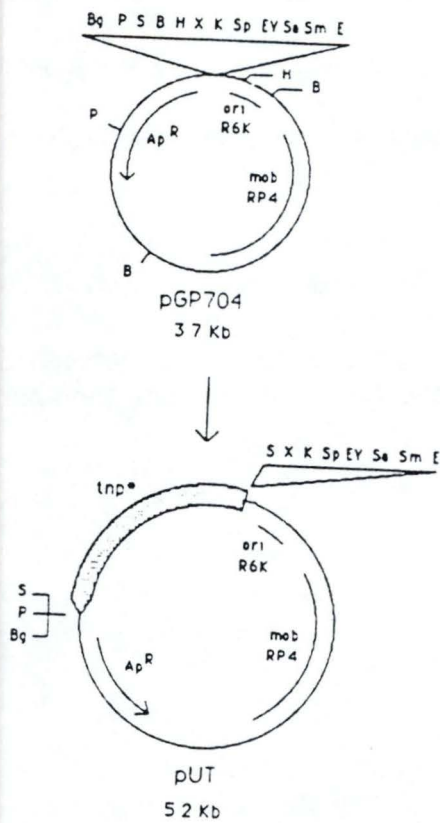


Figure II.3: Carte des plasmides pGP704 et pUT4K (d'après Herrero *et al.*, 1990).

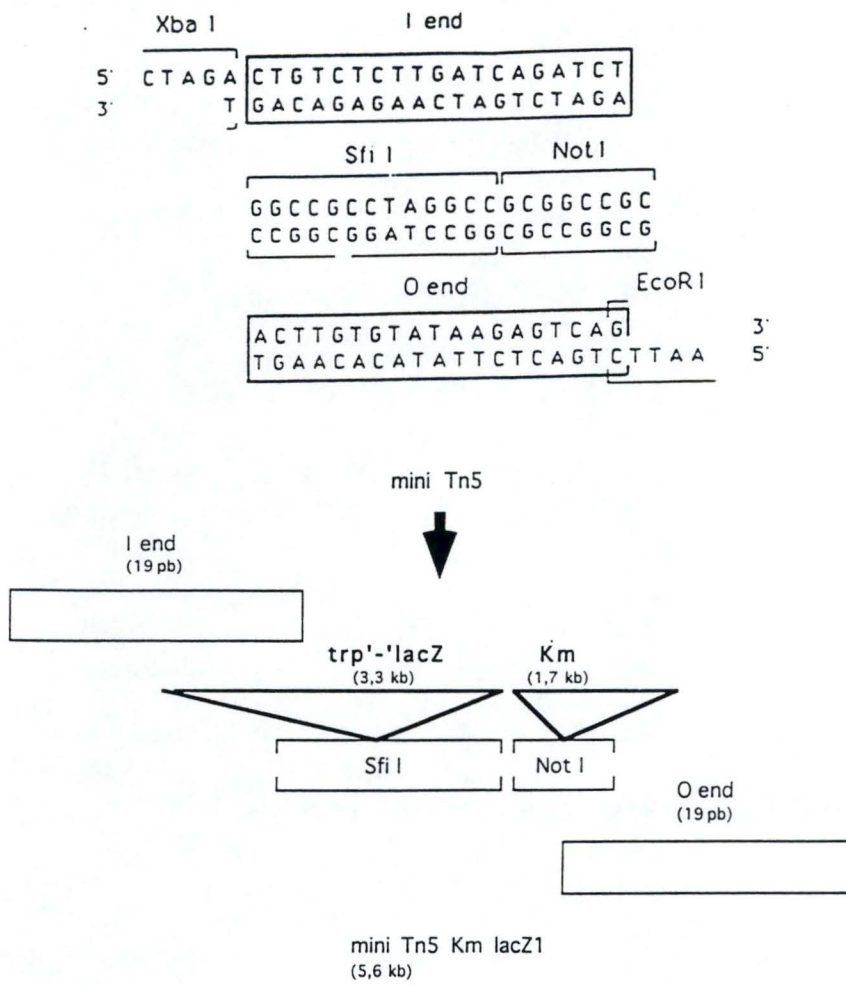


Figure II.4: Description du transposon miniTn5KmlacZ1 (d'après de Lorenzo *et al.*, 1990).

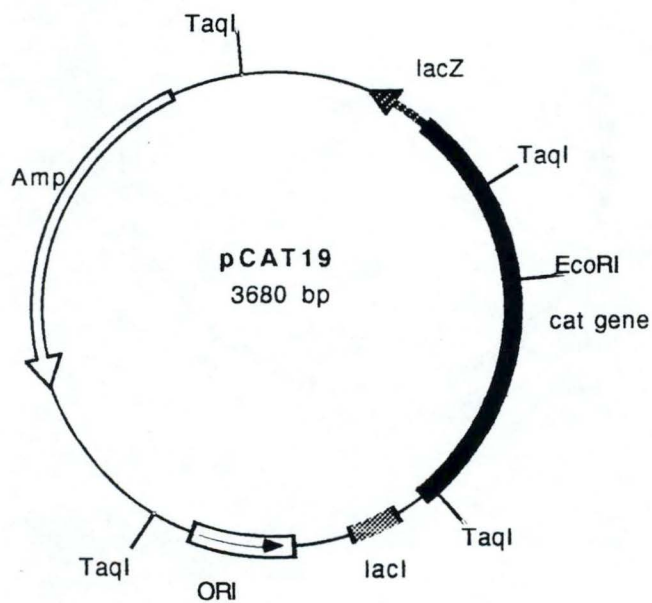


Figure II.5: Carte plasmidique du pCAT19 (Claiborne Fuqua, 1992).

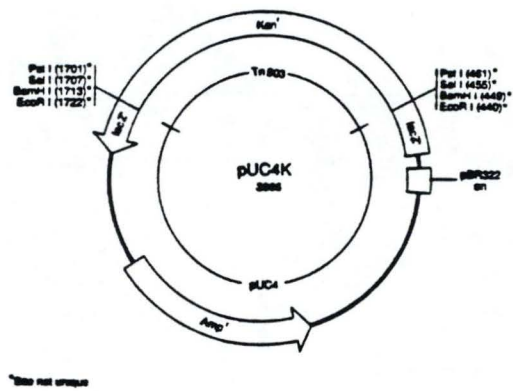


Figure II.6: Carte plasmidique du pUC4K (Pharmacia).

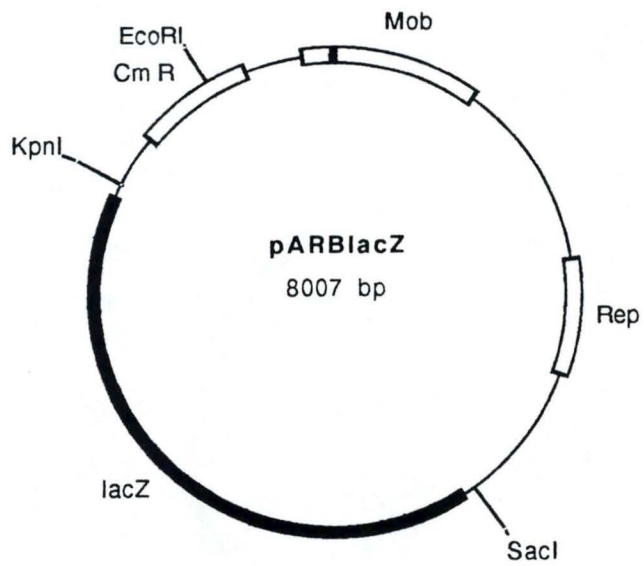


Figure II.7: Carte plasmidique du pARBlacZ.

### pUT mini Tn5 Km lacZ1

Ce plasmide est un vecteur portant un dérivé du Tn5 qui crée des insertions aléatoires mutagénéisantes dans le chromosome de bactéries gram-négatives (de Lorenzo *et al.*, 1990) (figure II.2). Ce vecteur de 10,1 kb est un dérivé du plasmide pGP704 (3,7 kb) (figure II.3). Le plasmide pGP704 contient les éléments suivant:

- bla: gène de résistance à l'ampicilline encodant la  $\beta$ -lactamase qui permet la sélection des bactéries ayant reçu le plasmide.

- un site multiple de clonage où sont localisés 12 sites de restriction uniques.

- ori R6K: une origine de répllication dépendante de la protéine  $\pi$ .

Un plasmide portant cette origine de répllication R6K est suicide chez *Brucella sp.* sp. (Sangari et Agüero, 1991).

- mob RP4: l'origine de transfert (ori T) du plasmide RP4, qui permet la mobilisation du vecteur pour la conjugaison.

Le plasmide pUT (5,2 kb) a été obtenu par l'insertion du gène de la transposase du Tn5 (gène *tnp\** de 1,5 kb) au site unique de restriction *Sal* I du plasmide pGP704.

Le dérivé du Tn5, le mini Tn5 Km a été intégré entre les sites de restriction *Xba* I et *Eco*R I du plasmide pUT, créant ainsi le vecteur pUT mini Tn5 Km lacZ1.

Les séquences d'insertion du transposon Tn5 (IS50) ont réduites à des séquences de 19 pb (I end et O end) (figure II.4) qui permettent la transposition du mini Tn5 (mais pas la transposition du reste du plasmide). Le mini Tn5 possède entre ses "end" les sites de restriction, *Sfi* I et *Not* I.

Dans le plasmide pUTminiTn5KmlacZ1 le gène *lac* Z1 est inséré en *Sfi* I et le gène Km est inséré en *Not* I. Le gène reporter sans promoteur *lac* Z1 (3,3 kb) code pour la  $\beta$ -galactosidase. Le gène Km (1,6 kb) encode la résistance à la kanamicine, ce qui permet de sélectionner les bactéries possédant le mini Tn5.

Le plasmide pUT mini Tn5 Km lac Z1 peut être transféré d'une bactérie donneuse (RP4<sup>+</sup>) vers une bactérie receveuse où le mini Tn5 du plasmide transpose et crée des insertions aléatoires du gène reporter (*lac* Z1) dans le génome bactérien. Le plasmide utilisé doit être suicide (non répllicatif) dans la souche receveuse afin que les clones Km<sup>R</sup> sélectionnés soient le résultat d'une transposition (ou d'une co-intégration). Le gène encodant la transposase étant à l'extérieur du transposon, il est perdu lors de la transposition et assure ainsi une transposition unique dans le génome.

La transcription du gène reporter *lac* Z1 sans promoteur ne se fera donc que si celui-ci est transposé en aval d'un promoteur génomique bactérien activé.

### pCAT19

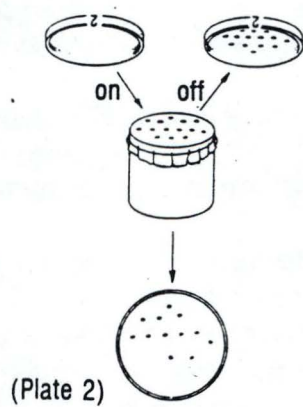
Ce plasmide de 3,6 kb est un dérivé du pUC19 (2,69 kb) (Claiborne Fuqua, 1992; figure II.5) qui contient le gène *cat* encodant la résistance au chloramphénicol et provenant du plasmide pBR325.

### pUC4K

Ce plasmide de 3914 pb (Pharmacia, figure II.6) porte un gène encodant la résistance à la kanamycine (Kan<sup>r</sup>). Le gène Kan<sup>r</sup> est bordé de part et d'autre par 4 sites de restriction.

### pARBlacZ

Ce plasmide est un dérivé du pBBR1MCS (Kovach *et al.*, 1994) qui contient le gène *lacZ* dépourvu de son promoteur (figure II.7). Il se réplique dans *Brucella sp.* et dans *E. coli*, notamment.



**Figure II.8:** Méthode de réplique sur velours.

Cette méthode est utilisée lors des criblages d'un grand nombre de clones bactériens (d'après Gerhardt, 1994).

## II. Milieux de culture

### Milieu Luria Bertani (LB)

-Hydrolysate de caséine (peptone) 1 g/100 ml.

-NaCl 0,5 g/100 ml.

-Yeast extract 0,5 g/100 ml.

Le milieu est autoclavé (20 minutes à 120°C). Les solutions stock d'additifs sont reprises dans le tableau I.1.

Le milieu LB solide contient 2% d'Agar. Ce milieu autoclavé et refroidi à 55°C est additionné des antibiotiques ou autres additifs mentionnés et coulé dans des boîtes de Pétri.

### Milieu TSAYE

-Tryptic soy agar 40 g/l.

-Yeast extract 1 g/100 ml.

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

### Milieu sélectif solide en bicouche

Afin de permettre un début de croissance bactérienne sans pression sélective antibiotique, le milieu LB solide est coulé en boîte de Pétri en deux couches. La couche inférieure (constituée de la moitié du volume de milieu) contient l'antibiotique de sélection alors que la couche supérieure n'en contient pas. La seconde couche est coulée peu avant l'ensemencement du milieu. L'antibiotique diffusera progressivement du bas vers le haut du milieu au cours de l'incubation.

### Technique de la réplique sur velours

Cette technique (figure II.8) de dépôt de cellules sur boîte de Pétri permet de répliquer un nombre important de colonies par répliques. Le milieu solide (en boîte de Pétri) portant des colonies est amené au contact d'un velours stérile de sorte que des cellules de chaque colonies s'y déposent. Un contact entre ce velours et un autre milieu solide coulé en boîte de Pétri, entraîne le dépôt de cellules sur le milieu. L'ordre des colonies reste identique sur les deux boîtes de Pétri.

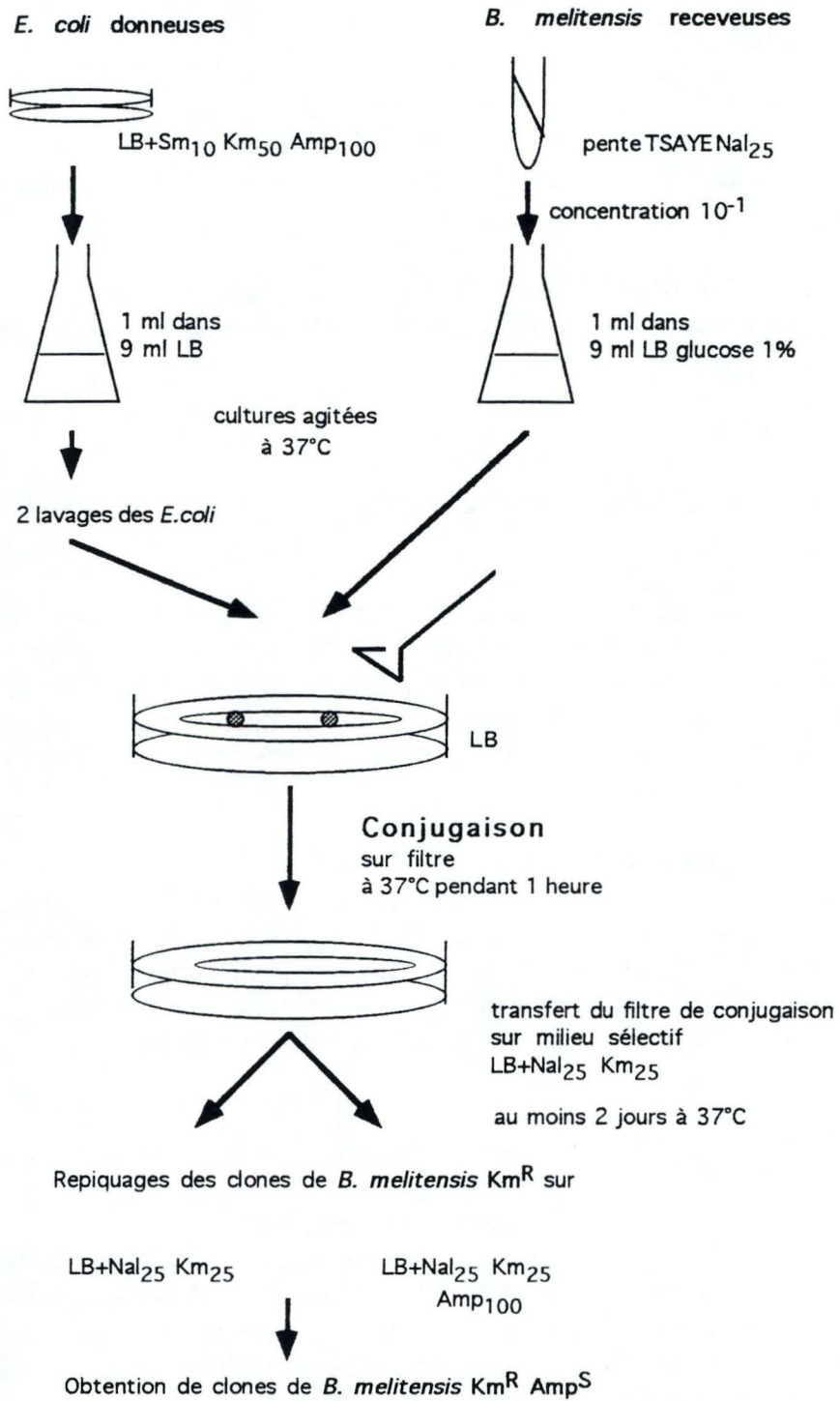
## III. Identification de *Brucella sp.* par agglutination sur lame

Malgré une grande conservation des antigènes de surface entre les espèces du genre *Brucella*, certains antigènes du LPS lisse permettent de différencier des souches de *Brucella sp.* L'antigène de surface A est prédominant chez certaines souches de l'espèce *B. abortus* (dont 544) tandis que l'antigène M est prédominant chez certaines souches de l'espèce *B. melitensis* (dont 16M et Rev.1). Des sérums spécifiques de l'épétope A et des sérums spécifiques de l'antigène sont disponibles (*Brucella* agglutinating sera, Murex Diagnostics). L'identification de l'antigène dominant à la surface d'un isolat donné, et donc son typage, se fait par observation de l'agglutination bactérienne provoquée par un sérum anti-A ou anti-M.

### Méthode

-Une goutte de chaque sérum adéquatement dilué dans du NaCl 0,9% est placée sur une lame porte-objet.

Figure II.9: Conjugaison



- Amener avec une pipette boutonnée les *Brucella sp.* à tester, déposer les bactéries à proximité de la goutte de sérum.
- Homogénéiser doucement afin de ne pas surcharger en bactéries le sérum.
- Placer la lame dans une boîte de Pétri et après 20 secondes examiner au binoculaire pour visualiser l'agglutination.

#### IV. Conjugaison

La conjugaison entre bactéries gram-négatives est un transfert de matériel génétique où la bactérie donneuse transfère un plasmide conjugatif vers la bactérie receveuse. La conjugaison se fait grâce à un contact entre bactéries. La souche donneuse possède le plasmide RP4 intégré dans son chromosome. Ce plasmide code pour les protéines nécessaires au transfert conjugatif. Le transfert conjugatif commence à un site d'origine de transfert reconnu par la machinerie de transfert sur le plasmide conjugatif.

Les plasmides transférés sont:

- pUT mini Tn5 Km lacZ1 (Amp<sup>R</sup>)
- pUT mini Tn5 Km cat (Amp<sup>R</sup>)

Les bactéries utilisées sont:

- E. coli* S17  $\lambda$ pir: Sm<sup>R</sup>, Sp<sup>R</sup>, T<sub>p</sub><sup>R</sup>
- Brucella sp. melitensis* 16M NaI<sup>R</sup>

L'acide nalidixique est utilisé après la conjugaison pour sélectionner les *Brucella sp.* et éliminer les *E. coli* donneuses qui sont sensibles.

Les témoins:

- Les bactéries *E. coli* S17  $\lambda$ pir étalées sur un milieu sélectif contenant de l'acide nalidixique, ne montrent pas de résistance. Contrairement aux bactéries *B. melitensis*.
- Aucune colonies de *B. melitensis* spontanément résistante à la kanamycine et l'ampicilline n'est détectée.

#### Méthode (figure II.9)

-Préparer une culture d'*E. coli* S17  $\lambda$ pir (RP4<sup>+</sup>) donneuses (contenant le plasmide conjugatif pUT mini Tn5 Km lacZ1 ou cat) sur boîtes LB Sm<sub>10</sub> Amp<sub>100</sub> Km<sub>50</sub> et une culture de *B. melitensis* 16M. receveuses (NaI<sup>R</sup>) sur pente TSAYE NaI<sub>25</sub>.

-Déposer 3 ml de NaCl 0,9% sur la pente de *B. melitensis*, râcler, transférer dans un tube contenant 7 ml de NaCl 0,9%, homogénéiser.

-Prélever 1 ml et le transférer dans 9 ml de NaCl 0,9% (dilution 1/10).

-Dans un erlen de 100 mlensemencer 9 ml de LB-glucose 1% avec 1 ml de dilution 1/10 de *B. melitensis* (dilution 1/100).

-Ensemencer 100 ml de LB+Sm<sub>10</sub> Amp<sub>100</sub> Km<sub>50</sub> avec une colonie de la souche *E. coli* donneuse.

-Incuber les cultures de *B. melitensis* et d'*E. coli* 24 heures à 37°C sous agitation.

-Laver les bactéries *E. coli* S17 pour éliminer les antibiotiques du milieu de culture:

-Centrifuger les 100 ml de culture pendant 15 minutes à 3000 tours/min

-Éliminer le surnageant et resuspendre le culot bactérien dans 100 ml de LB (sans antibiotique).

-Centrifuger une seconde fois et resuspendre le culot dans 10 ml de LB (sans antibiotique).

Nom	Abréviation	Concentration des solutions stock	Concentration finale
Acide nalidixique	Nal	25 mg/ml	25 µg/ml
Kanamycine	Km	25 mg/ml	25 µg/ml
Ampicilline	Amp	100 mg/ml	100 µg/ml
Streptomycine	Sm	10 mg/ml	5 µg/ml
Tétracycline	Tet	12,5 mg/ml	1,25 µg/ml
Chloramphénicol	Cm	30 mg/ml (dilué dans de l'éthanol)	3, 10 ou 30 µg/ml
Isopropyl-β-D-thiogalactoside	IPTG	0,2 g/ml	0,02 g/ml
5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl-β-D-galactopyruronide	X-gal	20 mg/ml	20 µg/ml
Glucose	glu	20%	1%

Tableau II.1: Solutions stock des additifs.

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

-Avec une pipette pasteur boutonnée, mélanger et étaler les gouttes de bactéries sur la totalité du filtre.

-Laisser incuber 1 heure à 37°C.

-Transférer le filtre sur une boîte contenant un milieu sélectif LB+Nal25 Km25.

-Incuber quelques jours à 37°C. Les colonies de *B. melitensis* apparaissent sur le filtre après environ 3 jours.

-Repiquer au cure-dent les colonies de *B. melitensis* sur les milieux sélectifs, LB+Nal25 Km25 et LB+Nal25 Km25 Amp100 afin d'identifier les transposants.

## V. Techniques d'ADN recombinant

### V.1. Extraction d'ADN plasmidique

#### V.1.1. Minipréparation d'ADN plasmidique d'*E.coli*

Une miniprep comprend 5 étapes: la lyse alcaline des bactéries, la précipitation des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, le lavage de l'ADN plasmidique et enfin sa resuspension.

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

-Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.

-Centrifuger 1.5 ml de la culture dans un eppendorf (pendant 5 minutes à 12 500 rpm) et éliminer le milieu de culture.

-Resuspendre ce culot dans 300 µl de P1 (avec RNase A)

-Ajouter 300 µl de P2 et mélanger doucement, incuber 5 minutes à température ambiante.

-Ajouter 300 µl de P3 et mélanger doucement, incuber 10 minutes sur glace.

-Centrifuger 15 minutes à 4°C (à 12500 rpm) et récupérer le surnageant.

-Précipiter l'ADN en ajoutant 0.7 volume d'isopropanol, homogénéiser.

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

-Laver l'ADN, c'est-à-dire ajouter 300 µl d'éthanol 70% et centrifuger 5 minutes à 12500 rpm à 4°C. Eliminer prudemment l'éthanol.

-Sécher sous vide quelques minutes.

-Resuspendre dans 20 à 50 µl d'H<sub>2</sub>O distillée stérile (suivant le nombre de copies du plasmide récupéré).

#### Solutions et tampons:

-Tampon P1, pH 8.0:

RNase A 100 µg/ml

Tris-HCl 50 mM

EDTA 10 mM (stocké à 4°C)

-Tampon P2:

NaOH 200 mM

SDS 1% (stocké à température ambiante)

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

-Solution d'éthanol 70%(stocké à -20°C)

### V.1.2. Midipréparation d'ADN plasmidique d'*E.coli*

Cette technique comprend l'utilisation du kit Nucleobond et d'une colonne Nucleobond AX 100 échangeuse d'anions qui permet de préparer l'ADN plasmidique en éliminant les protéines, l'ARN et l'ADN génomique.

-Préculture: ensemercer 5 ml de milieu liquide (LB+antibiotiques) avec une colonie bactérienne.

-Ensemencer 25 à 100 ml de ce même milieu liquide avec la préculture.

-Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.

-Centrifuger la culture à 3000 rpm pendant 15 minutes, éliminer le surnageant.

-Resuspendre le culot dans 4 ml de P1.

-Ajouter 4 ml de P2 et mélanger doucement, laisser 5 minutes à température ambiante.

-Ajouter 4 ml de P3 et agiter doucement, laisser 15 minutes sur glace.

-Centrifuger 4 à 10 minutes à 12000 rpm (Sorvall, rotor SS34), à 4°C et récupérer le surnageant

-Equilibrer la colonne avec 2 ml de tampon N2.

-Déposer le surnageant sur la colonne équilibrée et laisser pénétrer.

-Laver la colonne avec 2 X 4 ml de tampon N3.

-Eluer l'ADN plasmidique avec 2 ml de tampon N5 et aliquoter par 500 µl en eppendorf.

-Précipiter l'ADN avec 0.7 volume d'isopropanol.

-Laisser 10 minutes sur table et ensuite centrifuger 15 minutes à température ambiante à 12500 rpm. Eliminer le surnageant.

-Laver à l'éthanol 70%, c'est-à-dire ajouter 1 ml d'éthanol 70% et centrifuger 5 minutes à 4°C. Eliminer le surnageant.

-Sécher le culot quelques minutes sous vide.

-Resuspendre dans 50 à 100 µl d'H<sub>2</sub>O distillée stérile.

#### Solutions et tampons

-La composition des tampons P1, P2 et P3 est présentée au point Minipréparation d'ADN plasmidique.

-Tampon d'éliquibration N2:

NaCl 50 mM

MOPS (3-N-Morpholinopropan-sulfonic acid) 50 mM

Ethanol 15%

Triton X-100 0,15%

-Tampon de lavage N3, pH 7,0:

NaCl 1 M

MOPS 50 mM

Ethanol 15%

-Tampon d'élution N5, pH 8,2:

NaCl 1,25 M

Tris-HCl 50 mM

Ethanol 15%

### V.1.3. Isolement d'ADN plasmidique de *Brucella* sp.

- Culture de la souche de *Brucella* sp. sur une pente TSAYE (24 heures à 37°C).
- Déposer 3 ml d'eau distillée sur la pente, râcler, transférer dans un tube et centrifuger 30 minutes à 3000 rpm.
- Éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 200 µl de tampon A.
- Transférer la totalité de la suspension dans un eppendorf et ajouter 400 µl de tampon de lyse. Mélanger lentement en retournant 15 à 20 fois.
- Laisser reposer 10 minutes à température ambiante.
- Neutraliser avec 300 µl de tampon B en agitant doucement 15 à 20 fois.
- Maintenir le tube dans la glace pendant 5 minutes.
- Centrifuger pendant 6 minutes à 4°C (vitesse maximale en minifuge).
- Récupérer le surnageant; Ajouter 1 volume de phénol et agiter fortement.
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm, à 4°C (en minifuge).
- Prélever la phase aqueuse (supérieure).
- Précipiter avec 1 ml d'éthanol 100 %, retourner 15 à 20 fois et laisser 5 minutes à -70°C.
- Centrifuger à 13500 rpm pendant 15 minutes (à 4°C).
- Laver à l'éthanol 70 %.
- Éliminer l'éthanol et sécher sous vide.
- Resuspendre dans 40 µl d'eau distillée stérile.

#### Solutions et tampons:

-Tampon A:

Solution tampon stock à diluer 10 fois:

Tris-HCl 400 mM pH 8.0

EDTA Disodique 20 mM

-Tampon de lyse:

Tris-base 100 mM

Ajouter 4 g de SDS

Pour l'usage ajouter un égal volume de NaOH 0.4 N

-Tampon B:

3 M Acétate de sodium, pH 5.5

### V.2. Restriction de l'ADN

Le clivage de l'ADN bicaténaire à des sites précis se fait par des endonucléases de restriction qui reconnaissent de courtes séquences d'ADN.

En pratique, la réaction se fait par incubation de l'ADN avec la ou les enzymes de restriction.

Dans le milieu:

- x µl d'ADN à restreindre en suspension dans de l'eau distillée.
- Tampon de restriction 10 x: 1/10 du volume final (tampon commercial fourni avec l'enzyme).
- Enzyme de restriction: au maximum 1/10 du volume final. Entre 2 et 10 unités d'enzyme par µg d'ADN (en fonction de la pureté de l'ADN).

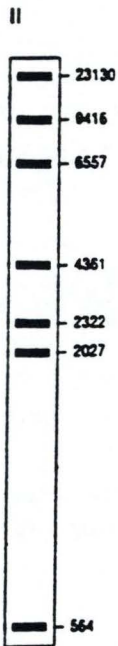


Figure II.10: Taille des fragments du marqueur de taille ADN du phage  $\lambda$  restreint par *Hind* III.

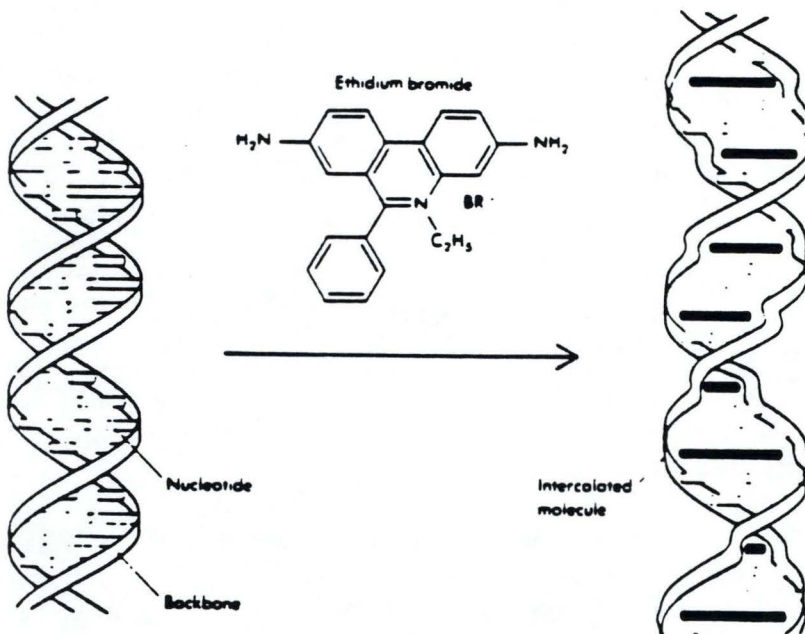


Figure II.11: Représentation schématique montrant les molécules de bromure d'éthidium, s'intercalant entre les bases azotées de l'ADN.

- Eau distillée stérile pour atteindre le volume final.
- Incuber le mélange de restriction 1 heure 30 à la température optimale pour l'enzyme (souvent 37°C).
- La réaction peut aussi être stoppée (enzyme inactivée) soit par chauffage (15 à 20 minutes à 65°C) si l'enzyme est thermosensible, soit par une extraction phénol/chloroforme.

### V.3.Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN en fonction de leur taille. Des gels à pourcentage élevé en agarose (par exemple 2%) permettront une séparation optimale des fragments de petite taille (100-500 pb).

La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Nous avons utilisé comme marqueurs de taille l'ADN du phage  $\lambda$  restreint par *Hind* III (figure II.10).

Les fragments sont alors visualisés au moyen du bromure d'éthidium. Celui-ci se lie à l'ADN bicaténaire en s'intercalant entre les bases de la double hélice (figure II.11). Etant fluorescente, le bromure d'éthidium 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 marqueurs de taille, on peut estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison de l'intensité de la fluorescence.

#### Méthode

- Porter à ébullition un volume approprié de tampon TAE additionner d'agarose, jusqu'à obtention d'une solution limpide.
- Quand la solution est refroidie (aux environs de 50°), ajouter 2  $\mu$ l de BrEth (2  $\mu$ g/ml) la couler sur le support *ad hoc* muni d'un peigne.
- Immerger le gel dans une cuve d'électrophorèse remplie de TAE, auquel on a ajouté quelques  $\mu$ l d'une solution de bromure d'éthidium.
- Déposer les échantillons dans les puits et effectuer la migration au voltage désiré.
- Visualiser le gel sous UV (transilluminateur longueur d'onde à 302 nm).

#### Solutions, tampons et fournitures:

- Solution de bromure d'éthidium: 2 $\mu$ g/ml.
- Solution d'alourdisseur:
  - glycérol 50%
  - Na<sub>2</sub>EDTA 100 mM
  - SDS 1%
  - Bleu de bromophénol 0.1%
- Tampon TAE (50 fois concentré)
  - Tris-HCl, pH 8.0, 40 mM
  - EDTA 0.002 M
  - Acide acétique glacial 57.1 ml/litre

#### **V.4. Extraction d'ADN d'un gel d'agarose**

On peut extraire un fragment d'ADN d'un gel d'agarose préparatif et le purifier grâce au kit "Gene Clean II <sup>TM</sup>" (BIO 101).

Il utilise la propriété que possède une résine (Glass-milk) formée de billes de silicate, d'adsorber spécifiquement l'ADN dans certaines conditions de salinité.

##### **Méthode:**

Nous avons utilisé le kit "Gene Clean II <sup>TM</sup>" et suivi le protocole préconisé par la firme.

- Séparer les fragments d'ADN restreints par électrophorèse en gel d'agarose en TAE.
- Visualiser la bande intéressante sous UV et exciser le morceau d'agarose contenant cette bande.
- Placer le morceau d'agarose dans un eppendorf et déterminer la masse de gel récupérée.
- 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 (en agitant régulièrement).
- Ajouter 5 µl de solution Glass-Milk<sup>TM</sup> (résine) et homogénéiser.
- Incuber 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 wash".
- Centrifuger quelques secondes.
- Répéter le lavage 2 fois.
- Resuspendre le dernier culot dans 10 à 40 µl de TE (pH 8.0).
- Centrifuger 30 secondes et récupérer le surnageant qui contient l'ADN.
- Eventuellement, on peut répéter ces 2 derniers étapes pour augmenter la quantité d'ADN récupéré.
- Analyser 1 à 2 µl de l'ADN récupéré par électrophorèse en gel d'agarose afin de quantifier la récupération.

#### **V.5. Réaction de ligation**

Pour lier de manière covalente deux fragments d'ADN, on utilise l'enzyme ADN ligase du phage T4. Elle catalyse la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyle 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' d'une extrémité proche. L'activité ligase de l'enzyme est conditionnée par la présence d'ATP et d'ions Mg<sup>++</sup>.

##### **Méthode:**

- Dans un eppendorf, placer un mélange des deux fragments à liguer (en proportion de 1 molécule pour 1 molécule ou en excès pour le petit fragment).
- Ajouter 1 µl d'ADN ligase T4 (8U/µl, Boehringer).
- Ajouter 1/10 du volume total de tampon de ligation (10x, Boehringer).
- Compléter avec de l'eau distillée stérile.
- Incuber à 14-16°C pendant 10 à 14 heures pour la ligation de fragments à bouts protrudants ou à 20°C pour les fragments à bouts francs.
- Conserver le mélange de ligation à -20°C.



### Témoins à utiliser

-Un vecteur restreint dont le mélange de ligation ne contient pas de ligase: les molécules de ce vecteur restent linéaires et sont par là-même incapables de transformer les *E. coli* compétentes. Ce témoin permet d'évaluer la proportion de transformant ayant reçu un vecteur non restreint.

-Un vecteur restreint soumis à l'action de la ligase, il permet de vérifier l'efficacité de la ligation.

## **V.6. Réaction d'extension et de rognage**

Pour passer d'une extrémité cohésive d'ADN (issu d'une restriction enzymatique) à une extrémité à bouts francs, on utilise la DNA polymérase du phage T4.

Cette polymérase, possède une activité 3'-5' exonucléase élevée mais est dépourvue d'activité 5'-3' exonucléase. Les extrémités 5' protrudantes sont remplies et les extrémités 3' protrudantes sont rognées (figure II.12).

### Méthode

Le volume réactionnel final est souvent de 40  $\mu$ l.

un volume d'ADN restreint

4  $\mu$ l de tampon de polymérase 10X

2  $\mu$ l d'une solution 2mM en dATP dCTP, dTTP et dGTP

2  $\mu$ l de DNA polymérase T4 (1 U/ $\mu$ l)

incubation de 20 minutes à 11°C.

## **V.7. Transformation bactérienne**

La transformation de bactéries compétentes consiste à faire entrer de l'ADN exogène (plasmide) dans le microorganisme (figure II.13). A cette fin, la paroi et la membrane bactérienne doivent être perméables à l'ADN: la bactérie est alors dite compétente.

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

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

### Méthode

#### 1. Préparation de cellules *E. coli* S17 ( $Sm^R$ ) ou XL1-blue ( $Tet^R$ ) compétentes

-Ensemencer 100 ml de LB+ antibiotique à partir d'une préculture. Incuber à 37°C sous agitation jusqu'à une absorbance d'environ 0.3 à 550 nm (début de phase de croissance exponentielle).

-Arrêter la croissance en refroidissant la culture sur glace pendant 10 minutes.

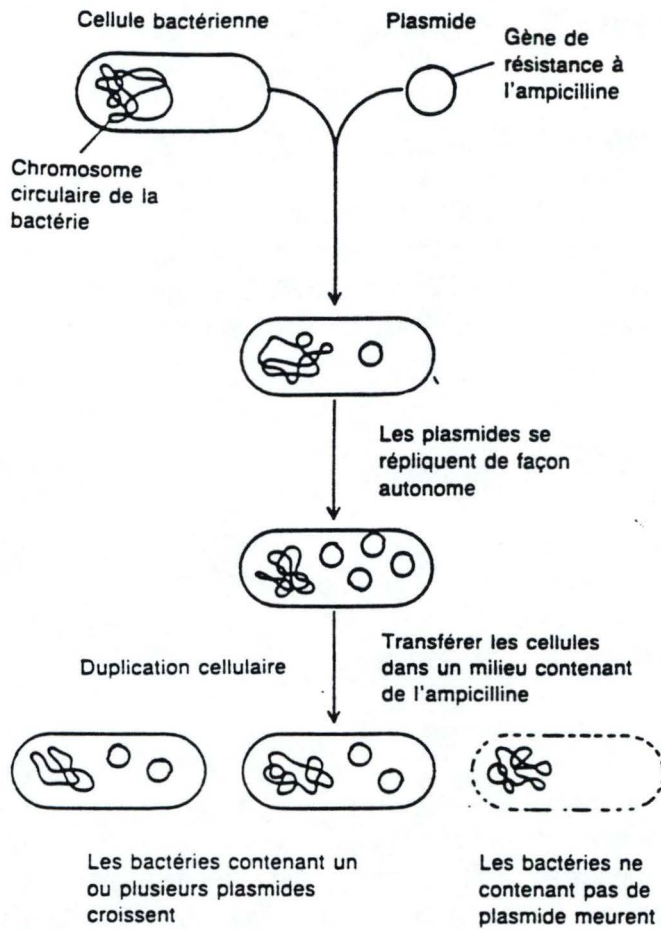


Figure II.13: Transformation bactérienne.

Un plasmide porteur d'un gène de résistance peut pénétrer suite à un choc thermique dans une bactérie, dont la paroi a été perméabilisée au chlorure de calcium (cellule compétente). Les bactéries transformées sont sélectionnées sur un milieu contenant l'antibiotique dont la résistance est encodée par le plasmide (d'après Suzuki *et al.*, 1989).

-Centrifuger la culture 15 minutes à 3000 rpm à 4°C. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de CaCl<sub>2</sub> 50 mM. Répéter cette étape une seconde fois.

-Laisser la solution 30 minutes sur glace puis centrifuger 15 minutes à 3000 rpm à 4°C.

-Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de solution froide de CaCl<sub>2</sub> 50 mM glycérol 15% équivalent au dixième du volume initial.

-Aliquoter la suspension en eppendorfs et stocker à -80°C.

## 2. Transformation des cellules compétentes

-A 50 à 150 µl de cellules compétentes, ajouter 10 µl de mélange de ligation ou 10 à 100 ng d'ADN.

-Déposer 30 minutes sur glace.

-Choc thermique de 2 minutes à 37°C ou 42°C.

-Ajouter 500 µl de LB liquide (sans antibiotique).

-Incuber 30 min. à 1 heure à 37°C.

-Etaler sur boîtes de milieu sélectif et incuber une nuit à 37°C.

### Témoins de transformation:

-Un vecteur non restreint est utilisé pour transformer des cellules afin de montrer leur compétence.

-Cellules compétentes subissant les conditions de transformation mais sans ADN, étalées sur:

-Milieu riche non sélectif comme contrôle de viabilité des cellules compétentes.

-Milieu sélectif pour tester la validité de ce milieu et évaluer la proportion de mutants spontanés résistants à l'antibiotique.

## V.8. Electroporation bactérienne

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

### Méthode

#### 1. Préparation des cellules électrocompétentes

- Inoculer 1 L de LB liquide avec 1 ml d'une culture fraîche de bactérie *E. coli*.

-Incuber les bactéries à 37°C sous forte agitation jusqu'à ce que la culture ait atteint une D.O. de 0,5 à 0,8 à 550 nm (phase mi-log de croissance).

-Placer la culture 15 à 30 minutes dans la glace, centrifuger à 4°C à 3000 rpm pendant 15 minutes.

-Eliminer le surnageant. Resuspendre le culot dans 1 L d'eau distillée stérile (d.s.) froide. Centrifuger comme précédemment.

-Resuspendre dans 0,5 L d'eau d.s. froide et centrifuger.

-Resuspendre dans 20 ml d'eau d.s. froide contenant 10% de glycérol. Centrifuger.

-Resuspendre dans un volume final de 2 à 3 ml d'eau d.s. froide contenant 10% de glycérol. La concentration cellulaire est d'environ 1 à 3.10<sup>10</sup> cellules/ml.

-Cette suspension peut être aliquotée sur glace et conservée à -80°C (pendant environ 6 mois).

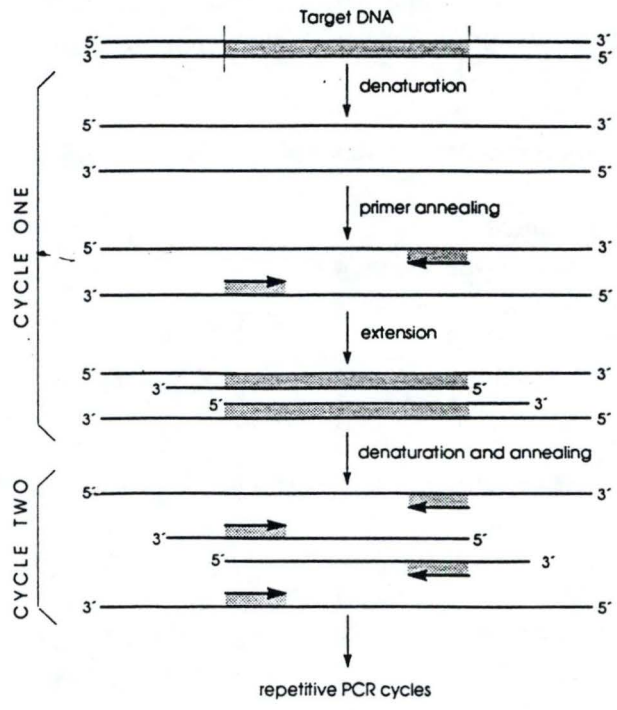


Figure II.14: Schéma de l'amplification de gène par PCR (d'après Gerhardt, 1994).

## 2. Electroporation

- Laisser dégeler les cellules électrocompétentes sur glace.
- Placer dans un eppendorf stérile et froid (sur glace), 1 à 5 µl d'ADN plasmidique ou de mélange de ligation et y ajouter 100 µl de cellules compétentes.
- Mélanger et placer la solution 1 minute sur glace.
- Transférer dans la cuvette d'électroporation, refroidie sur glace, le contenu de l'eppendorf.
- Placer la cuvette dans l'électroporateur (BIO RAD Gene Pulser<sup>TM</sup>).
- Régler l'appareil sur:  
capacité 25 µF  
résistance 200 Ohms  
différence de potentiel 22,5 Kv/cm
- Décharger le condensateur (choc électrique).
- Ajouter rapidement 1 ml de SOC.
- Transférer dans un eppendorf et laisser 1 heure à 37°C.
- Étaler sur milieu sélectif (100 à 250 µl/boîte) et laisser pousser une nuit à 37°C.

### Solution

SOC:

0,5% Yeast extract

2% Tryptone

10 mM NaCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM MgSO<sub>4</sub>

20 mM glucose

## V.9. Amplification d'ADN par PCR

L'ADN doit être dénaturé (figure II.14). Des amorces oligonucléotidiques, complémentaires de séquences se trouvant de chaque côté de la région-cible, s'hybrident l'une au brin "sens" l'autre au brin "anti-sens". La longueur de la séquence-cible est déterminée par la distance entre les 2 amorces.

Une ADN polymérase thermostable (Dynazyme) est alors utilisée pour synthétiser à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque amorce un brin d'ADN complémentaire. Un cycle consiste en 3 étapes: dénaturation des brins d'ADN, hybridation des amorces et élongation (synthèse d'un brin d'ADN complémentaire). En répétant ce cycle, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies du fragment cible.

La température d'hybridation utilisée est inférieure à la température de melting (T<sub>m</sub>) des amorces. Ce T<sub>m</sub> se calcule de la façon suivante, 4°C sont comptabilisés pour les bases G et C et 2°C pour les bases A et T:  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ .

Les amorces utilisées lors de l'amplification du gène de la bactéroferritine de *Brucella* sp. sont les suivantes:

primer direct: 5' GTTCATCATATGAAAGGCGAACCAAAGG 3'

primer reverse: 5' AGACAGGATCCAACAGGCTTACTCAGC 3'

### Méthode

- Mélange de réaction réalisé dans un microtube:
- 10  $\mu$ l de tampon d'ADN polymérase (Dynazyme)10X
- 2  $\mu$ l de dNTP 10 mM
- 100 pmole de primer 1
- 100 pmole de primer 2
- 1  $\mu$ l de Dynazyme (2 U/ $\mu$ l)
- Porter à 100  $\mu$ l avec de l'eau distillée stérile
- Déposer 100  $\mu$ l d'huile minérale ultra-pure au-dessus du mélange de réaction afin d'empêcher toute évaporation.
- Programmer l'appareil à PCR comme suit:
- Dénaturation de 10 minutes à 95°C.
- 36 cycles d'amplification présentés comme suit:
  - 1 min. à 95°C pour la dénaturation
  - 1 min. à 55°C pour l'hybridation
  - 30 sec. à 72°C pour la polymérisation
- Elongation finale de 10 minutes à 72°C.
- Éliminer l'huile minérale.
- Déposer 10  $\mu$ l sur gel d'agarose et conserver le reste à -20°C.

## **VI. Analyse de l'ADN génomique de *Brucella sp.* par Southern blot**

### **VI.1. Extraction de l'ADN génomique de *Brucella sp.***

- Repiquer la souche de *Brucella sp.* à analyser sur une pente TSAYE+antibiotiques et incubé 24 h à 37°C.
- En utilisant une pipette pasteur boutonnée et repliée, râcler les bactéries et les resuspendre dans 567  $\mu$ l de TENa (en eppendorf).
- Ajouter 30  $\mu$ l de SDS 10% et 3  $\mu$ l de protéinase K à 20 mg/ml.
- Homogénéiser en inversant doucement l'eppendorf et incubé à 37°C pendant 1 heure.
- Ajouter 600  $\mu$ l de phénol saturé en tampon TENa, et agiter fortement l'eppendorf.
- Centrifuger 20 minutes à 4°C à 13500 rpm en minifuge.
- Récupérer la phase aqueuse supérieure.
- Ajouter 80  $\mu$ l de NaClO<sub>4</sub> 5M et 600  $\mu$ l de chloroforme, agiter fortement.
- Centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 5000 rpm.
- Récupérer la phase aqueuse sans emporter le voile à l'interface et ajouter 1 ml d'éthanol 100% (à -20°C).
- Mélanger en inversant l'eppendorf.
- Centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 13500 rpm.
- Éliminer le surnageant et ajouter 1 ml d'éthanol 70% (à -20°C).
- Centrifuger 5 minutes à 13500 rpm et éliminer le surnageant.
- Sécher sous vide et resuspendre dans 100  $\mu$ l d'eau distillée stérile.
- Pour faciliter la resuspension, incubé l'eppendorf à 37°C.

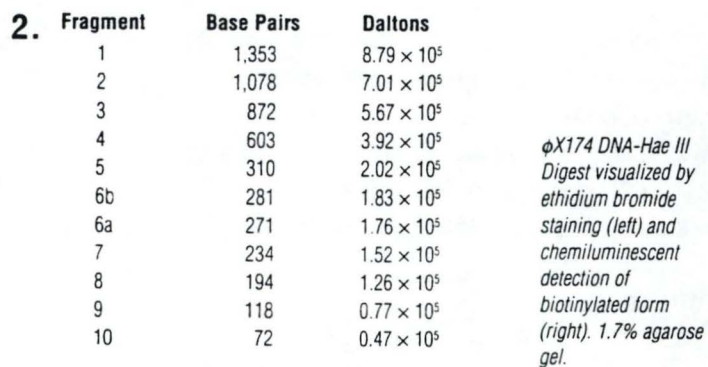
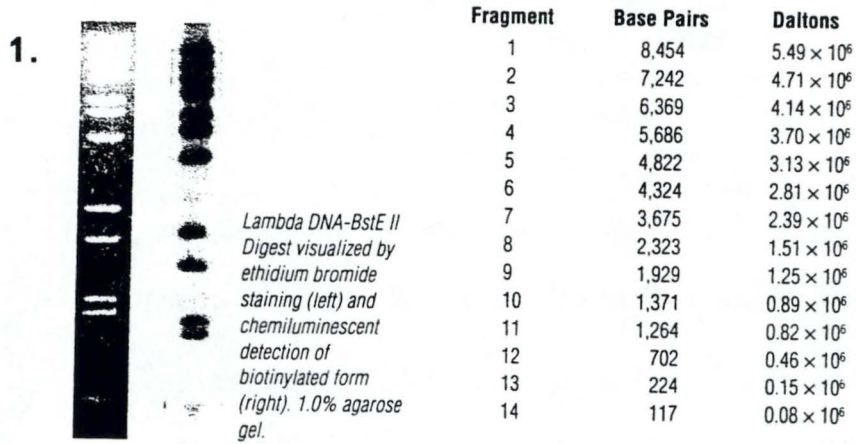


Figure II.15: 1. ADN de  $\phi$  X174 restreint par *Hae* III.

2. ADN du phage  $\lambda$  restreint par *Bst* EII.

### Solutions et tampons

-TENA:

Tris 50 mM à pH 8

EDTA 50 mM

NaCl 0.1 M

-Protéinase K 20 mg/ml dans une solution de:

Tris pH 7.5 1mM

CaCl<sub>2</sub> 1mM, conservé à 4°C.

### VI.2. Restriction de l'ADN génomique par *Hind* III ou *Taq* I

L'enzyme *Hind* III clive l'ADN bicaténaire en un site précis de 6 nucléotides (A/AGCTT). Le clivage de l'ADN génomique de *B. melitensis* par *Hind* III montre de très nombreux fragments dont les tailles sont très diverses (allant de plus de 8500 pb à moins de 700 pb).

L'enzyme *Taq* I restreint au site T/CGA. *Taq* I restreint l'ADN génomique de *B. melitensis* en petits fragments inférieurs à 2000 pb.

#### Méthode

-10 µl d'ADN génomique de *Brucella sp. melitensis*

-1 à 2 µl d'enzyme *Hind* III concentrée (40 U/µl) ou 2 µl de *Taq* I (10 U/µl).

-2,5 µl de tampon B de restriction 10x (Boehringer).

-Compléter avec de l'eau distillée stérile pour obtenir 25 µl au total.

Incuber quelques heures à 37°C (*Hind* III) ou à 65°C (*Taq* I).

Vérifier que la restriction est complète par électrophorèse en gel d'agarose d'1/10 du mélange de restriction.

### VI.3. Electrophorèse en gel d'agarose

La séparation des fragments d'ADN génomique de *Brucella sp.* restreint par *Hind* III se fait par dans un gel d'agarose de 0.8% ou dans un gel de 1.2% si l'ADN est restreint par l'enzyme *Taq* I. Deux marqueur de taille pré-biotinylé ont été utilisés (figure II.15). Ces marqueurs permettent également d'évaluer l'efficacité du transfert et de la détection.

L'ADN restreint est incubé à 60°C pendant 3 minutes avant de charger sur le gel d'agarose.

### VI.4. Transfert et immobilisation

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

#### Méthode

-Après l'électrophorèse, placer le gel d'agarose sous UV (302 nm) pendant 3 à 5 minutes. Les UV clivent l'ADN et facilitent ainsi le transfert.

-Immerger le gel dans la solution de dénaturation pendant 30 minutes sous faible agitation.

-Immerger le gel dans la solution de neutralisation pendant 15 minutes.

-Répéter le bain de neutralisation 15 minutes.

Figure II.16: Schéma du transfert d'ADN sur une membrane

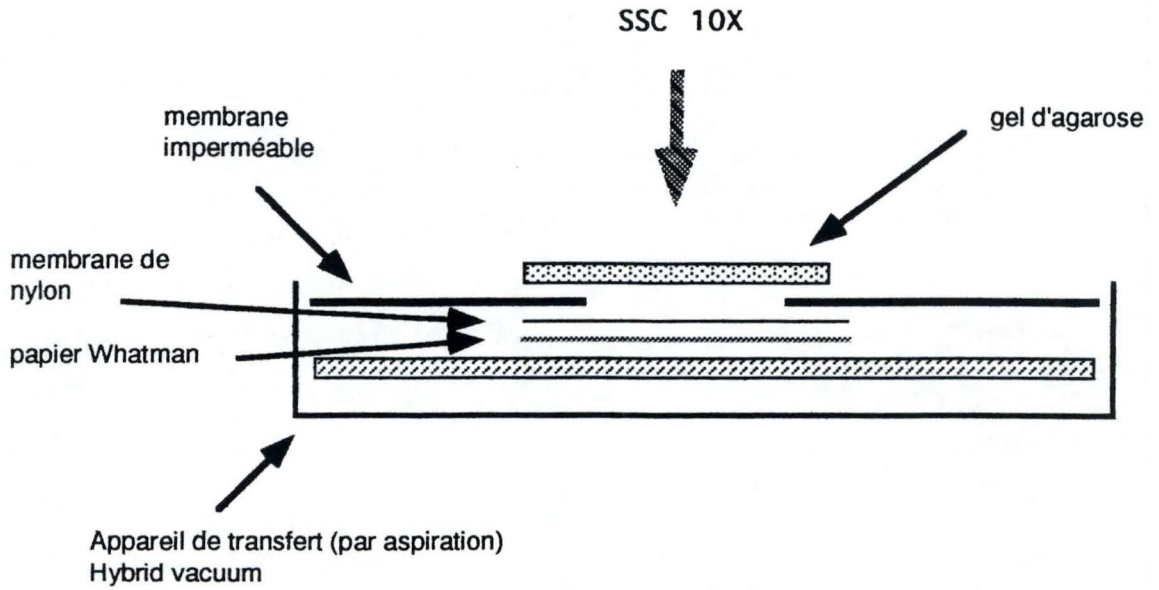
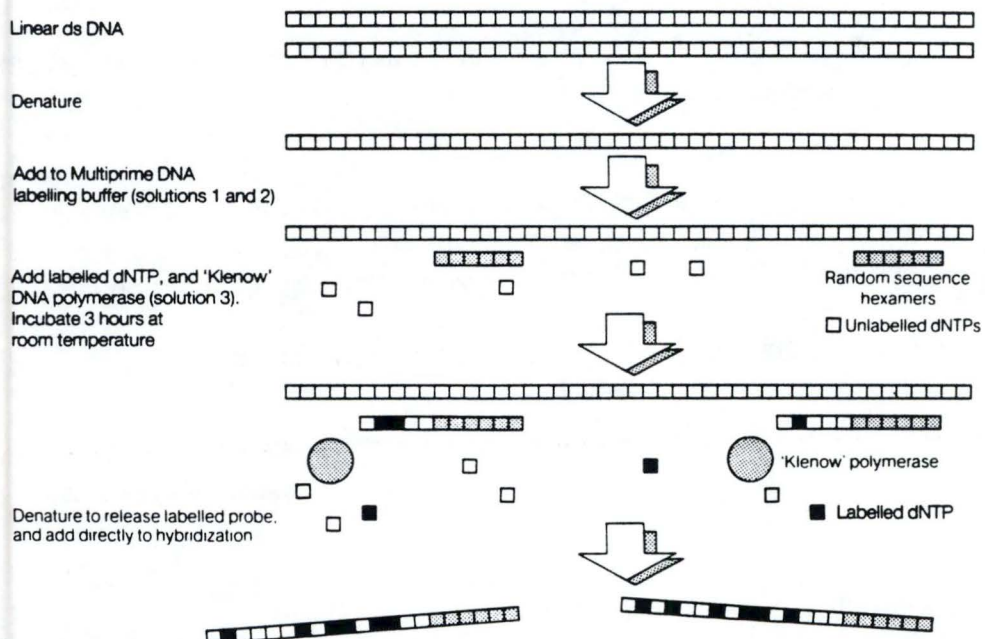


Figure II.17: Représentation schématique du marquage d'une sonde par amorçage aléatoire (d'après Amersham).



-Découper un morceau de membrane Immobilon-S de taille un peu supérieure à celle du gel et un morceau de papier Whatman.

-Immerger la membrane dans du SSC 2X.

-Par un système de transfert sous vide, l'ADN est transféré sur la membrane en présence de SSC 10X pendant 1 heure. Suivre le schéma ci-contre utilisant le système de transfert Hybrid vacuum blotter (figure II.16).

-Après le transfert, sécher la membrane entre deux feuilles de papier Whatman 3MM.

-Immobiliser l'ADN sur la membrane, en l'exposant aux UV pendant 5 secondes.

### **VI.5. Marquage de la sonde et vérification**

Le NEBlot™ Phototope™ Kit est utilisé pour générer une sonde biotylée à partir d'un fragment d'ADN. Le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I catalyse *in vitro* l'addition de nucléotides biotylés à partir de primers aléatoires (octamers) biotylés, en utilisant comme matrice un brin d'ADN monocaténaire (figure II.17).

#### **Méthode**

-de 100 ng à 1 µg du fragment d'ADN récupéré et purifié à marquer dans un volume de 34 µl.

-Dénaturer l'ADN, au bain marie dans de l'eau bouillante pendant 5 minutes.

-Placer ensuite rapidement l'ADN dénaturé 5 minutes sur glace afin d'éviter la renaturation.

-Ajouter dans l'ordre indiqué:

-10 µl de 5X Labelling Mixture (contenant les octamers aléatoires biotylés).

-5 µl de dNTP Mix

-1 µl de DNA Polymerase I- Klenow Fragment

-Incuber à 37°C pendant la nuit.

-Arrêter la réaction en ajoutant 2 µl d'EDTA 500 mM pH 8.0.

-Pour précipiter la sonde tout en éliminant les dNTP et le reste du mélange additionner 5 µl de LiCl 4 M et 150 µl d'éthanol.

-Incuber à -80°C pendant 30 minutes.

-Centrifuger pendant 15 minutes et laver à l'éthanol 70%.

-Resuspendre la sonde précipitée dans 20 µl d'eau distillée stérile.

-Stocker à -20°C.

#### **Vérification du marquage de la sonde**

L'efficacité du marquage de la sonde est un facteur important du succès de l'hybridation et de la détection qui suivent. Le marquage est vérifié selon le protocole suivant:

-Réaliser 6 dilutions croissantes de la sonde et d'un ADN contrôle prébiotylé (de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ ).

-Déposer une goutte de 1 µl de chaque dilutions sur une membrane.

-Sécher la membrane et fixer l'ADN sous UV.

-Afin de visualiser les spots, suivre le protocole de détection et révélation (étape 7 du Southern blot).

Le marquage de la sonde est considéré comme efficace lorsque les gouttes des dilutions  $10^{-3}$  à  $10^{-6}$  sont visibles à la révélation.

Figure II.18: Hybritube

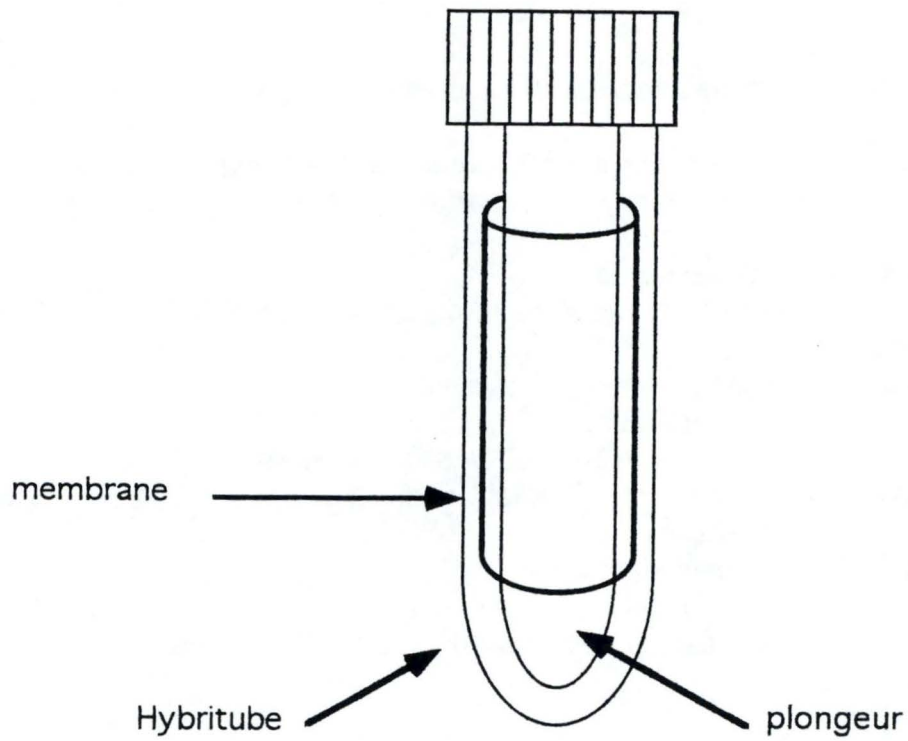
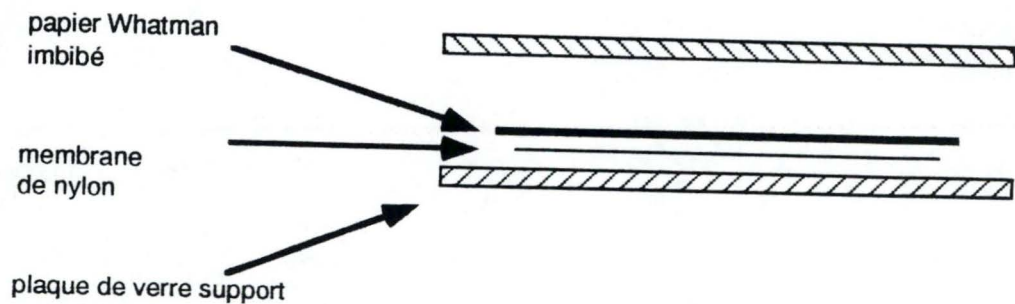


Figure II.20: Schéma de l'imprégnation "sandwich".

La membrane de nylon contenant l'ADN transféré est imprégnée de la solution utilisée par le papier Whatman qui lui est superposé.



## **VI.6. Hybridation**

Après avoir fixé l'ADN transféré sur la membrane et marqué la sonde, il faut hybrider la sonde aux fragments d'ADN de la membrane. Le protocole qui a été utilisé est le suivant:

### **Préhybridation de la membrane**

- Immerger la membrane dans du SSC 6X pendant approximativement 2 minutes.
- Placer la membrane dans un hybritube de 15 ml (Gibco BRL) en l'enroulant autour du plongeur (figure II.18).
- Ajouter 10 à 12 ml de solution de préhybridation dans l'hybritube.
- Laisser incuber pendant 1 heure à 68°C.

### **Hybridation de la sonde**

- Dénaturer 8 µl de la sonde en la plaçant dans de l'eau bouillante pendant 5 minutes. Centrifuger et la placer dans de la glace.
- Ajouter la sonde à la solution de préhybridation de l'hybritube
- Mélanger en inversant l'hybritube quelques fois. Incuber à 68°C pendant une nuit.

## **VI.7. Détection et révélation**

La détection avec le Phototope™ Detection Kit comprend une étape de saturation, une incubation avec de la streptavidine, une incubation avec de la phosphatase alcaline biotinylée et une réaction finale de chémoluminescence.(figure II.19) Le Lumigen-PPD (Biolabs) ou le CDP-Star™ (Tropix).est transformé en un produit responsable de l'émission locale de lumière, qui peut impressionner un film RX.

Le protocole suivit comprend des temps de lavage qui peuvent être adaptés pour une meilleure élimination du bruit de fond.

### **Méthode**

- Récupérer la solution de préhybridation contenant la sonde et la stocker à -20°C.
- Immerger la membrane dans une solution SSC 2X, SDS 0,1% pendant 5 minutes à température ambiante.
- Répéter l'étape du lavage.
- Immerger la membrane dans une solution SSC 0,1X, SDS 0,1% pendant 15 minutes à 68°C ou à température ambiante.
- Répéter l'étape de lavage.
- Immerger la membrane dans la solution bloquante, pendant 5 minutes sous faible agitation, à température ambiante.
- Suivant le schéma ci-contre (méthode du sandwich, figure II.20), imprégner la membrane de streptavidine (diluée 1000X dans la solution bloquante) pendant 3 minutes.
- Laver la membrane dans la solution bloquante diluée 10X, pendant 5 minutes sous faible agitation.
- Répéter l'étape du lavage.
- Imprégner la membrane de phosphatase alcaline biotinylée diluée 760X dans la solution bloquante par la méthode du sandwich pendant 3 minutes à température ambiante.
- Laver dans la solution de lavage II diluée 10X pendant 5 minutes sous faible agitation.
- Répéter l'étape du lavage.
- Imprégner, pendant 5 minutes à température ambiante, la membrane de Lumigen-PPD ou de CDP-Star dilué 100X dans la solution de lumigen diluent (pH 9.6).

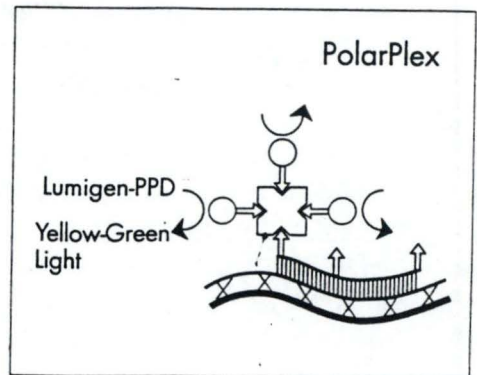
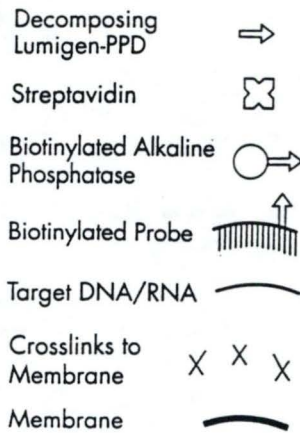
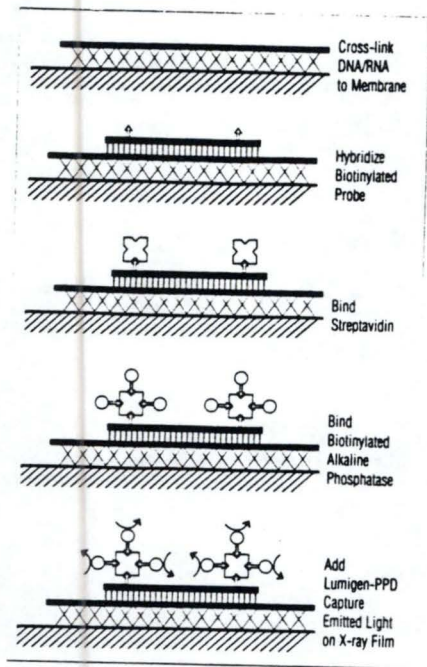
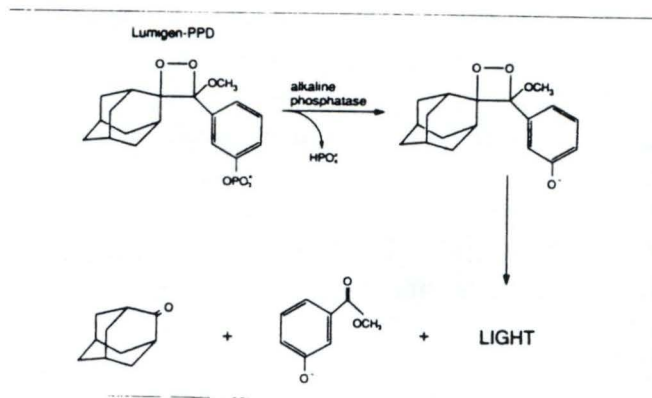


Figure II.19: a/ Principe de la détection d'une hybridation par chémoluminescence (d'après Biolabs).



b/ Réaction enzymatique suivie de l'émission de lumière (d'après Biolabs).

-Placer la membrane dans un sac en plastic scellé.

-Après 2 heures l'intensité de lumière atteint son maximum pour le Lumigen-PPD et 1 heure pour le CDP-Star, elle reste ensuite constante pendant plusieurs jours. Exposer la membrane à un film d'autoradiographie (toujours sous plastic) pendant 15 minutes (ou plus) pour le Lumigen-PPD et 20 secondes à 10 minutes pour le CDP-Star.

-Immerger le film pendant 5 minutes dans le révélateur.

-Rincer le film à l'eau distillée et l'immerger pendant 10 minutes dans le fixateur, le rincer ensuite à l'eau de ville.

### **VI.8. Stripping et réhybridation de la membrane**

Après la détection, la sonde pourra être éliminée et la membrane pourra alors être réhybridée avec une nouvelle sonde.

#### **Méthode**

-Rincer la membrane dans de l'eau distillée.

-Chauffer une solution NaOH 400 mM, 0.1% SDS à 80°C.

-Immerger la membrane dans cette solution et laisser incuber pendant 30 minutes à 80°C.

-Rincer la membrane dans une solution de Tris-HCl 200 mM, pH 7.5, 0.1X SSC pendant 30 minutes à température ambiante.

-Remplacer la solution par une solution fraîche de Tris-HCl 200 mM, pH 7.5, 0.1X SSC et y stocker la membrane jusqu'au moment d'une nouvelle hybridation (étape 6 du Southern blot).

#### **Solutions.**

SSC 20X

NaCl 3 M, Citrate de sodium 300 mM

Solution de dénaturation

NaOH 500 mM, NaCl 1,5 M

Solution de neutralisation

Tris 1 M, NaCl 1,5 M, pH 7,5

Denhart's Reagent 50X:

1. Dissoudre 5 g de ficoll, 5 g de polyvinylpyrrolidone et 5 g d'albumine de sérum bovin dans 500 ml d'eau distillée.

2. Stocker à -20°C.

Solution de préhybridation/hybridation

SSC 6X, Denhart's Reagent 5X, SDS 0,5%, 100 µg/ml d'ADN de sperme de hareng dénaturé

Solution bloquante

SDS 5%, Phosphate, pH 7,2

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 17mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8 mM, 127 mM NaCl, SDS 173 mM

Solution de lavage II 10X

Tris 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 9,5

## VII. Isolement de fragments génomiques par IPCR

L'amplification par IPCR ou PCR inverse (Ochman *et al.*, 1988) de fragments d'ADN génomique de *Brucella* sp. se fait sur des molécules d'ADN circularisées.

L'ADN génomique de souches transposantes de *B. melitensis* a été donc restreint par l'enzyme de restriction *Taq* I et les fragments de restriction ont été reliqués. Les amorces utilisées sont spécifiques du gène *cat*.

### Méthode

Après restriction de l'ADN génomique par l'enzyme *Taq* I, cette enzyme est inactivée par une extraction phénol-chloroforme:

- Amener le volume à 50  $\mu$ l. et ajouter 2,5  $\mu$ l de NaCl 5M.
- Ajouter 1 volume de phénol-chloroforme et vortexer.
- Centrifuger 5 min. à 125000 rpm.
- Récupérer la phase aqueuse et ajouter 2 vol. d'EtOH 100%.
- Incuber 10 min. à -80°C et centrifuger 15 min. à 12500 rpm à 4°C.
- Eliminer prudemment l'éthanol et laver à l'EtOH 70%.
- Centrifuger 5 min. à vitesse max. à 4°C, éliminer l'éthanol et sécher sous vide.
- Resuspendre dans 20  $\mu$ l d'eau distillée stérile.

### Religation des fragments *Taq* I

- Ajouter aux fragments de restriction resuspendus dans 20  $\mu$ l
- 1,25  $\mu$ l de ligase.
- 5  $\mu$ l de tampon de ligation 10X.
- Amener à un volume final de 50  $\mu$ l avec de l'eau distillée.
- Incuber une nuit à 4°C.

### PCR sur les fragments reliqués

Mélange de réaction réalisé dans un microtube de 500  $\mu$ l:

- 25  $\mu$ l du volume de self-ligation
- 1  $\mu$ l de dNTP 10 mM
- 60 pmole de primer 1
- 60 pmole de primer 2
- 10  $\mu$ l de tampon Dynazyme 10X
- 1  $\mu$ l de Dynazyme
- Porter à 100  $\mu$ l avec de l'eau distillée stérile
- Déposer 100  $\mu$ l d'huile minérale.
- Programmer l'appareil à PCR:
- Dénaturation de 5 min. à 95°C.
- 36 cycles d'amplification composés de 3 segments:
- 30 sec. de dénaturation à 95°C
- 1 min. d'hybridation à 65°C
- 1 min. d'élongation à 72°C
- Elongation de 10 min. à 72°C.
- Eliminer l'huile minérale.

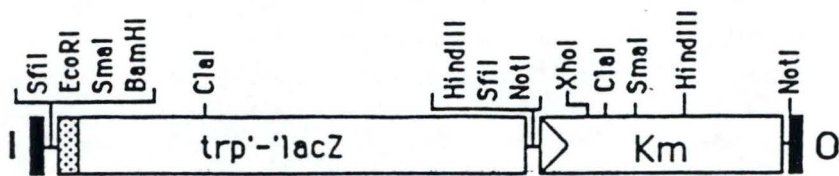


Figure IV.1: Schéma du transposon miniTn5KmlacZ1 (de Lorenzo *et al.*, 1990).

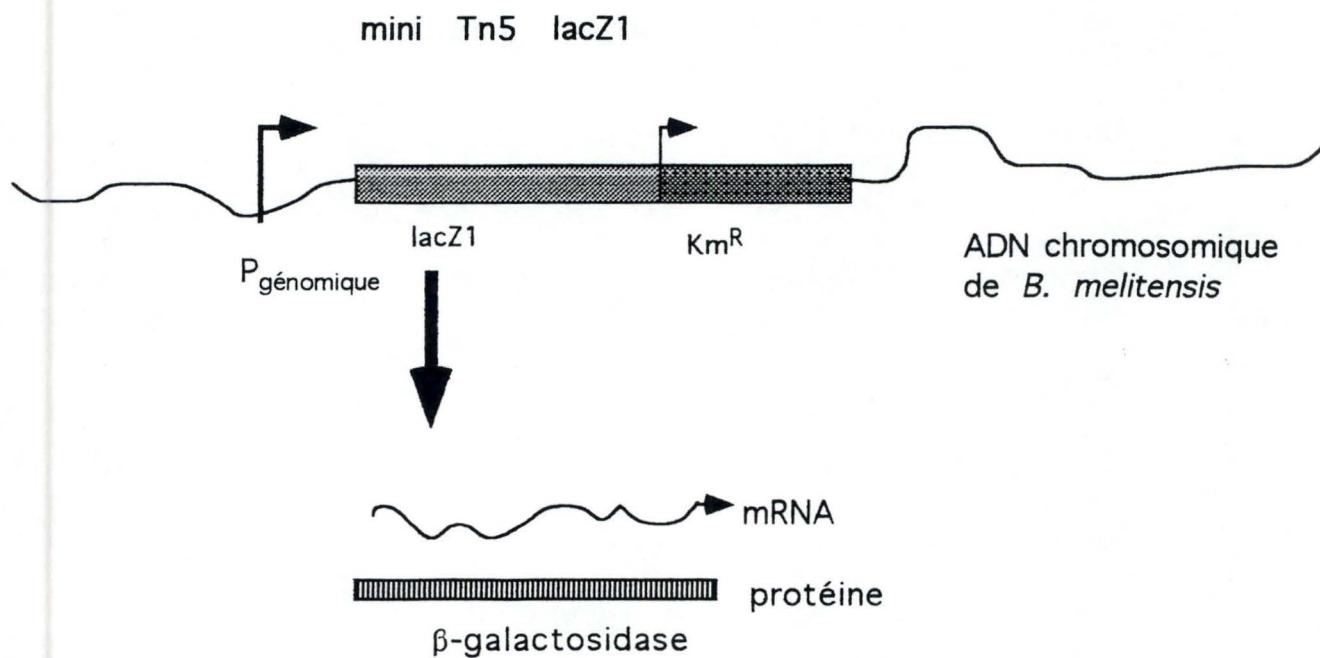


Figure IV.2: Représentation schématique de l'expression du gène reporter *lacZ1* sous le contrôle d'un promoteur génomique suite à la transposition du miniTn5KmlacZ1 dans le génome de *B. melitensis*.

## RÉSULTATS

### Stratégie globale

*Brucella melitensis* est une espèce de *Brucella* sp. virulente responsable de la brucellose chez les petits ruminants. De plus, *B. melitensis* est particulièrement infectieuse pour l'homme. La souche *B. melitensis* 16M avec laquelle nous avons travaillé, est la souche représentative de l'espèce *B. melitensis*.

Comme toutes les bactéries, *Brucella* sp. régule l'expression de ses gènes en fonction de son milieu de croissance pour une adaptation optimale à son environnement. Il est donc possible d'induire ses promoteurs en modifiant les conditions de croissance (*in vitro* ou *in vivo*) de *Brucella* sp. La détection de l'expression préférentielle d'un promoteur de *Brucella* sp. peut se faire en détectant la transcription d'un gène reporter placé sous le contrôle du promoteur.

Le gène reporter que nous utiliserons chez *B. melitensis* est le gène *lacZ1*. Il encode la  $\beta$ -galactosidase, une enzyme dont l'activité est facilement détectable. Ce gène reporter sera placé aléatoirement sous le contrôle d'un promoteur de *B. melitensis* par transposition.

Le transposon utilisé est le miniTn5KmlacZ1 (de Lorenzo *et al.*, 1990). Le miniTn5 qui est flanqué de séquences de 19 pb (I end et O end) nécessaires à la transposition, contient le gène encodant la résistance à la kanamycine (Km), ainsi que le gène reporter *lacZ1* sans promoteur (figure IV.1). L'insertion dans le génome de *B. melitensis* du miniTn5 contenant le gène reporter *lacZ1* devrait permettre la détection de gènes préférentiellement induits. En effet, *lacZ1* ne s'exprimera que sous le contrôle d'un promoteur de *Brucella* sp. situé en amont (figure IV.2).

En ce qui concerne notre choix de *lacZ1* comme gène reporter, aucune activité  $\beta$ -galactosidase n'a été décelée chez *Brucella* sp. jusqu'à présent. Les données de la littérature sont inexistantes quant à la présence d'un homologue du gène *lacZ* dans le génome de *Brucella* sp. Un test coloré effectué au laboratoire n'a pas mis en évidence d'activité  $\beta$ -galactosidase chez *B. melitensis*. En effet, sur un milieu contenant de l'X-gal (composé qui, dégradé par la  $\beta$ -galactosidase, donne un chromophore colorant les colonies en bleu) et en présence d'un inducteur de l'opéron *lac* (IPTG ou lactose), les colonies de *B. melitensis* restent blanches. Smith et Heffron (1987) classent eux aussi *B. abortus* dans les bactéries incapables de cataboliser le lactose (phénotype Lac<sup>-</sup>).

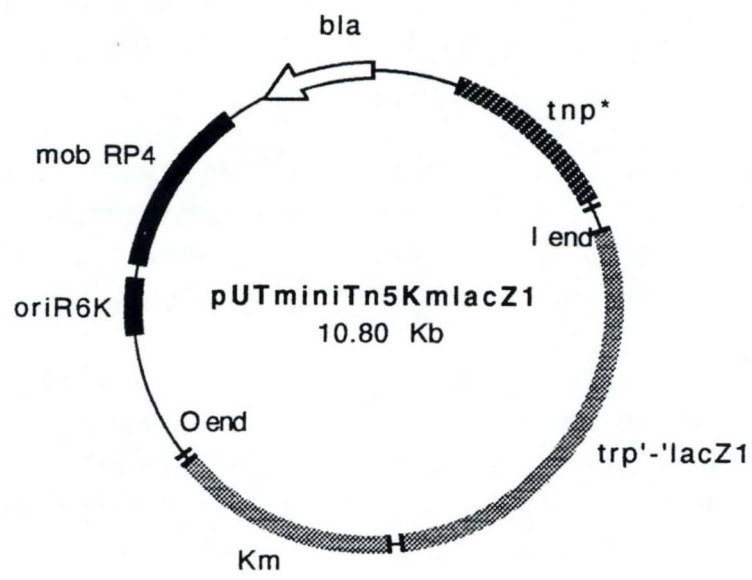


Figure IV.3: Carte plasmidique du pUTminiTn5KmlacZ1 (de Lorenzo *et al.*, 1990).

Ces auteurs ainsi que Price *et al.* (1990) ont déjà eu recours au gène *lacZ* en tant que gène reporter chez *B. abortus*. Le gène reporter s'exprimait sous la dépendance d'un promoteur génomique suite à la transposition du Tn5*lacZ*.

Le transposon miniTn5*lacZ*1 utilisé est porté par le plasmide pUT (figure IV.3) qui contient un gène *bla* encodant la résistance à l'ampicilline (Amp), une séquence *mob* (du plasmide RP4) nécessaire au transfert conjugatif du plasmide, une origine de réplication *oriR6K* dépendante de la protéine  $\pi$  et un gène *tnp\** externe au transposon encodant la transposase (Herrero *et al.*, 1990). Ce plasmide est considéré comme non répliatif chez *B. abortus* (Sangari et Agüero, 1991).

Le plasmide pUT contenant un miniTn5 a précédemment été utilisé chez *B. abortus* par Sangari et Agüero (1991). Ces auteurs ont constaté que parmi 3 plasmides testés, le pUTminiTn5 entraînait le taux le plus élevé de transposition. Nous utiliserons un dérivé de ce plasmide dans lequel a été inséré le gène *lacZ*1.

Le plasmide pUTminiTn5*lacZ*1 est introduit dans *Brucella* sp. par conjugaison entre la souche donneuse du plasmide *E. coli* S17  $\lambda$ pir et la souche receveuse *B. melitensis* 16M. La souche *E. coli* donneuse possède les caractéristiques requises pour la réplication ( $\pi^+$ ) et le transfert (RP4<sup>+</sup>) du plasmide pUT.

En pratique, après la conjugaison, la sélection des bactéries *B. melitensis* se fait en présence d'acide nalidixique (Nal) et de kanamycine (Km). L'acide nalidixique permet d'éliminer les *E. coli* S17 sensibles à Nal et de sélectionner les *B. melitensis* car nous utilisons des mutants spontanés résistants à ce composé (Nal<sup>R</sup>). Alors que la kanamycine sélectionne les clones de *B. melitensis* possédant le transposon. La transposition du miniTn5*lacZ*1(Km<sup>R</sup>), c'est-à-dire son insertion aléatoire dans le génome de *B. melitensis*, et la perte du plasmide pUT non répliatif (Amp<sup>R</sup>) devraient engendrer des mutants transpositionnels qui pourront être sélectionnés sur base de leur résistance à la kanamycine et de leur sensibilité à l'ampicilline (phénotype Km<sup>R</sup> et Amp<sup>S</sup>).

## I. Utilisation du transposon miniTn5Km *lacZ*1 chez *Brucella melitensis* 16M

### I.1. Isolement de clones de *B. melitensis* Km<sup>R</sup>

Par une conjugaison entre des bactéries *E. coli* S17  $\lambda$ pir donneuses et des *Brucella* sp. receveuses, le plasmide pUTminiTn5Km *lacZ*1 est transféré dans des bactéries *B. melitensis* 16M (Nal<sup>R</sup>). Les bactéries *B. melitensis* ayant reçu le plasmide sont sélectionnées en présence d'acide nalidixique (Nal 25: 25  $\mu$ g/ml) et de kanamycine (Km25).

Tests d'agglutination sur les souches:	Agglutination avec le sérum anti-M	Agglutination avec le sérum anti-A
<i>B. melitensis</i> 16M (NaIR)	+	—
<i>B. melitensis</i> 16M (KmR AmpR)	+	—
<i>B. melitensis</i> Rev.1	+	—
<i>B. abortus</i> 544	—	+

Tableau IV.1: Résultats des tests d'agglutination de bactéries de souches du genre *Brucella* par des sérums spécifiques anti-A et anti-M.

En ce qui concerne les témoins de croissance, aucune colonie de bactéries parentales *E. coli* et *B. melitensis* n'a été observée sur milieu sélectif contenant Km<sub>25</sub> et Nal<sub>25</sub>. Aucun mutant résistant spontané aux antibiotiques de sélection n'est donc détecté dans les populations parentales. Par contre, la souche de *B. melitensis* montre comme attendu une croissance normale en présence d'acide nalidixique (Nal<sub>25</sub>).

Parmi les colonies de *B. melitensis* (Nal<sup>R</sup>) qui sont apparues sur les filtres de conjugaison en présence de Nal<sub>25</sub> et Km<sub>25</sub>, 672 colonies ont été repiquées sur les milieux LB+ Nal<sub>25</sub> Km<sub>25</sub> et LB+ Nal<sub>25</sub> Km<sub>25</sub> Amp<sub>100</sub>. Cette sélection en présence d'ampicilline permet d'identifier les mutants transpositionnels dont le phénotype doit être Km<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup> (suite à la perte du plasmide pUT).

Les 672 colonies de *B. melitensis* Km<sup>R</sup> repiquées étaient toutes résistantes à l'ampicilline (Amp<sub>100</sub>). La croissance de huit clones de *B. melitensis* Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> a été testée en présence de concentrations croissantes en Amp (Amp<sub>0</sub> à Amp<sub>500</sub>). Les 8 clones résistent à l'Amp jusqu'à une concentration de 500 µg/ml.

Sur base de leur phénotype Amp<sup>R</sup>, aucune des colonies testées ne semble donc être le résultat d'une simple transposition. Le phénotype Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> des 672 clones pourrait s'expliquer par l'intégration du plasmide (Amp<sup>R</sup>) pUTminiTn5Km lacZ1 dans le génome de *B. melitensis*.

Un pourcentage non négligeable de mutants obtenus après transposition du miniTn5lacZ1 devraient contenir le gène *lacZ1* inséré en aval d'un promoteur actif. Après croissance sur milieu bactériologique contenant de l'X-gal, substrat chromogène de la β-galactosidase (β-gal), ces clones seront donc colorés en bleu. L'activité β-galactosidase des 672 clones a été testée sur un milieu contenant de l'X-gal. Parmi les 672 clones testés, un seul clone présentait une activité β-gal (la colonie est colorée en bleu). La croissance de ce clone Lac<sup>+</sup> a été retestée en présence de concentrations croissantes en ampicilline. Ce clone Lac<sup>+</sup> a montré un phénotype Amp<sup>S</sup>. La sensibilité à l'Amp de ce clone Lac<sup>+</sup> nous a peut-être échappé lors du premier test ou pourrait être due à la perte ultérieure du plasmide (Amp<sup>R</sup>) et au maintien du transposon (Km<sup>R</sup>).

### 1.2. Les clones Km<sup>R</sup> issus de la conjugaison appartiennent à l'espèce *B. melitensis*

Pour vérifier que les clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> isolés appartiennent à l'espèce *B. melitensis*, nous avons réalisé un test d'agglutination par deux sérums spécifiques d'antigènes de surface de *Brucella* sp. Le gène de la bactérioferritine de *Brucella* sp. a également été amplifié par PCR.

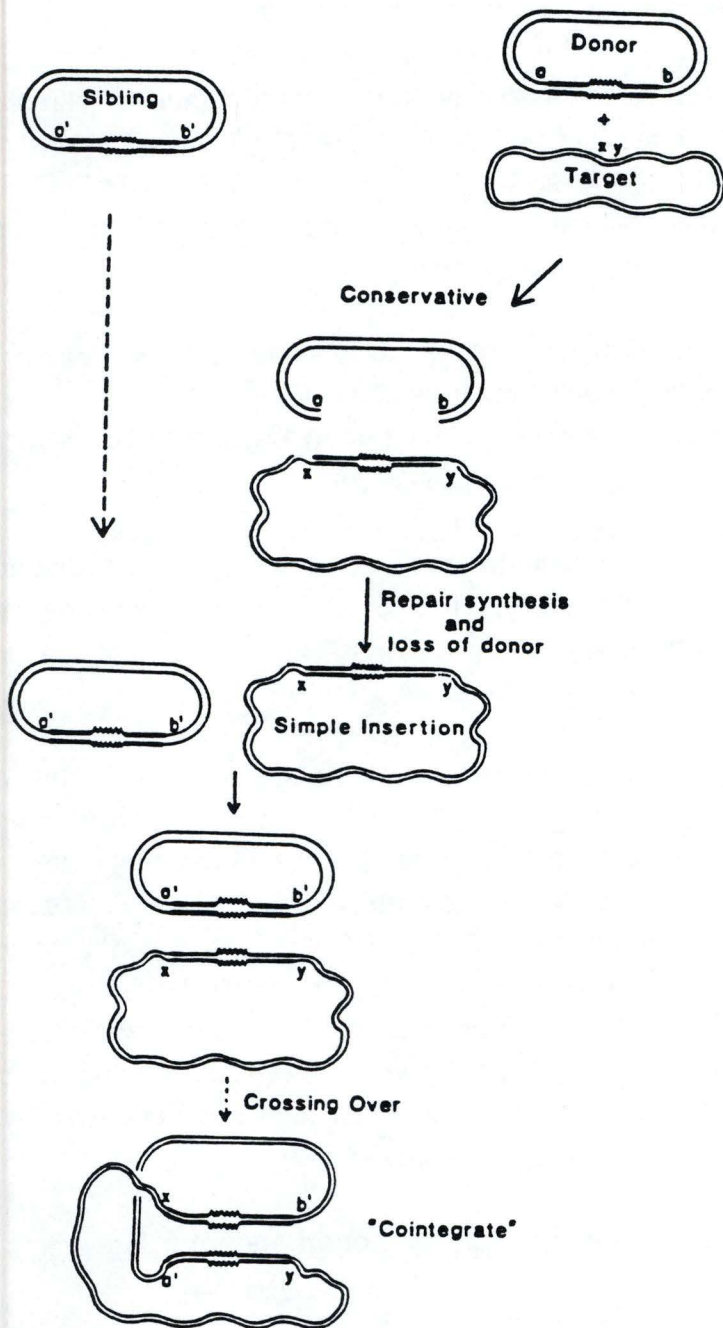


Figure IV.4: Modèle théorique de la transposition conservative (Berg et Berg, 1987).

Le test d'agglutination par des sérums spécifiques a été effectué sur la souche de *B. melitensis* 16M NaI<sup>R</sup> utilisée pour la conjugaison, sur 2 clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> issus de la conjugaison et sur les témoins *B. melitensis* Rev. 1 et *B. abortus* 544 (tableau IV.1). Les souches *B. melitensis* 16M NaI<sup>R</sup>, *B. melitensis* Rev. 1 et les clones issus de la conjugaison sont agglutinés par le sérum anti-M et pas par le sérum anti-A. Le profil d'agglutination inverse est observé pour la souche de *B. abortus*. Les profils d'agglutination obtenus correspondent à ceux décrits dans la littérature pour les espèces testées (Alton *et al.*, 1988).

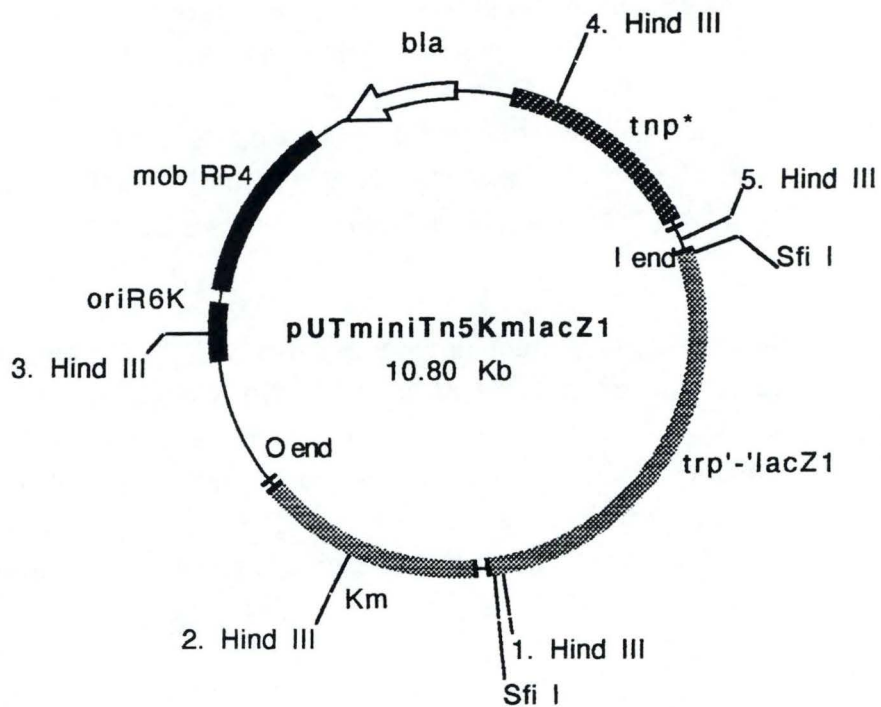
L'amplification du gène de la bactéroferritine de *Brucella* sp. a été effectuée (gène cloné et séquencé au laboratoire; Denoël *et al.*, 1995). Nous disposons de 2 primers spécifiques de ce gène, leur utilisation en PCR permet d'amplifier un fragment de 500 pb du gène. L'ADN génomique a été extrait de 7 clones de *B. melitensis* Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup>. Une PCR réalisée sur ces ADN génomiques et sur l'ADN d'une souche de *B. melitensis* 16M sauvage en utilisant les 2 primers spécifiques du gène de la bactéroferritine entraîne l'amplification d'une bande de taille attendue (500 pb).

Les résultats du test d'agglutination et de la PCR sur le gène de la bactéroferritine montrent que les clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> issus de la conjugaison appartiennent à l'espèce *B. melitensis*.

### Discussion

La résistance à l'ampicilline des clones de *B. melitensis* issus de la conjugaison suggère que le plasmide est toujours présent dans les bactéries. Cependant, le plasmide pUT étant considéré comme suicide chez *Brucella* sp. (Sangari et Agüero, 1991), son maintien nécessiterait son intégration dans le génome. De Lorenzo *et al.* (1990) ont isolé moins de 10% de colonies de *Pseudomonas putida* résistantes à l'Amp suite à la conjugaison de ce pathogène avec une souche d'*E. coli* donneuse du plasmide pUTminiTn5lacZ1. Selon eux, le phénotype Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> de ces clones résulte d'une cointégration du plasmide dans le chromosome de *P. putida*.

La transposition du Tn5 se fait théoriquement de façon conservative. Ce type de transposition est décrite sans étape de cointégration. Un cointégrat pourrait néanmoins être formé à faible fréquence lors de la transposition conservative après recombinaison entre l'ADN cible contenant le transposon et une seconde copie de l'ADN donneur portant le transposon (Berg et Berg, 1987)(figure IV.4). La cointégration n'est cependant pas mentionnée par Sangari et Agüero (1991) qui ont testé le plasmide pUTminiTn5Km chez *B. abortus*. Ces auteurs ne rapportent d'ailleurs pas d'isolement de clones Amp<sup>R</sup>.



Restriction par <i>Sfi</i> I:	Restriction par <i>Hind</i> III:	
taille approximative des fragments obtenus (kb):	taille approximative (kb):	Sondes s'y hybridant:
	1-2: 0,7	Km
3,3	2-3: 1,2	Km
6,9	3-4: 3,9	Amp
	4-5: 1,3	
	5-1: 3,3	lacZ

Figure IV.5: Carte de restriction du plasmide pUTminiTn5KmlacZ1 et taille des fragments obtenus par restriction avec *Sfi* I et *Hind* III.

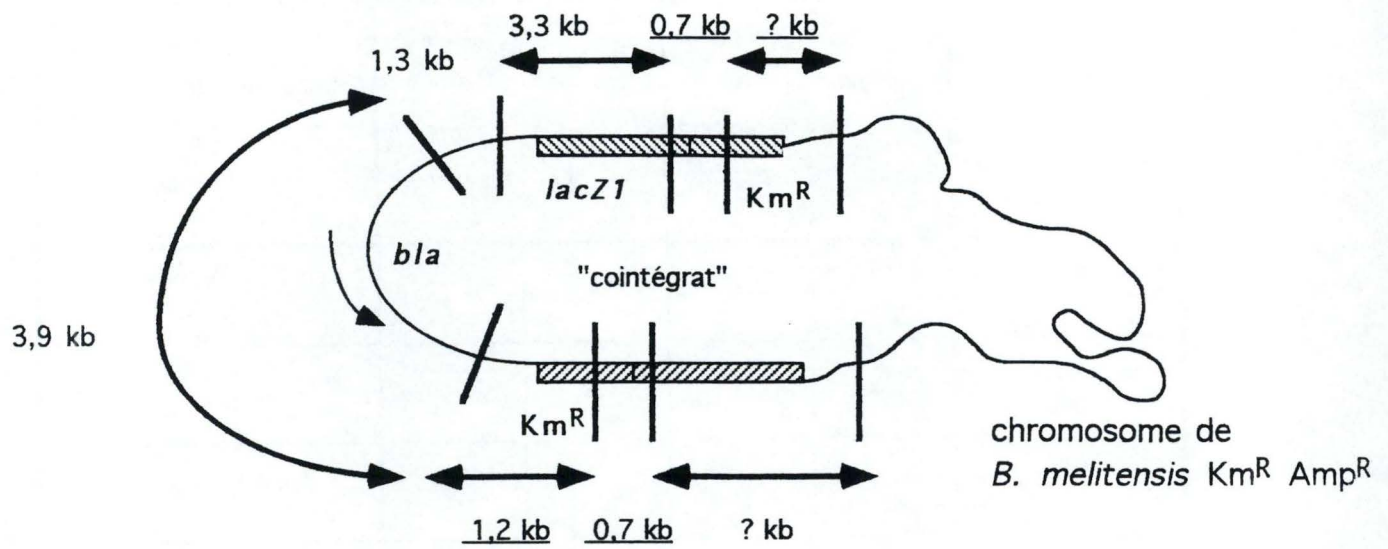


Figure IV.6: Schéma des fragments de restriction *Hind* III d'un cointégré formé avec le pUTminiTn5KmlacZ1.

Comme exemple, la taille des fragments qui devraient s'hybrider à la sonde Km est soulignée.

Hybridation des sondes:	ADN plasmidique du pUTminiTn5Kmlac Z1 / <i>Hind</i> III		ADN génomique de <i>B. melitensis</i> 16M sauvage / <i>Hind</i> III		ADN génomiques de 7 clones <i>B. melitensis</i> Km <sup>R</sup> Amp <sup>R</sup> / <i>Hind</i> III	
	hybridation	taille (kb) des fragments reconnus:	hybridation	taille (kb) des fragments reconnus:	hybridation	taille (kb) des fragments reconnus:
Km	+	0,7 1,2	-		(+)	>8,4 pour 5 clones
lacZ	+	3,3	-		-	
bfr	-		+	4,3	+	4,3
Amp	+	3,9	-		(+)	>8,4 pour 5 clones

Tableau IV.2: Résultats des hybridations réalisées sur l'ADN de clones de *B. melitensis* 16M Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup>. (+): Hybridation sur de l'ADN partiellement restreint.

L'intégration du plasmide dans le génome pourrait aussi être engendrée par une recombinaison entre le gène *lac Z1* et un gène *lac* hypothétique de *Brucella* sp. Rappelons cependant qu'aucune activité  $\beta$ -gal n'a été mise en évidence chez *Brucella* sp.

Si une insertion du plasmide dans le génome a eu lieu de quelque manière que ce soit, une analyse par southern blot de l'ADN génomique des clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> le montrera. Une excision suivie d'une récupération du plasmide intégré peuvent aussi être tentées.

### I.3. Southern blot sur l'ADN génomique des clones Km<sup>R</sup> de *B. melitensis*

L'ADN génomique de 7 clones de *B. melitensis* Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> a été extrait, restreint par l'enzyme *Hind* III et les fragments de restriction ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose. Après transfert sur une membrane de nylon, l'ADN a été hybridé avec les sondes suivantes:

- sonde Km: fragment de 1282 pb, obtenu par restriction *Eco*R I du plasmide pUC4K, contenant le gène encodant la résistance à la kanamycine (voir figure II.10).
- sonde lacZ: fragment de 3,3 kb, obtenu par restriction *Sfi* I du plasmide pUTminiTn5Km lacZ1, contenant le gène encodant la  $\beta$ -galactosidase (figure IV.5).
- sonde bfr: fragment de 500 pb contenant le gène encodant la bactéroferritine de *Brucella* sp.
- sonde Amp: le plasmide pBluescript SK oriT restreint en plusieurs fragments.

La sonde Amp doit détecter le gène *bla*, encodant la résistance à l'Amp, porté par le plasmide pUT (le gène *bla* est le seul gène commun aux plasmides pUT et pBluescript). Les sondes Km et lacZ doivent quant à elles détecter le transposon qui contient les gènes Km et *lacZ1* et enfin, la sonde bfr doit s'hybrider au gène de la bactéroferritine de *Brucella* sp.

Si l'intégration du pUTminiTn5Km lacZ1 dans le génome des clones de *B. melitensis* Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> a effectivement eu lieu, l'hybridation des 3 sondes Amp, Km et lacZ devrait le prouver en détectant plusieurs fragments de taille connue issus de la restriction par *Hind*III(figure IV.6).

Les résultats des southern blot sont les suivants (tableau IV.2):

Sur l'ADN plasmidique témoin les sondes Km, Amp et lacZ détectent des fragments de taille correcte (voir figure IV.5). Un fragment de taille attendue est détecté par la sonde bfr dans l'ADN témoin de *B. melitensis* sauvage et des 7 clones testés.

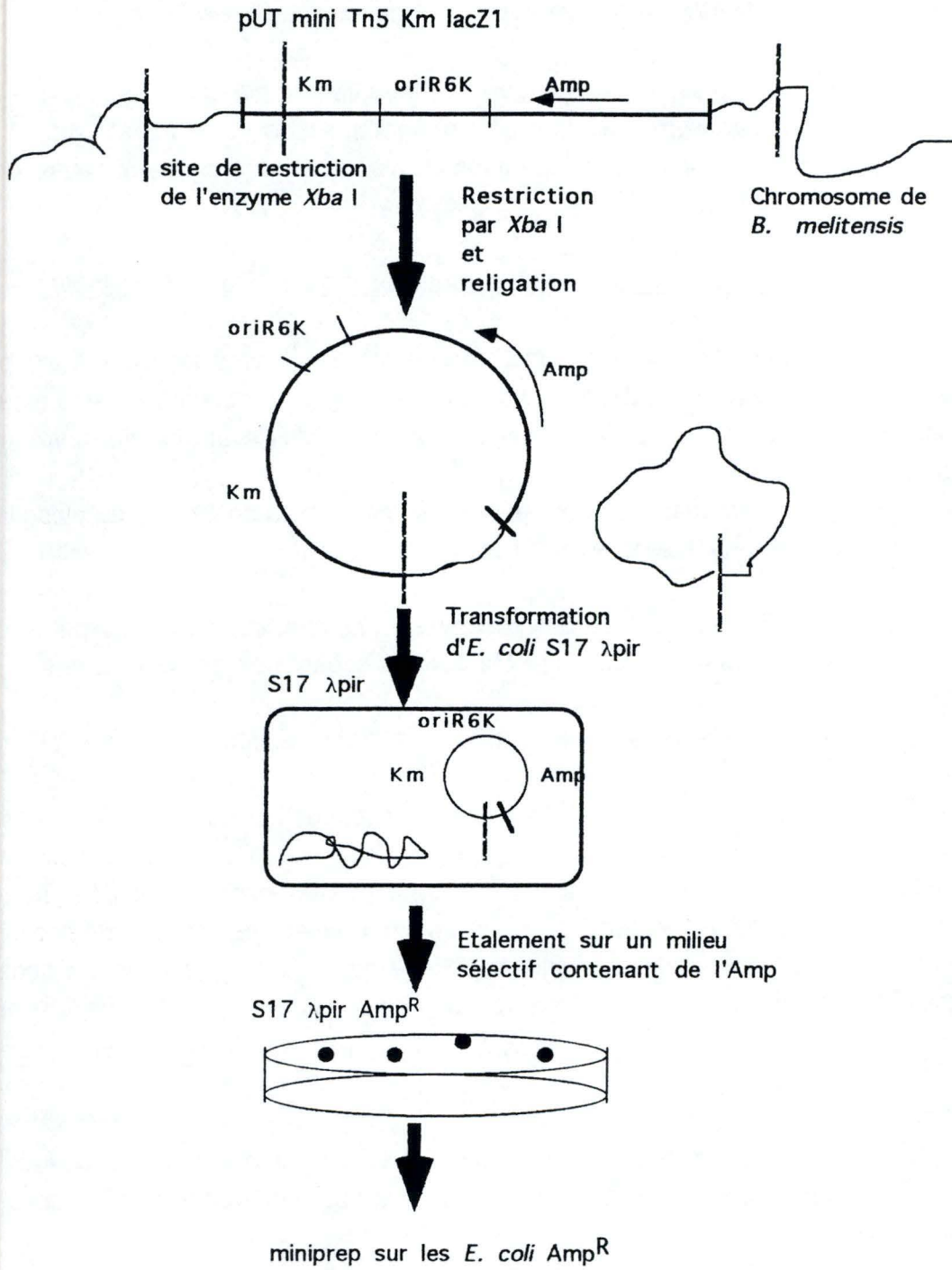


Figure IV.7: Représentation schématique d'une méthode de récupération du plasmide *pUTminiTn5KmlacZ1* intégré dans le génome de clones *B. melitensis* *Km*<sup>R</sup> *Amp*<sup>R</sup>.

Aucun des fragments attendus n'est observé lors des southern blot sur l'ADN génomique des clones de *B. melitensis* Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup>.

Néanmoins sur l'ADN de 5 de ces clones un fragment nettement supérieur à 8 kb (environ 20 kb) a été détecté. Pour ces 5 clones, l'ADN n'est pas totalement restreint.

### Discussion

A ce stade du travail, nous avons donc isolé 671 clones ayant un phénotype Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup>. De plus, un clone Km<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup> Lac<sup>+</sup> a été identifié. L'ADN de ce clone n'a pas été analysé par southern blot mais l'hypothèse suivante peut expliquer son phénotype. Ce clone serait un mutant transpositionnel et l'insertion du gène reporter *lacZ* pourrait avoir placé ce gène sous le contrôle d'un promoteur de *Brucella* actif sur le milieu bactériologique utilisé (LB); expliquant le phénotype Lac<sup>+</sup>.

Par les résultats de 3 tests nous avons montré que les clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> issus de la conjugaison appartiennent à l'espèce *B. melitensis* : l'agglutination et la mise en évidence du gène de la bactéroferritine par PCR et par southern blot.

Lors des southern blot sur l'ADN génomique de 7 clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup>, l'hybridation de 3 sondes différentes (Km, *lacZ* et Amp) n'a permis de détecter ni la matrice plasmidique ni le transposon. Concernant la détection des fragments d'environ 20 kb chez 5 de ces clones, nous ne pouvons avancer aucune hypothèse pour l'expliquer (à l'exception d'une hybridation non spécifique à l'ADN non restreint qui s'accumule aux environs de 20 kb).

Les phénotypes Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> sont donc encore inexpliqués, l'analyse par southern blot ne prouvant pas le génotype Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup>. Nous essayerons de montrer l'intégration hypothétique du plasmide en le récupérant suite à une restriction du génome. Nous tenterons aussi de prouver que le plasmide (Amp<sup>R</sup>) est suicide dans *Brucella* sp. (Sangari et Agüero, 1991), donc qu'il ne s'y réplique pas.

#### 1.4. Essai de récupération du plasmide dans le génome des clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> de *B. melitensis*

La résistance à l'Amp des clones de *B. melitensis* issus de la conjugaison pourrait résulter de l'intégration du plasmide dans le génome (de Lorenzo *et al.*, 1990). Dans ce cas, le plasmide pourrait être récupéré par la méthode présentée à la figure IV.7. Il faut, dans la première étape, choisir une enzyme qui ne possède pas de site de restriction dans l'origine de répllication oriR6K du pUTminiTn5Km *lacZ*1 (figure IV.8) et qui permet de conserver le marqueur de sélection du plasmide, le gène *bla*. Par exemple, les enzymes de restriction *Xba* I et *Eco* RI répondent à ces critères. Si le plasmide est présent dans le génome, il sera excisé par restriction et après circularisation des fragments (par ligation), il sera introduit dans *E. coli* par transformation. L'acquisition de la résistance à l'Amp par des

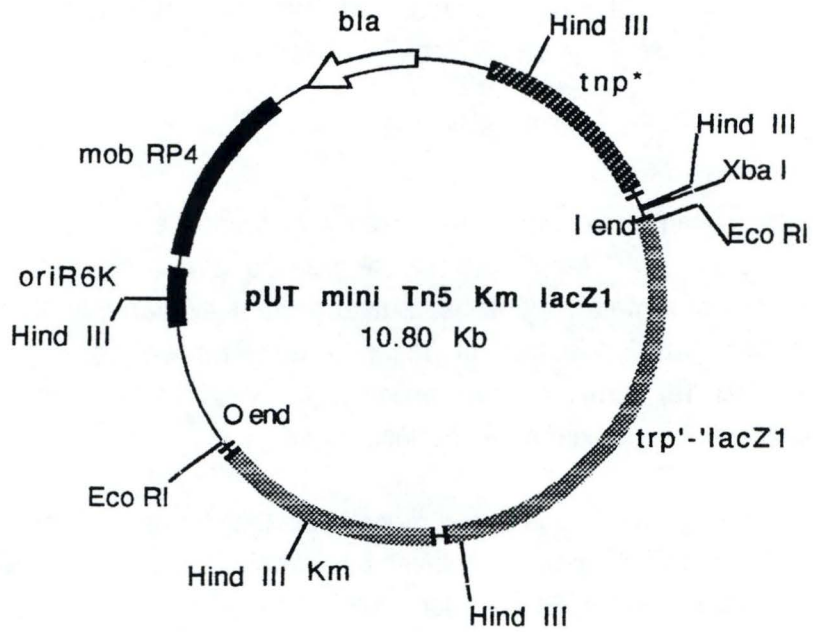


Figure IV.8: Carte de restriction du pUTminiTn5KmlacZ1 (sites *Eco RI*, *Xba I* et *Hind III*).

clones d'*E. coli* devrait montrer que le plasmide a été excisé. La souche d'*E. coli* utilisée, S17  $\lambda$ pir, permet la réplication des plasmides contenant l'origine de réplication oriR6K.

Le contrôle positif est le plasmide pUTminiTn5Km lacZ1 restreint par *Eco* RI et ayant subi les étapes de récupération décrites à la figure IV.7. Après transformation des *E. coli* un plasmide a été récupéré par miniprep des colonies d'*E. coli* Amp<sup>R</sup> et visualisé sur un gel d'agarose. Cette technique permet donc de récupérer des fragments plasmidiques reliqués et réplcatifs.

En guise de contrôle négatif, la technique de récupération d'un plasmide intégré a été appliquée en utilisant l'enzyme *Hind* III sur l'ADN de 2 clones Amp<sup>R</sup>. L'enzyme *Hind* III possède un site de restriction dans la séquence oriR6K, aucun des fragments reliqués ne sera donc réplcatif dans *E. coli* (figure IV.8). Comme prévu, aucune colonie d'*E. coli* Amp<sup>R</sup> n'a été isolée.

L'ADN génomique de 2 clones de *B. melitensis* Amp<sup>R</sup> a été restreint par *Xba* I. Si notre hypothèse d'intégration est correcte, la religation des fragments obtenus doit engendrer des plasmides dont certains contiendront l'oriR6K leur permettant de se répliquer, et le gène marqueur *bla* (sélection en présence d'Amp). Après transformation avec le mélange de religation, plus d'une vingtaine de colonies d'*E. coli* sont apparues sur le milieu sélectif contenant de l'ampicilline.

Plusieurs miniprep d'ADN plasmidique ont été réalisées afin de mettre en évidence le fragment reliqué réplcatif dans les bactéries d'*E. coli* Amp<sup>R</sup>. Aucune tentative de récupération d'ADN plasmidique n'a permis de mettre en évidence un plasmide dans les bactéries *E. coli* Amp<sup>R</sup>.

Dans une seconde tentative de récupération, l'ADN génomique de 3 clones de *B. melitensis* Amp<sup>R</sup> a été restreint par *Eco* RI. La technique de récupération a été appliquée et a conduit à l'isolement de 3 colonies d'*E. coli* Amp<sup>R</sup>.

Aucun des protocoles de miniprep appliqué n'a permis de montrer la présence d'un plasmide dans ces 3 colonies d'*E. coli* Amp<sup>R</sup>.

Rappelons, qu'aucun mutant d'*E. coli* spontanément résistant à l'Amp n'est détecté dans les contrôles négatifs.

La résistance à l'ampicilline des colonies d'*E. coli* est supposée être due au plasmide pUTminiTn5lacZ1 récupéré du génome de clones de *B. melitensis* Amp<sup>R</sup>, mais aucune récupération plasmidique n'a permis de le montrer.

## I. 5. Essai de récupération d'un plasmide répliatif à partir des clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> de *B. melitensis*

Nous n'avons toujours pas expliqué la résistance à l'ampicilline de la majorité des clones de *B. melitensis* issus de la conjugaison. Nous vérifierons dans cette étape que le plasmide pUT est suicide chez *Brucella* sp.

Des récupérations d'ADN plasmidique (minipreps) ont été réalisées sur 5 clones de *B. melitensis* Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> issus de la conjugaison et sur un témoin *B. abortus* contenant le plasmide répliatif pARBlacZ (Cm<sup>R</sup>).

L'analyse de ces minipreps par électrophorèse en gel d'agarose n'a pas mis en évidence d'ADN plasmidique chez les clones de *B. melitensis* Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup>, seul le plasmide pARBlacZ a été visualisé. Le plasmide étant peut-être trop dilué pour être visible, les minipreps ont été utilisées pour transformer des bactéries *E. coli* S17  $\lambda$ pir afin d'augmenter le nombre de copies du plasmide. La totalité du mélange de transformation est étalée sur milieu sélectif. Pour chacune des 5 miniprep, plus de 20 colonies d'*E. coli* Amp<sup>R</sup> ont été isolées.

Les témoins de transformation utilisés sont:

- la miniprep du plasmide pARBlacZ ainsi qu'une préparation plus concentrée du plasmide pARBlacZ (midiprep) utilisée pour transformer la souche d'*E. coli* XL1-blue.
- le plasmide pUTminiTn5Km lacZ1 pour transformer la souche d'*E. coli* S17  $\lambda$ pir.

Les témoins de croissance utilisés sont:

- des bactéries *E. coli* S17  $\lambda$ pir non transformées et étalées sur un milieu contenant de l'Amp.

Tous les témoins ont donné les résultats attendus. Les transformations sont donc efficaces et des mutants d'*E. coli* S17  $\lambda$ pir spontanément résistants à l'Amp ne sont pas détectés.

Des miniprep ont été réalisées afin de mettre en évidence le plasmide pUTminiTn5Km lacZ1 dans plus de 30 colonies d'*E. coli* S17  $\lambda$ pir Amp<sup>R</sup>. Aucune des tentatives de récupération d'ADN plasmidique n'a permis de mettre en évidence le plasmide.

### Discussion

Toutes les récupérations d'ADN plasmidique à partir des colonies d'*E. coli* S17  $\lambda$ pir Amp<sup>R</sup> sont restées sans résultat, la présence du plasmide dans le génome des clones de

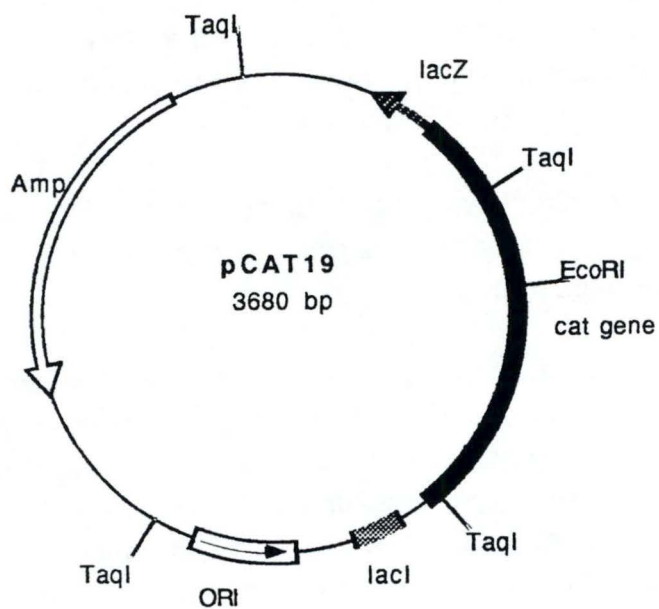


Figure IV.9: a/ Carte de restriction du plasmide pCAT19

```

TaqI                               RBS
1  TCGAGATTTTCAGGAGCTTAAGGAAGCTAAA ATG GAG AAA AAA ATC ...//..
1                               M E K K I

667 GAT GAG TGG CAG GGC GGG GCG TAA TTTTTTTAAGGCAGTTATT ...//..
213 D  E  W  Q  G  G  A  *

794 CICTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGA
      XbaI           BamHI       TaqI

```

b/ Séquence du gène *cat*.

*B. melitensis* Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> n'a donc pas pu être démontrée. La cointégration n'a donc été prouvée ni par southern blot, ni par récupération du plasmide.

La présence du pUTminiTn5Km lacZ1 chez *B. melitensis* sous forme libre (et donc répliquative) n'a pas davantage été démontrée.

Le phénotype Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> des clones de *B. melitensis* résultant de la conjugaison reste donc sans explication.

Le plasmide pUTminiTn5Km lacZ1, utilisé comme système de transfert de transposon dans cette conjugaison, ne nous a pas permis d'isoler efficacement des mutants transpositionnels de *B. melitensis*. Pour atteindre notre but, c'est-à-dire la construction d'une banque de mutants transpositionnels de *B. melitensis*, nous décidons de modifier le plasmide utilisé. La matrice et le miniTn5 qui ont déjà été décrits comme système de transposition efficace chez *B. abortus* sont conservés (Sangari et Agüero, 1991). Par contre, le gène *lacZ* sera remplacé par un autre gène reporter, le gène *cat* encodant l'enzyme responsable de la résistance au chloramphénicol.

## II. Utilisation du plasmide pUTminiTn5Kmcats

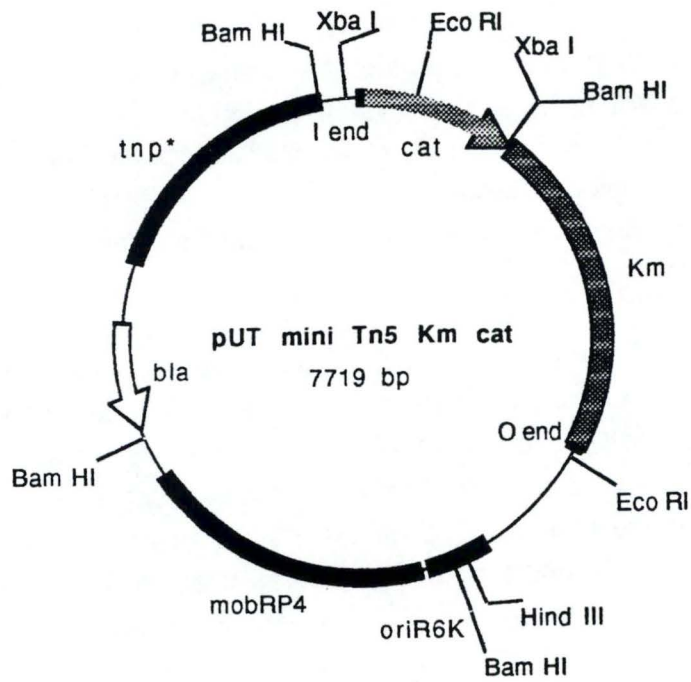
### II.1. Construction du plasmide pUTminiTn5Kmcats

La construction du plasmide pUTminiTn5Kmcats a été réalisée par l'insertion d'un fragment de 819 pb contenant le gène *cat* sans promoteur, dans la matrice plasmidique du pUTminiTn5Km.

Le plasmide pCAT19 restreint par l'enzyme *Taq* I génère un fragment de 819 pb contenant le gène *cat* et 3 autres fragments (la position des sites *Taq* I est présentée à la figure IV.9.a). Le fragment *Taq* I de 819 pb contient la totalité de la séquence codante (ORF) de *cat*, ainsi que son ATG et le site de fixation au ribosome qui sont nécessaires à la traduction (figure IV.9.b).

Le plasmide pUTminiTn5Km lacZ1 restreint par *Sfi* I génère le fragment de la matrice plasmidique de 6,9 kb et un fragment de 3,3 kb contenant le gène *lacZ1*. Les fragments de chaque mélange de restriction ont ensuite été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et les 2 fragments de 819 pb et de 6,9 kb sont récupérés. Les extrémités protrudantes *Taq* I et *Sfi* I ont été rendues compatibles (bouts francs) par l'activité de la T4 DNA polymérase.

Environ 40 ng de matrice et environ 40 ng du gène *cat* ont été mis en présence dans un tampon de ligation contenant la T4 DNA ligase. Les molécules d'insert (gène *cat*) étaient donc présentes en large excès par rapport aux molécules de matrice. Des bactéries *E. coli* S17  $\lambda$ pir ont été transformées avec le mélange de ligation et étalées sur un milieu sélectif contenant Amp et Km.



Restriction par <i>Eco RI</i>	Restriction par <i>Xba I</i>	Restriction par <i>Bam HI</i>
Taille des fragments attendus (pb):	Taille des fragments attendus (pb):	Taille des fragments attendus (pb):
2000 5450	6800 820	3000 2000 1850 820

Figure IV.10: a/ Carte de restriction du plasmide pUTminiTn5Kmcats et taille approximative des fragments obtenus par restriction avec *Eco RI*, *Xba I* et *Bam HI*.

Figure IV.10: b/ Profil de restriction de 2 miniprep d'ADN plasmidique.

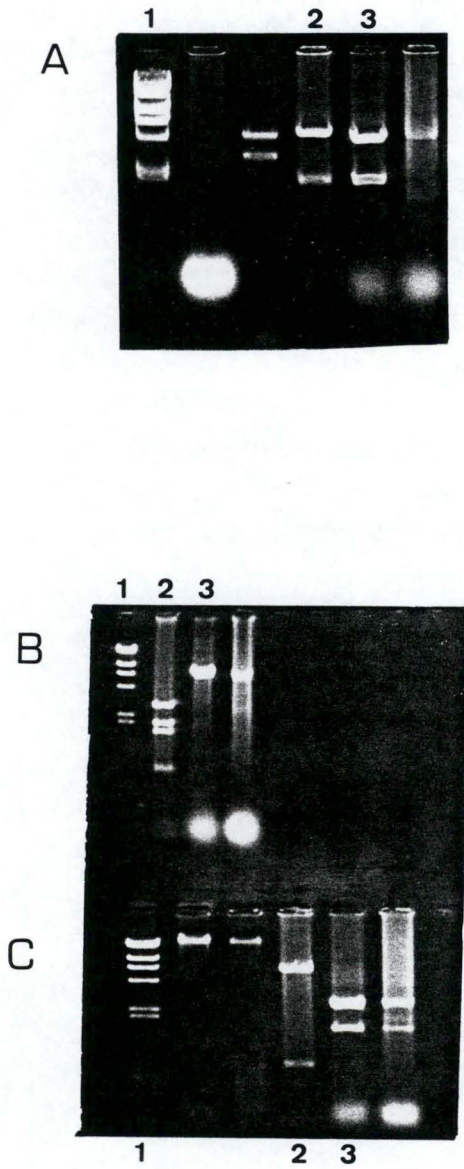
Piste 1: marqueur de taille, ADN du phage  $\lambda$  / *Hind* III

Construction issues du mélange de ligation pUTminiTn5Km-insert *cat*: Pistes 2 et 3.

A. restriction par *Eco* RI

B. restriction par *Bam* HI

C. restriction par *Xba* I



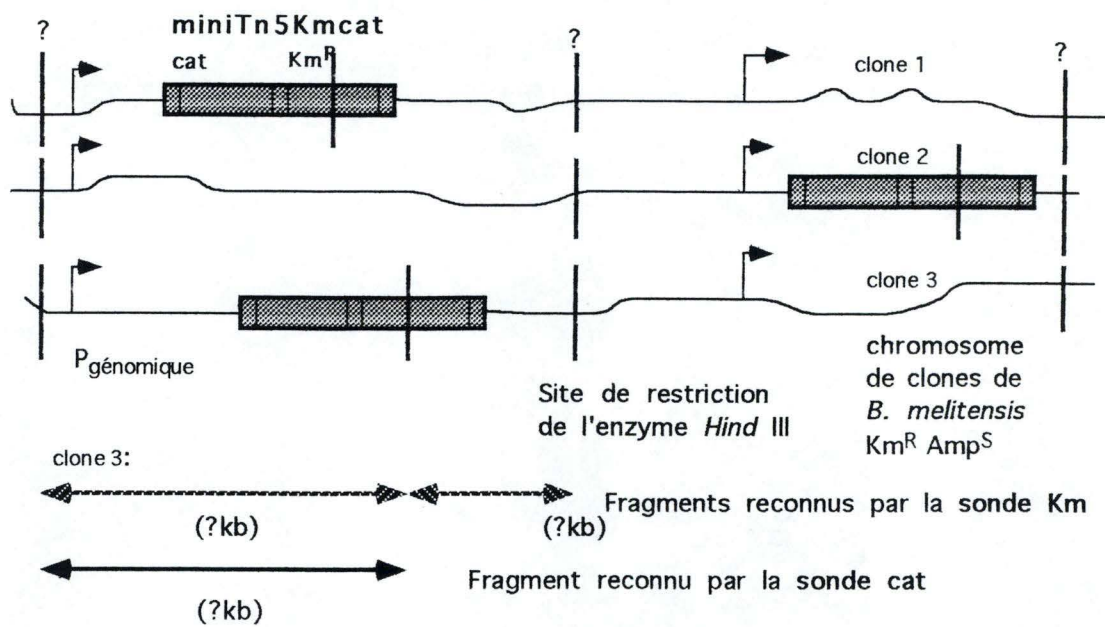


Figure IV.11: Schéma montrant la position variable du transposon dans le chromosome de 3 clones de *B. melitensis* *Km<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup>*.

La variabilité de la taille des fragments *Hind* III s'hybridant aux sondes *cat* et *Km* apparaît clairement.

Quinze colonies ont été choisies au hasard et leur ADN plasmidique a été extrait par miniprep. L'analyse en gel d'agarose de ces miniprep après restriction avec *Eco* RI montre que 2 clones présentent le profil de restriction attendu c'est à dire deux fragments d'environ 2 kb et 5,4 kb. Ces 2 plasmides ont été restreints par *Xba* I et par *Bam* HI. L'analyse par électrophorèse en gel d'agarose montre que seul le clone 1 présente les fragments de taille attendue pour ces deux restrictions (figure IV.10). Le plasmide ainsi construit est nommé pUTminiTn5Kmc<sup>at</sup>.

Ce nouveau vecteur de transposition sera utilisé, dans la suite du travail, comme système de transfert de transposon afin de créer une banque de mutants transpositionnels chez *B. melitensis*. Le transfert du plasmide se faisant par conjugaison entre la souche donneuse *E. coli* S17  $\lambda$ pir et la souche receveuse *B. melitensis* 16M, le plasmide pUTminiTn5Kmc<sup>at</sup> construit a d'abord été introduit dans des bactéries *E. coli* S17  $\lambda$ pir par transformation.

## II.2. Isolement de clones Km<sup>R</sup> de *B. melitensis*

Le nouveau vecteur de transposition, le pUTminiTn5cat a été transféré dans la souche *B. melitensis* 16M (NaI<sup>R</sup>) par conjugaison avec des bactéries *E. coli* S17  $\lambda$ pir donneuses. Le miniTn5cat peut ensuite s'insérer dans le génome de *Brucella* sp. et ainsi engendrer des mutants. Le gène reporter *cat* peut ainsi être placé sous le contrôle d'un promoteur génomique de *B. melitensis* situé en amont du site de transposition.

L'expression du gène *cat* dans les mutants transpositionnels de *Brucella* sp. sera détectée par leur résistance au chloramphénicol.

Suite à la conjugaison, plusieurs clones de *B. melitensis* résistants à la kanamycine ont été isolés. Parmi 40 clones de *B. melitensis* Km<sup>R</sup> repiqués sur un milieu sélectif Amp<sup>100</sup>, 38 clones présentaient le phénotype Km<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup>. Ce phénotype Km<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup> résulterait de la transposition du miniTn5Kmc<sup>at</sup> et de la perte du plasmide pUT (non répliatif).

Afin de prouver que ce phénotype Km<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup> correspond à des mutants transpositionnels, plusieurs sondes spécifiques du transposon ou du plasmide seront hybridées sur l'ADN génomique de clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup>. L'analyse par southern blot de quelques clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> sera également réalisée.

## II.3 Southern blot sur l'ADN génomique de clones de *B. melitensis* Km<sup>R</sup>Amp<sup>S</sup>

L'ADN génomique de 6 clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup> a été extrait et restreint par l'enzyme *Hind* III; les fragments séparés en gel d'agarose et l'ADN transféré sur une membrane de nylon.

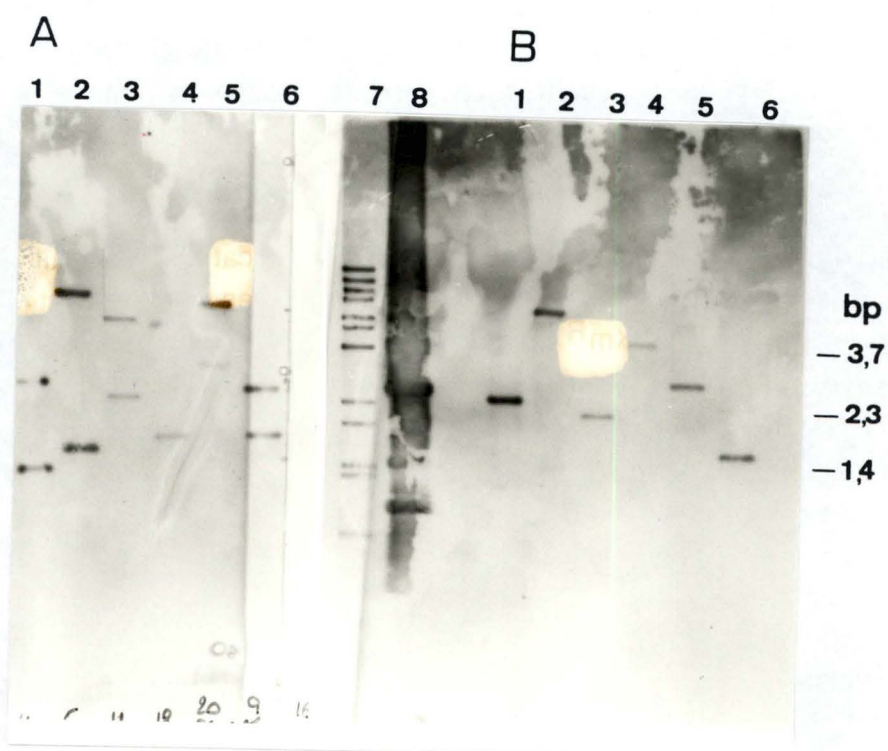


Figure IV.12: Southern blot sur l'ADN génomique de clones de *B. melitensis* Km<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup>.

A. Hybridation avec la sonde Km.

B. Hybridation avec la sonde cat.

Pistes 1 à 6: ADN génomiques des clones Amp<sup>S</sup>/*Hind* III

Piste 7: marqueur de taille biotynilé  $\lambda$  DNA/*Bst* EII

Piste 8: plasmide pUTminiTn5Kmcat/*Hind* III

L'ADN fixé sur la membrane a ensuite été hybridé avec les sondes suivantes:

- sonde cat: le gène encodant la chloramphénicol acétyl transférase sur un fragment de 819 pb obtenu par restriction *Taq* I du plasmide pCAT19 (voir figure IV.9).
- sonde Km: le gène encodant la résistance à la kanamycine sur un fragment de 1282 pb obtenu par restriction *Eco*R I du plasmide pUC4K.
- sonde bfr: le gène encodant la bactéroferritine de *Brucella* sp. sur un fragment de 500 pb.
- sonde Amp: le plasmide pBluescript SK restreint par *Eco* RI.

Comme attendu, la sonde bfr détecte un fragment dans l'ADN des clones de *B. melitensis*.

Si le miniTn5 s'est inséré par transposition dans le génome des clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup> et étant donné la présence d'un site de restriction *Hind* III dans le miniTn5Kmcat, la sonde Km s'hybridera à 2 fragments de restriction alors que la sonde cat ne reconnaîtra qu'un seul fragment (figure IV.11). Ce profil d'hybridation avec les sondes Km et cat est observé pour l'ADN génomique des 6 clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup> analysés (figure IV.12).

De plus, la taille des fragments reconnus par ces 2 sondes est variable d'un clone à l'autre. Cette variabilité est le résultat du caractère aléatoire de la transposition: le site d'insertion du miniTn5Kmcat et par conséquent sa position par rapport aux sites *Hind* III dans le génome sont différents d'un clone à l'autre.

La sonde Amp ne détecte aucune bande dans l'ADN de clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup>, confirmant la perte de la matrice pUT.

Les résultats de southern blot démontrent que les clones de *B. melitensis* Km<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup> analysés résultent d'un événement de transposition du miniTn5cat, accompagné de la perte de la matrice plasmidique pUT. Ces constatations sont étendues aux autres clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup> isolés. Sur base de leur phénotype Amp<sup>S</sup>, nous supposons qu'ils proviennent également d'une transposition.

De plus, le nombre de fragments reconnus par les sondes Km et cat démontre qu'un seul transposon est présent dans les clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup> analysés. Le système utilisé assure en effet une insertion unique; le gène encodant la transposase étant à l'extérieur du transposon, sur le plasmide suicide.

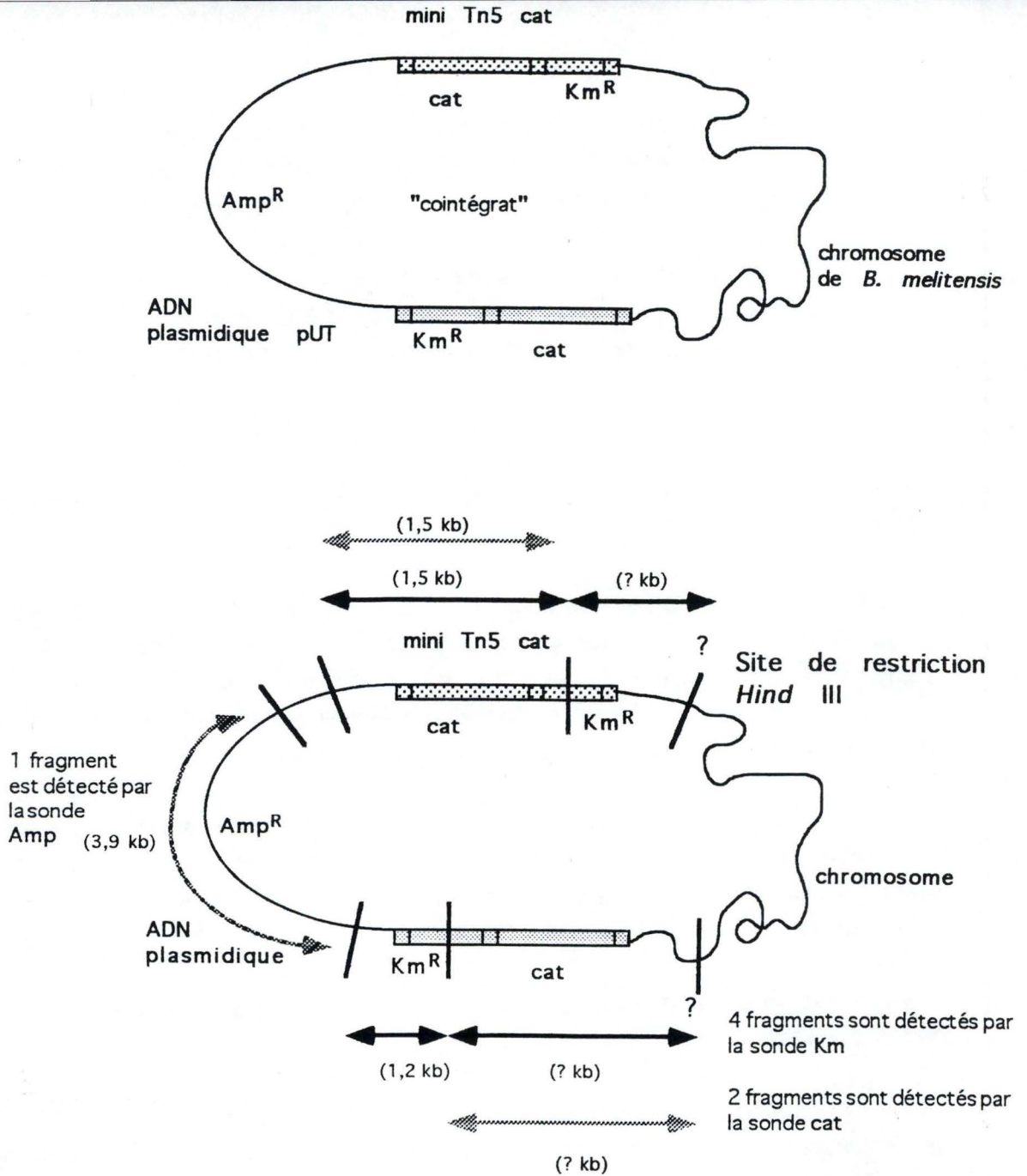


Figure IV.13: Représentation des fragments *Hind* III détectés par southern blot sur l'ADN d'un cointégrat avec le plasmide pUTminiTn5Kmcat.

	Conjugaison N°1	Conjugaison N°2	Conjugaison N°3	Total
clones $Km^R$ testés	40	394	336	770
clones $Km^R$ $Amp^S$	38 (95%)	317 (80%)	267 (79%)	622 (80%)

Tableau IV.3: Fréquence des clones  $Amp^S$  de *B. melitensis* parmi les clones  $Km^R$  isolés suite aux 3 conjugaisons.

#### II.4. Création d'une banque de mutants de *B. melitensis* par transposition du miniTn5Kmc<sup>at</sup>

On estime que le génome d'*E. coli* contiendrait environ 3800 gènes codant pour une protéine (Neidhardt *et al.*, 1990). La taille du génome de *Brucella* sp. étant inférieure à celle du génome d'*E. coli*, ce nombre de gènes pourrait être inférieur chez *Brucella* sp. Une banque de mutants transpositionnels idéale, c'est-à-dire représentative du génome de *Brucella* sp., devrait donc contenir plusieurs milliers de clones indépendants.

Nous disposons à présent de 38 clones Km<sup>R</sup>Amp<sup>S</sup> de *B. melitensis*. Afin d'obtenir une banque de mutants transpositionnels relativement représentative du génome de *B. melitensis*, il est nécessaire d'augmenter la taille de la collection de clones Amp<sup>S</sup>.

Deux nouvelles conjugaisons ont donc été réalisées entre *E. coli* S17 λpir contenant le pUTminiTn5Kmc<sup>at</sup> et *B. melitensis* 16M (NaI<sup>R</sup>).

Pour les 3 conjugaisons, un total de 770 clones de *B. melitensis* Km<sup>R</sup> ont été isolés (tableau IV.3). Parmi ces clones, 526 sont sensibles à l'ampicilline (Amp<sup>S</sup> 50 ou 100). Le pourcentage de clones Amp<sup>S</sup> varie d'une conjugaison à l'autre (50 à 95%) mais reste suffisant pour obtenir une banque de mutants.

Il est important de souligner ici que les clones Km<sup>R</sup> isolés suite à une conjugaison sont des clones indépendants. En effet, le protocole suivi (transfert du filtre de conjugaison sur milieu sélectif NaI Km) garantit qu'une bactérie ayant subi un événement de transposition ne conduira à l'isolement que d'un seul clone.

#### II.5. Analyse par southern blot de clones de *B. melitensis* Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup>

Le phénotype Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> d'un nombre non négligeable (au total 31%) de clones isolés suite au transfert conjugal du pUTminiTn5Kmc<sup>at</sup> pourrait être dû à la formation de cointégrats entre ce plasmide et le chromosome de *Brucella* sp. Cette formation résulterait du mécanisme de transposition (figure IV.4). Dans un cointégré, la matrice plasmidique flanquée de 2 copies du transposon miniTn5cat, est insérée dans le chromosome bactérien.

L'analyse par southern blot de l'ADN génomique de 6 clones de *B. melitensis* Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> montre qu'il s'agit de cointégrats (figure IV.13). Pour chaque clone, la sonde Amp s'hybride à 1 fragment, la sonde cat en reconnaît 2 et enfin, 4 fragments (dont les 2 reconnus par la sonde cat) sont détectés par la sonde Km (figure IV.14).

Donc, les clones de *B. melitensis* Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> isolés en utilisant le pUTminiTn5Kmc<sup>at</sup> proviendraient de la formation de cointégrats entre ce plasmide et le chromosome. Le

Figure IV.14: Southern blot sur l'ADN génomique de clones de *B. melitensis* Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup>.

A/ Hybridation avec la sonde Amp.

Pistes 1: marqueur de taille prébiotynilé  $\lambda$  DNA/*Hind* III

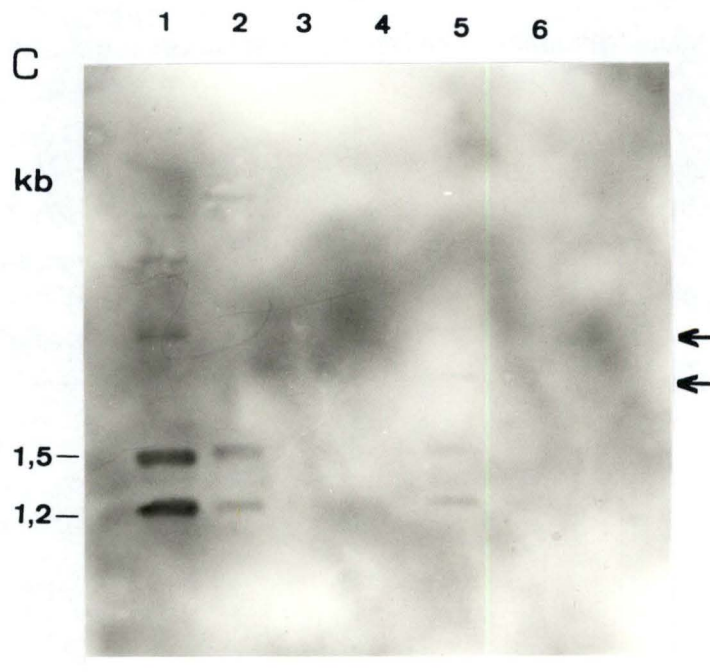
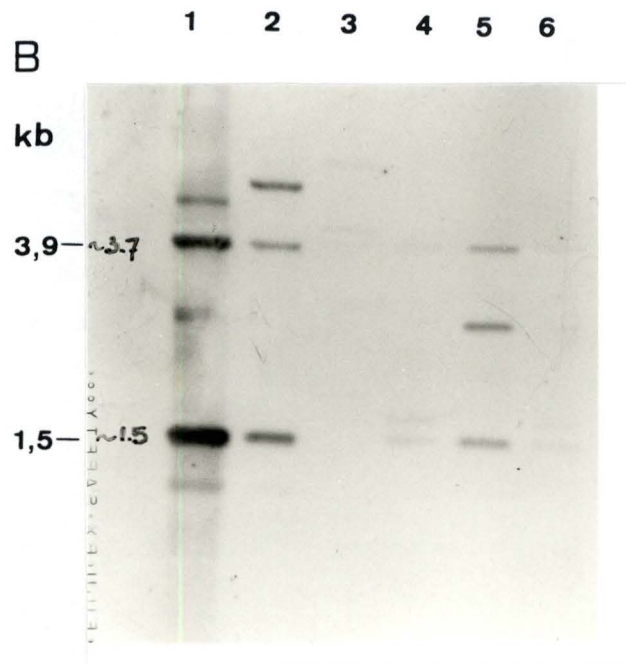
2: plasmide pUTminiTn5Kmcats

3: ADN génomique d'un clone Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup>/*Hind* III

B/ Hybridation avec la sonde Amp-cat et C/ Hybridation avec la sonde Km. La position des flèches indiquent les fragments de taille variable.

Pistes 1: plasmide pUTminiTn5Kmcats/*Hind* III

2 à 6: ADN génomiques de clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup>/*Hind* III



Sondes utilisées :	Plasmides témoins utilisés:						ADN de <i>B. melitensis</i> 16M (Nal <sup>R</sup> ) / <i>Hind</i> III	ADN génomique de <i>B. melitensis</i> mutantes (Nal <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> ) / <i>Hind</i> III (taille en kb)	
	pCAT19 / <i>Bam</i> HI		pUT mini Tn5 Km cat / <i>Hind</i> III		pUT mini Tn5 Km lacZ1/ <i>Hind</i> III		Fragments allumés:	5 Amp <sup>S</sup> Cms	6 Amp <sup>R</sup>
cat	+	0,9	+	1,5			—	+	+
								:1 bande	:2 bandes (1,5 et 1 variable)
Km	+	0,9 2,5	+	1,2 1,5	+	0,7 1,2	—	+	+
								:2 bandes	:4 bandes (1,2 1,5 et 2 variables)
Amp			+	3,9	+	3,9	—	—	+
									(3,9)

Tableau IV.4: Résultats des hybridations réalisées sur l'ADN de clones de *B. melitensis* 16M Km<sup>R</sup>.

LB+Nal Km +Cm <sub>3</sub>	+Cm <sub>10</sub>	+Cm <sub>30</sub>
20	1	0

Tableau IV.5: Croissance de 40 clones Km<sup>R</sup> de *B. melitensis* sur milieu LB en présence de concentrations croissantes en Cm.

Le nombre de clones résistants est présenté suivant la concentration en chloramphénicol.

Nombre de clones résistants: sur LB (Nal Km)	Nombre de clones Amp <sub>100</sub> <sup>S</sup>	Nombre de clones Amp <sup>S</sup> Cm <sub>3</sub> <sup>R</sup>	Nombre de clones Amp <sup>S</sup> Cm <sub>10</sub> <sup>R</sup>	Nombre de clones Km <sup>R</sup> Amp <sup>S</sup> et Cm <sub>10</sub> <sup>S</sup>
394	317	218	96	221
pourcentage de clones	80% des clones Km <sup>R</sup> testés	69% des clones Amp <sup>S</sup>	30% des clones Amp <sup>S</sup>	70% des clones Amp <sup>S</sup>

Tableau IV.6: Croissance de 394 clones Km<sup>R</sup> de *B. melitensis* isolés lors de la seconde conjugaison en présence d'Amp<sub>100</sub> ou de Cm<sub>3</sub> ou 10. 317 clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup>.

tableau IV.4 récapitule les résultats de l'analyse par southern blot des clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> et des clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup>.

Nous disposons donc à présent de clones de *B. melitensis* qui sont des mutants transpositionnels contenant le miniTn5cat. L'expression du gène *cat* nous permettra de détecter l'induction préférentielle de promoteurs de *B. melitensis* en fonction des conditions de croissance.

### **III. Induction *in vitro* du gène reporter *cat* des mutants transpositionnels de *B. melitensis* 16M**

#### III.1. Mise en évidence de l'expression du gène *cat*

Rappelons qu'en théorie, le gène reporter *cat* devrait le plus souvent s'être inséré par transposition en aval d'un promoteur de *Brucella*. L'induction de ce promoteur se traduira par l'expression du gène *cat*. L'expression de *cat* est mise en évidence par la résistance des clones de *Brucella* au chloramphénicol. La force du promoteur chromosomique et donc le taux d'expression du gène *cat* déterminent le niveau de résistance au Cm.

Nous avons donc évalué la capacité de résistance au Cm des 38 clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup> et des 2 clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> isolés suite à la première conjugaison, en conditions de culture *in vitro*, sur milieu bactériologique riche (LB). Trois concentrations de Cm ont été testées : 3, 10 et 30 µg/ml.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau IV.5.

On peut constater qu'aucun des clones testés ne résiste à la concentration de 30 µg/ml en Cm. Cette concentration est donc trop élevée par rapport au niveau d'expression du gène *cat*. De plus, parmi les clones exprimant *cat*, un plus grand nombre résiste au Cm<sub>3</sub> qu'au Cm<sub>10</sub>. Ce test de croissance en présence de Cm ne détecte pas d'induction du gène reporter *cat* chez la moitié des clones testés.

Dans les tests suivants, les clones exprimant le gène *cat* seront sélectionnés en présence de Cm à 3 et à 10 µg/ml.

Les 394 clones isolés suite à la seconde conjugaison ont été testés sur un milieu contenant de l'ampicilline et sur des milieux contenant des concentrations croissantes en Cm.

Les résultats sont présentés dans le tableau IV.6.

Induction <i>in vitro</i> N°1 sur les milieux:		
LB (Nal Km)	LB glucose (Nal Km)	BABS (Nal Km)
148 (dont aucun Cm <sub>10</sub> <sup>R</sup> ) (68%) Cm <sub>10</sub> <sup>R</sup>	16 (dont 6 Cm <sub>10</sub> <sup>R</sup> ) (7%)	58 (dont 26 Cm <sub>10</sub> <sup>R</sup> ) (26%) Cm <sub>10</sub> <sup>R</sup>

Induction <i>in vitro</i> N°2 sur les milieux:		
LB (Nal Km)	LB glucose (Nal Km)	BABS (Nal Km)
121 (56%)	81 (37%)	39 (18%)

Tableau IV.7: Expression du gène *cat* *in vitro* en fonction du milieu bactériologique.

Nombre et pourcentage de clones résistants au Cm<sub>3</sub> pour les 215 clones mutants transpositionnels Amp<sup>S</sup> de *B. melitensis* testés.

On peut constater, comme précédemment, qu'un pourcentage plus élevé de clones résiste à une concentration en Cm de 3 µg/ml (69%) qu'à celle de 10 µg/ml (30%). Environ 31% des clones Amp<sup>S</sup> sont sensibles au Cm<sub>3</sub>.

Parmi ces 394 mutants, 221 (70%) sont Amp<sup>S</sup> et Cm<sub>10</sub> sensibles. Ces mutants transpositionnels sur milieu LB n'expriment pas le gène reporter *cat* ou l'expriment à un taux trop faible pour résister à 10 µg/ml de Cm.

### III.2. Effet de la composition du milieu sur l'expression du gène *cat*.

L'effet de la composition du milieu bactériologique sur l'expression du gène reporter *cat* a été testé sur 215 des 221 mutants Amp<sup>S</sup> Cm<sub>10</sub><sup>S</sup> issus de la seconde conjugaison.

Les milieux d'induction riches testés sont les suivants:

- LB
- LB+ 1% de glucose
- BAB+ 5% de sérum bovin

Les 215 clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup> Cm<sub>10</sub><sup>S</sup> ont été repiqués sur chacun des trois milieux bactériologiques riches contenant du Cm à 3 µg/ml et à 10 µg/ml. Ce test de sélection des clones contenant des fusions transcriptionnelles induites a été répété sur les 3 milieux mais uniquement en présence de Cm à 3 µg/ml. Le nombre de clones résistants pour chacun des 2 tests est présenté dans le tableau IV.7 en fonction du milieu de croissance.

Il apparaît clairement que le nombre de clones exprimant *cat* varie en fonction du milieu mais aussi d'une expérience à l'autre pour un même milieu. Cependant, les résultats obtenus prouvent qu'en modifiant un ou plusieurs paramètres de la culture, on observe l'induction du gène reporter *cat* dans certains clones. Le taux d'expression de ce gène (et donc le niveau d'induction) est assez variable en fonction des clones. Par exemple, 6 clones résistent au Cm<sub>10</sub> en présence de glucose alors que leur phénotype, en l'absence de glucose, est Cm<sub>3</sub><sup>S</sup>.

En ce qui concerne la reproductibilité de l'induction, il faut signaler que pour chaque milieu, tous les clones identifiés comme Cm<sub>3</sub><sup>R</sup> au cours de l'expérience qui en sélectionne le moins, sont aussi détectés comme Cm<sub>3</sub><sup>R</sup> dans l'autre test. L'induction de *cat* (et donc du gène et/ou promoteur de *Brucella* situé en amont) sera dite reproductible pour les clones (on en dénombre 151) qui sur un milieu donné, montrent le même profil de résistance au Cm<sub>3</sub> dans les 2 expériences.

La détection de l'induction du gène *cat* n'est pas reproductible pour les autres clones; deux raisons sont proposées pour expliquer cette variabilité. L'expression de beaucoup de gènes bactériens est influencée par de multiples facteurs environnementaux (Rankin *et al.*,

Sur le milieu LB	Sur le milieu LB glucose	Sur le milieu BAB's	Nombre de clones
+	+	+	13
+	+	-	2
+	-	+	0
+	-	-	72
-	-	+	1
-	-	-	63
-	+	+	0
-	+	-	0

Tableau IV.8: Classement des 151 clones (à profil de résistance au Cm<sub>3</sub> reproductible) en fonction de l'effet du milieu de culture sur l'induction de *cat*.

+: croissance sur Cm<sub>3</sub>

-: sensibilité au Cm<sub>3</sub>

1994). Dans les conditions d'induction testées ici, plusieurs paramètres ne sont pas maîtrisés. Par exemple, le pH du milieu de culture n'est pas vérifié; le pourcentage de CO<sub>2</sub> dans l'incubateur et la température de cet incubateur ne sont pas constants tout au long de l'incubation. D'autres paramètres sont hors de notre contrôle lors des tests d'induction.

D'autre part, la détection de l'expression de *cat* est de type tout ou rien. Pour être identifié comme contenant une fusion transcriptionnelle induite, un clone doit exprimer suffisamment *cat* pour résister au Cm. Si, lors de la répétition du test, le taux d'expression de *cat* tombe sous ce niveau, le clone est considéré comme "non-induit". Un procédé de détection plus sensible de l'induction de *cat* consisterait à doser la protéine Cat par ELISA.

Lors d'une expérience d'induction, il est donc préférable d'introduire le moins de variabilité possible et par conséquent, de ne faire varier qu'un paramètre à la fois. Par exemple, trop de constituants différents entre le milieu LB et le milieu BABS pour identifier celui qui serait responsable d'une induction.

Pour les 151 clones dont l'induction est dite reproductible, les résultats de l'induction ont été comparés d'un milieu à l'autre (tableau IV.8). Par exemple, dans 13 clones, le gène reporter est exprimé sur les 3 milieux testés, suggérant qu'il est sous le contrôle d'un promoteur constitutif de *B. melitensis*. On dénombre également beaucoup de clones (72) exprimant le gène *cat* uniquement sur le milieu LB. Un composant des 2 autres milieux plus riches (comme le glucose) pourrait être responsable de la répression du promoteur contrôlant *cat* dans certains de ces clones. On constate aussi que 63 clones sont sensibles au Cm indépendamment du milieu. Dans ces clones, le gène reporter peut soit, être situé derrière un promoteur qui n'est induit que dans des conditions plus spécifiques (déficience en un élément comme le fer ou croissance *in vivo*, par exemple), soit n'être sous la dépendance d'aucun promoteur chromosomique.

### III.3. Effet de la température sur la croissance des mutants transpositionnels et sur l'expression de *cat*.

Une induction de promoteurs de *B. melitensis* suite à une élévation de la température a aussi été réalisée. *Brucella* sp. croît optimalement à 37°C et il a été montré que certains de ses gènes sont induits par un choc thermique (par exemple les gènes encodant les heat shock proteins ou hsp) (Lin *et al.*, 1992).

Dans ce test, 201 mutants transpositionnels (Amp<sup>S</sup>) de *B. melitensis* ont été repiqués sur un milieu LB contenant du Cm (3 µg/ml) et incubés à 40°C. Pour permettre aux bactéries d'exprimer le gène *cat* avant d'entrer en contact avec le Cm, le milieu utilisé est une bicouche: le Cm contenu dans la couche inférieure diffuse progressivement dans toute l'épaisseur du milieu.

Croissance à 37°C	Croissance à 40°C	Nombre de clones:
+	+	92
+	-	47
-	+	24
-	-	37

Tableau IV.9: Classement des 201 clones testés en fonction de l'effet de la température sur la résistance au Cm<sub>3</sub>.

Cinq pourcents des 201 clones ne montrent aucune croissance même en absence de Cm. Dans ces 11 clones, l'insertion du transposon pourrait avoir entraîné la disruption d'un gène essentiel à la survie à 40°C. Il s'agirait peut-être de 11 mutants thermosensibles.

Une comparaison de la résistance au Cm<sub>3</sub> des clones testés à 37°C et à 40°C a été réalisée. Les résultats sont présentés dans le tableau IV.9.

On peut constater que l'expression du gène *cat* ne semble pas influencée par cette augmentation de température chez une majorité des clones. En effet, 92 clones ont un phénotype Cm<sub>3</sub><sup>R</sup> à 37°C comme à 40°C.

Parmi les 47 clones sensibles au Cm suite au choc thermique, on retrouve les mutants incapables de survivre à 40°C même en l'absence de Cm. Dans les autres clones le gène *cat* serait inséré en aval d'un promoteur réprimé à 40°C. Par contre chez 24 clones, l'expression du gène *cat* serait induite par l'augmentation de la température. Certains de ces clones pourraient contenir une fusion transcriptionnelle à un des gènes encodant des protéines hsp.

De plus, les 13 clones montrant une résistance au Cm<sub>3</sub> sur les trois milieux riches testés précédemment (voir Tableau IV.8), sont toujours résistants au Cm<sub>3</sub> suite au choc thermique. Cette observation suggère à nouveau le caractère constitutif de l'expression du promoteur contrôlant *cat* dans les clones.

Parmi les 63 clones sensibles au Cm<sub>3</sub> sur les trois milieux riches, 20 clones montrent une résistance au Cm suite au choc thermique. Dans ces 20 clones, la transposition aurait placé le gène *cat* en aval d'un promoteur qui serait induit par la température, mais pas par la composition des milieux riches.

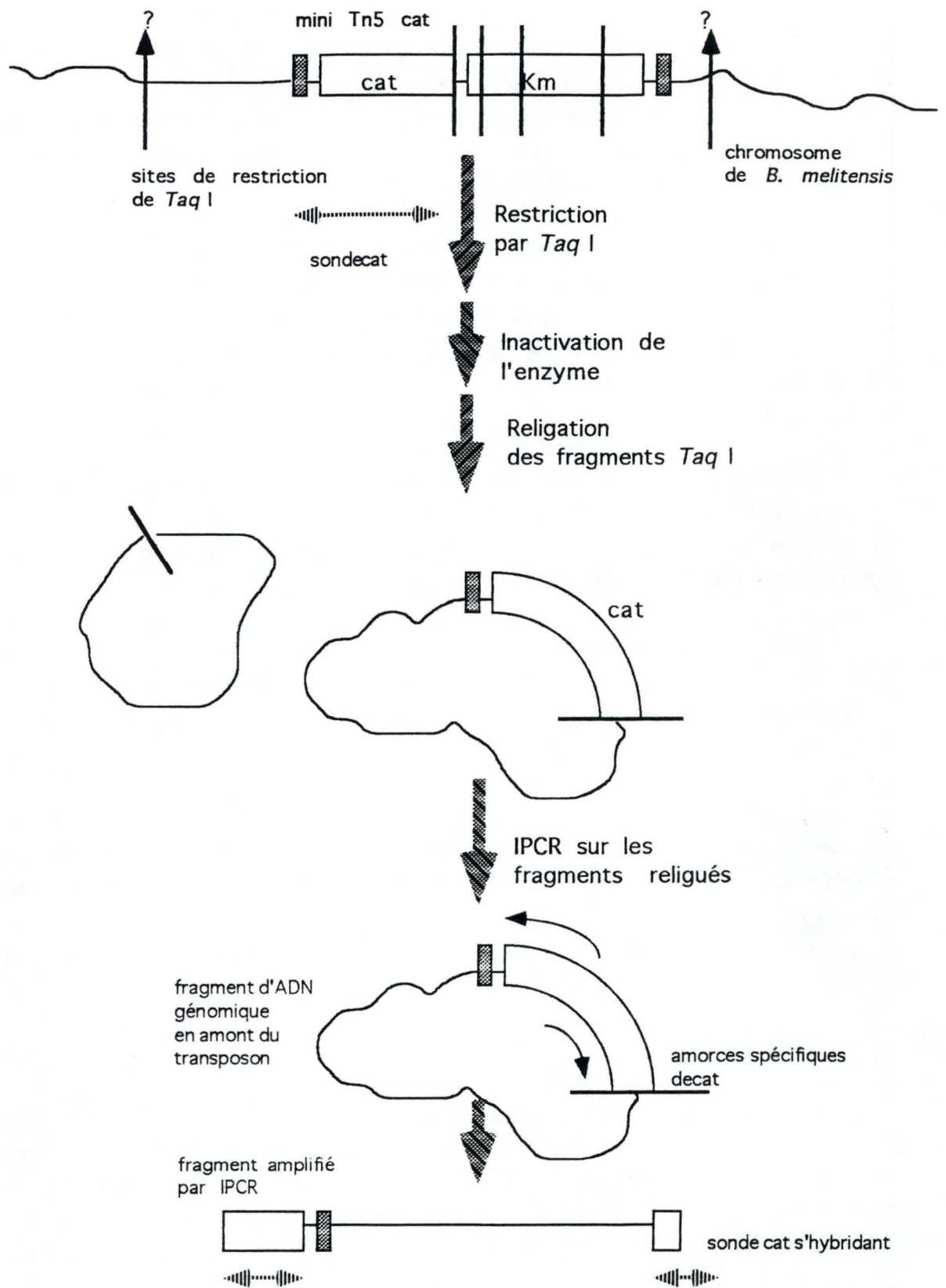
Remarquons que lors de ce test, le choc thermique n'est pas le seul facteur variable; la concentration en Cm est aussi une variable. En effet, dans les milieux incubés à 40°C, l'antibiotique diffuse du bas vers le haut. Alors que la concentration en Cm pour les milieux placés à 37°C est homogène.

Ces résultats doivent donc être considérés avec précaution et le test devrait être répété et les résultats reproduits.

### Discussion

Parmi les clones mutants transpositionnels de *B. melitensis* où le miniTn5K<sub>mc</sub>at a transposé aléatoirement en aval d'un promoteur, beaucoup montrent une résistance au Cm, induite en fonction des différentes conditions testées (croissance sur différents milieux bactériologiques et croissance à 40°C). La sélection des mutants en présence de Cm nous a donc permis d'identifier des gènes de *B. melitensis* induits dans les conditions testées.

**Figure II.15:** Représentation schématique de la IPCR sur l'ADN génomique de mutants transpositionnels de *B. melitensis*.



Nous possédons donc une banque de mutants transpositionnels de *B. melitensis* qui permet de détecter des gènes préférentiellement induits.

La suite de la technique implique d'être capable d'isoler le fragment d'ADN génomique contenant le promoteur induit spécifiquement. Ce fragment en amont du transposon pourra être récupéré par la technique de la PCR inversée. Notre but n'est pas d'identifier un gène dans un clone particulier, mais d'appliquer la technique qui sera utilisée dans des identifications futures de gènes préférentiellement induits.

#### **IV. Isolement de l'ADN génomique situé directement en amont du transposon**

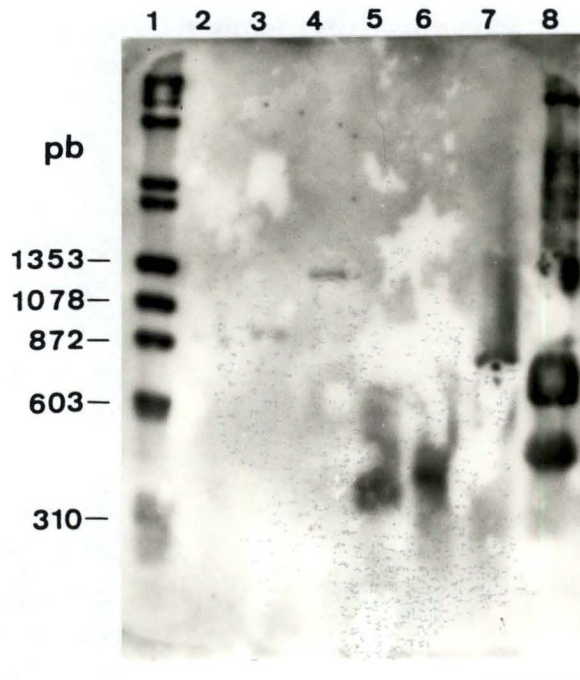
##### IV.1. Principe de la PCR inverse ou IPCR

Cette procédure doit conduire à l'isolement de l'ADN génomique localisé en amont du gène reporter *cat*. En effet, ce fragment est susceptible de contenir le promoteur ou une partie du gène (ou de l'opéron) qui contrôle *cat* et en a induit l'expression. Une fois isolé, ce fragment devra être séquencé et la séquence obtenue devra être comparée à d'autres séquences connues en vue de son identification.

L'isolement du fragment génomique en amont du transposon par PCR pose un problème. En effet, la transposition étant aléatoire, il est impossible de définir des amorces de part et d'autre de la séquence amont (inconnue) permettant de l'amplifier par PCR. La seule information de séquence exploitable est celle du transposon inséré en aval de la séquence à identifier. La technique de PCR inverse (IPCR) permet d'exploiter cette information en vue d'amplifier le fragment d'ADN inconnu situé en amont. Le principe de cette technique est illustré en figure IV.15.

La première étape consiste à extraire l'ADN génomique d'un mutant transpositionnel sélectionné sur base de l'expression de *cat*. L'ADN génomique est ensuite restreint par une enzyme choisie en vue de libérer un fragment contenant une partie du transposon et une portion de la séquence génomique située en amont. Les fragments de restriction sont ensuite circularisés par de ligation.

Connaissant la séquence du gène *cat*, il est possible de définir des amorces qui pourront s'hybrider aux deux extrémités du gène. Une PCR sur les fragments circularisés permettra ensuite d'amplifier l'ADN situé entre les amorces et contenant les séquences en amont de *cat*.



**Figure IV.16:** Southern blot sur les fragments génomiques de restriction *Taq I* et sur les résultats d'amplification IPCR. Hybridation avec la sonde *cat*

Pistes 1 marqueur de taille biotinylé  $\lambda$  DNA et  $\phi$  174 DNA/*Hae III*

2 ADN génomique du clone 1 *Amp<sup>S</sup>/Taq I*

3 ADN génomique du clone 2

4 ADN génomique du clone 3

5 Amplification par IPCR sur l'ADN du clone 1

6 sur l'ADN du clone 2

7 sur l'ADN du clone 3

8 plasmide pCAT19/*Taq I*

#### IV.2. Restriction de l'ADN génomique des clones Amp<sup>S</sup> par *Taq* I.

L'enzyme de restriction *Taq* I a été choisie pour restreindre l'ADN génomique des clones Amp<sup>S</sup> de *B. melitensis*. D'après la séquence du miniTn5K<sup>cat</sup>, des sites *Taq* I sont présents à l'extrémité 5' du gène Km. De plus, en construisant le plasmide pUTminiTn5K<sup>cat</sup>, le gène *cat* a été introduit au site *Sfi* I rogné sous forme d'un fragment *Taq* I rendu bout franc par la T4 DNA polymérase (figure II.12). La ligation a donc reconstitué un site *Taq* I à l'extrémité 3' du gène *cat* (position 843, entre *cat* et Km). Par contre, aucun site *Taq* I n'est présent à l'extrémité 5' du gène *cat*. Signalons que seul le séquençage permettrait de certifier la reconstitution du site *Taq* I entre *cat* et Km. Il suffirait en effet que la polymérase élimine un nucléotide de plus pour que ce site soit perdu. Toutefois, si ce site *Taq* I est absent, le site *Taq* I suivant sur le transposon (aux environs du nucléotide 160 dans Km) serait clivé. Donc, la restriction *Taq* I de l'ADN d'un clone Amp<sup>S</sup> engendrera un fragment contenant le gène *cat* et l'ADN génomique situé en amont du transposon.

D'autre part, l'enzyme *Taq* I est aussi choisie car, son site de reconnaissance ne contenant que 4 pb (TCGA), la taille des fragments génomiques de restriction *Taq* I doit en moyenne être petite. La caractérisation rapide de l'ADN génomique situé en amont ne nécessite pas d'isoler de grands fragments d'ADN. L'enzyme *Taq* I a été testée sur l'ADN chromosomique de *B. melitensis* et semble restreindre efficacement cet ADN en fragments de petite taille.

L'ADN de 3 clones mutants transpositionnels de *B. melitensis*, choisis au hasard, a été extrait puis restreint par *Taq* I. Cet ADN restreint a ensuite été analysé par southern blot en utilisant la sonde *cat* (figure IV.16). La sonde *cat* devrait s'hybrider au fragment *Taq* I d'intérêt: celui qui contient l'ADN génomique situé en amont du transposon et le gène *cat* du transposon. Le résultat de l'hybridation nous permet d'évaluer la taille de ce fragment dans les clones 1 à 3: environ 900, 950 et 1350 pb respectivement. Ces fragments contiennent environ 840 pb provenant du miniTn5<sup>cat</sup>. La taille de l'ADN génomique de *Brucella* présent dans ces fragments serait donc d'environ 60, 110 et 510 pb pour les clones 1 à 3 respectivement. La variabilité de la taille du fragment *Taq* I d'intérêt en fonction du clone Amp<sup>S</sup> est le résultat du caractère aléatoire de l'insertion du miniTn5<sup>cat</sup>. La position du transposon par rapport aux sites *Taq* I du génome est donc différente d'un clone à l'autre.

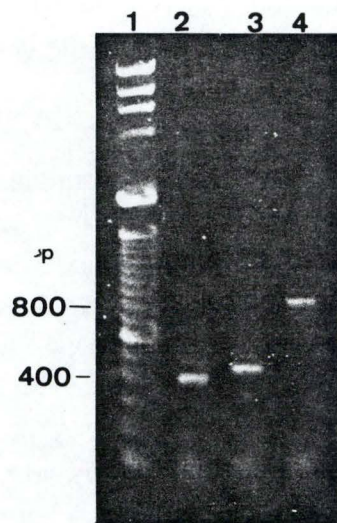


Figure IV.18: Gel d'agarose montrant les amplifications par IPCR.

Pistes 1 marqueur de taille  $\lambda$  DNA/*Hind* III

2 IPCR sur l'ADN génomique du clone 1

3 IPCR sur l'ADN génomique du clone 2

4 IPCR sur l'ADN génomique du clone 3

Figure IV.17: Sequence de l'extrémité 5' du miniTn5cat. Le I end et le gène *cat* sont indiqués. La séquence et la position des amorces utilisées dans l'IPCPCR sont indiquées. Amorce 1: s'hybride à l'extrémité 5' du gène *cat*. Amorce 2: s'hybride à l'extrémité 3' du gène *cat*. Le site de restriction *TaqI* qui serait reconstitué est souligné.

	10	20	30	40	50	60	70	80		
	I end		I ----> extrémité 5' du gène <i>cat</i>							
1	<u>CTGTCTCTTG</u>	<u>ATCAGATCTG</u>	GCCGCGAGAT	TTTCAGGAGC	TAAGGAAGCT	AAAATGGAGA	AAAAAATCAC	TGGATATACC	80	
81	ACCGTTGATA	TATCCCAATG	GCATCGTAAA	GAACATTTTG	AGGCATTTCA	GTCAGTTGCT	CAATGTACCT	ATAACCAGAC	160	
161	CGTTCAGCTG	GATATTACGG	CCTTTTTTAAA	GACCGTAAAG	AAAAATAAGC	ACAAGTTTTA	TCCGGCCTTT	ATTCACATTC	240	
	AACGGGCGGA	CTACGGCCG	<- 5' amorce 1				3' <-	TAAGTGTAAG		
241	TTGCCCGCCT	GATGAATGCT	CATCCGGAAT	TCCGTATGGC	AATGAAAGAC	GGTGAGCTGG	TGATATGGGA	TAGTGTTCAC	320	
321	CCTTGTTACA	CCGTTTTTCCA	TGAGCAAAC	GAAACGTTTT	CATCGCTCTG	GAGTGAATAC	CACGACGATT	TCCGGCAGTT	400	
401	TCTACACATA	TATTTCGCAAG	ATGTGGCGTG	TTACGGTGAA	AACCTGGCCT	ATTTCCCTAA	AGGGTTTTATT	GAGAATATGT	480	
481	TTTTTCGCTC	AGCCAATCCC	TGGGTGAGTT	TCACCAGTTT	TGATTTAAAC	GTGGCCAATA	TGGACAACCT	CTTCGCCCCC	560	
561	GTTTTACCA	TGGGCAAATA	TTATACGCAA	GGCGACAAGG	TGCTGATGCC	GCTGGCGATT	CAGGTTTCATC	ATGCCGTTTG	640	
641	TGATGGCTTC	CATGTCGGCA	GAATGCTTAA	TGAATTACAA	CAGTACTGCG	ATGAGTGGCA	GGCGGGGCG	TAATTTTTTTT	720	
721	AAGGCAGTTA	TTGGTGCCCT	TAAACGCCTG	GTGCTACGCC	TGAATAAGTG	ATAATAAGCG	GATGAATGGC	AGAAATTCGG	800	
	ACCTGCAGGC	ATGCAACTCT	A -> 3'		<b>TaqI</b>		5' ->	<u>CGCGG</u>		
801	ACCTGCAGGC	ATGCAACTCT	AGAGGATCCC	CGGGTACCGA	<u>GCTCGA</u>	----> gène <i>Km</i>			846	
	extrémité 3' du gène <i>cat</i> ----> I									
	10	20	30	40	50	60	70	80		

### IV.3. IPCR sur l'ADN génomique restreint par *Taq* I.

L'ADN génomique des 3 clones, restreint par *Taq* I, a été ligué (après inactivation de l'enzyme). Une PCR a été réalisée sur ce mélange de ligation en utilisant les amorces 1 et 2 spécifiques du gène *cat* (figure IV.17). Cette réaction devrait aboutir à l'amplification du fragment génomique de *Brucella* situé en amont du miniTn5cat et des extrémités du gène *cat* (320 pb). Un dixième du mélange de PCR a été analysé par électrophorèse en gel d'agarose (figure IV.18). Dans chaque clone, un fragment a été amplifié et sa taille est d'environ 400, 450 et 850 pb pour les clones 1 à 3 respectivement.

Par southern blot, nous avons ensuite montré que le fragment amplifié s'hybride à la sonde *cat* (figure IV.16). En effet, ces fragments obtenus par IPCR doivent contenir 270 nucléotides de l'extrémité 5' du miniTn5cat (dont environ 250 du gène *cat*) et environ 50 nucléotides de l'extrémité 3' du gène *cat*. A partir de la taille des fragments amplifiés, on peut estimer la taille du fragment génomique contenu dans ces fragments. Il suffit de soustraire les 320 (270+50) pb du transposon. Les portions d'ADN génomique isolées par IPCR à partir des clones 1, 2 et 3 auraient donc une taille approximative de 80 (400-320), 130 (450-320) et 530 (850-320) pb. Ces tailles approximatives sont très proches des tailles évaluées à partir du résultat de l'hybridation de la sonde *cat* sur l'ADN des clones restreints par *Taq* I (60, 110 et 510 pb). Les résultats obtenus par hybridation et IPCR concordent; les fragments amplifiés par IPCR doivent donc contenir l'ADN génomique situé en amont du miniTn5cat dans les clones 1 à 3. Lors d'une application future de l'IPCR, si la majorité des fragments génomiques obtenus suite à la restriction par *Taq* I sont de très petite taille (comme dans l'exemple 80 et 130 pb), il sera nécessaire de tester une autre enzyme de restriction.

L'étape suivante de la caractérisation du fragment génomique sera le séquençage du fragment amplifié par IPCR. Le séquençage permettra aussi de confirmer la présence d'un site *Taq* I à l'extrémité 3' du gène *cat*.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

Les trois objectifs fixés au début du travail ont été atteints.

Nous avons construit une banque de mutants transpositionnels par transposition du miniTn5cat dans le génome de *B. melitensis*. Le gène reporter *cat* est, par cette transposition, placé sous le contrôle d'un promoteur de *B. melitensis*. L'expression du gène *cat* traduit l'induction du ou des promoteurs situés en amont du transposon. Son expression dans les mutants de *B. melitensis* est mise en évidence par la résistance au chloramphénicol.

Nous avons montré qu'*in vitro*, la composition du milieu ainsi que la température influencent l'expression du gène *cat*.

Dans le cadre de l'identification de gènes spécifiquement induits, nous avons validé une technique d'isolement rapide du fragment génomique situé en amont du transposon. Ce fragment d'intérêt peut être récupéré par la technique de PCR inverse ou IPCR, utilisant des amorces spécifiques du gène reporter *cat*.

L'utilisation du plasmide pUTminiTn5KmlacZ1 comme vecteur de transposon n'a conduit qu'à l'isolement de clones de *B. melitensis* Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup>, dont le phénotype (Km<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup>) n'a pas été expliqué par l'analyse de leur génome. Notre but étant l'isolement de mutants transpositionnels (Km<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup>: perte du vecteur plasmidique), nous avons construit et testé un autre transposon dans lequel le gène *lacZ1* a été remplacé par le gène reporter *cat*. En utilisant ce transposon, des mutants transpositionnels ont été isolés efficacement. Il semble assez courant que l'efficacité des vecteurs de transposon varie en fonction du plasmide et du gène reporter utilisés, mais aussi du genre bactérien étudié (De Greeve, communication personnelle).

Nous ne pouvons pas chiffrer l'efficacité de la transposition utilisant le plasmide pUTminiTn5Kmcats comme vecteur. En effet, déterminer la fréquence de transposition (nombre de clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup> isolés par bactérie receveuse engagée dans la conjugaison) nécessiterait un dénombrement du nombre de bactéries utilisées pour la conjugaison; cette mesure n'a pas été effectuée.

De plus, l'isolement de clones de *B. melitensis* 16M Km<sup>R</sup> est dû à la combinaison de deux événements: la conjugaison et la transposition. La conjugaison est décrite comme un mode de transfert efficace de plasmide entre bactéries. Elle a d'ailleurs été utilisée par de Lorenzo *et al.* (1990) pour tester le pUTminiTn5KmlacZ1 chez *P. putida*, mais aussi pour évaluer le pUTminiTn5Km chez *B. abortus* (Sangari et Agüero, 1991). L'électroporation a

aussi été appliquée avec succès à *B. abortus* pour transférer des vecteurs de transposon (Lai *et al.*, 1990). La forme sous laquelle l'ADN plasmidique entre dans la bactérie cible est différente suivant le type de transfert. Au cours de la conjugaison, un brin monocaténaire et linéaire d'ADN plasmidique est transféré dans la bactérie receveuse. Il est possible que ce transfert influence la transposition, bien qu'à notre connaissance cela n'ait jamais été décrit.

Nous avons effectué un essai d'électroporation du pUTminiTn5KmlacZ1 dans *B. melitensis* qui n'a pas conduit à l'obtention de clones Km<sup>R</sup>. Nous n'avons pas investigué plus avant l'effet du mode de transfert de l'ADN sur l'efficacité de transposition.

En utilisant le pUTminiTn5Kmc<sup>R</sup>, des clones Km<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup> ont été isolés à un taux qui varie d'une conjugaison à l'autre. Nous n'avons pas tenté de déterminer la cause de cette variabilité. Bien que les conditions de culture (volume, agitation, température, durée) soient maintenues les plus constantes possibles d'une expérience à l'autre, un des paramètres initiaux que nous ne contrôlons pas est la densité optique des cultures bactériennes utilisées pour la conjugaison.

Il est possible que le nombre de bactéries dans la culture ainsi que le nombre de générations atteint par ces bactéries influencent le résultat de la conjugaison-transposition. En effet, Lai *et al.* (1990) ont montré que la fréquence de transposition augmente avec le nombre de générations des *Brucella* sp. et avec la densité optique. Cependant ces auteurs ne mentionnent pas l'effet de ces paramètres sur la proportion de mutants et de cointégrants.

Quoiqu'il en soit, nous avons observé un pourcentage (5 à 21%) de clones Amp<sup>R</sup> (qui se sont révélés être des cointégrants) supérieur à celui décrit par de Lorenzo *et al.* (10%; 1990) et Herrero *et al.* (0 à 17%; 1990). Sur base de ces données, la cointégration d'un vecteur portant un transposon à transposition conservative ne semble pas être un événement aussi rare que cela n'a été décrit (Berg et Berg, 1987). Il est vrai que les études du mécanisme de transposition ont principalement été appliquées à *E. coli* et avec un transposon entier. Ici, la transposition se fait chez *Brucella* sp. et avec un transposon modifié, le miniTn5.

Malgré cela, en pratique, le pourcentage de clones Amp<sup>S</sup> obtenus en utilisant le pUTminiTn5Kmc<sup>R</sup> est suffisant pour permettre la construction d'une banque de mutants représentative du génome de *B. melitensis*.

Nos expériences de transposition ont aussi montré que l'utilisation du gène de résistance à l'ampicilline comme marqueur devrait être évitée chez *Brucella* sp. La sélection basée sur l'ampicilline n'est pas assez efficace chez cette bactérie. L'ampicilline se dégrade rapidement à 37°C alors qu'une incubation de plusieurs jours est nécessaire à la croissance de *B. melitensis*. On constate par exemple que lors de certains tests, des clones dont le génotype a été défini comme étant Amp<sup>S</sup>, résistent à une concentration en ampicilline de 10

$\mu\text{g/ml}$ . D'une expérience à l'autre, la concentration en ampicilline à utiliser pour discriminer les clones Amp<sup>R</sup> des clones Amp<sup>S</sup> peut varier.

D'autre part, le plasmide pUT ne contient aucun marqueur permettant de sélectionner positivement les clones Amp<sup>S</sup> qui nous intéressent. Le phénotype Amp<sup>S</sup> les identifie, mais la croissance sur ampicilline est une contre sélection de ces clones; elle élimine les clones Amp<sup>S</sup>. Il serait envisageable d'introduire dans le plasmide pUT un marqueur permettant la sélection positive des mutants transpositionnels. Dans des conditions de culture définies, ce marqueur devrait être toxique pour la bactérie qui le porte. Il permettrait d'éliminer les cointégrats (ayant par conséquent intégré ce marqueur) et de conserver les mutants transpositionnels (qui auront perdu ce marqueur en même temps que le plasmide suicide pUT).

Avant d'exploiter la collection de mutants transpositionnels que nous avons obtenue, il sera nécessaire d'en augmenter le nombre. Pratiquement, pour faciliter le stockage et la manipulation de cette banque, les clones seront transférés individuellement dans les puits de plaques multipuits.

L'exploitation de la banque dans la recherche de gènes de virulence peut suivre 2 voies. L'une ne dépend pas de la présence du gène reporter et consiste à cribler la banque afin d'identifier les mutants qui sont déficients pour le caractère étudié, suite à la disruption du gène ou de l'opéron par le transposon. Par exemple, les mutants auxotrophes contenus dans la banque seront incapables de croître sur un milieu pauvre en nutriments. La détection *in vitro* des mutants rugueux par coloration des colonies au cristal violet (White et Wilson, 1951) devrait permettre de mettre en évidence les transpositions ayant disrupté des gènes impliqués dans la biosynthèse du LPS. L'isolement de mutants incapables de survivre en macrophages pourrait mettre en évidence des gènes nécessaires au parasitisme des cellules phagocytaires.

La seconde approche consistera à identifier des gènes préférentiellement induits en détectant l'expression du gène reporter *cat* contenu dans le transposon. L'induction peut se faire *in vitro* sur milieu bactériologique. Nous avons réalisé des expériences préliminaires d'induction par la température ou la composition du milieu de culture. Des gènes dont l'expression est induite par un pH acide, une déficience en fer, la présence d'ions ou encore l'osmolarité, pourraient être recherchés de la même façon sur des milieux de culture particuliers.

La détection de gènes induits au cours de l'infection de macrophages par *B. melitensis* pourra se faire suivant 2 méthodes. Le criblage individuel des clones de la banque cultivés en cellules phagocytaires (en plaques multipuits) peut se faire en dosant par ELISA la quantité de protéine Cat produite ou en sélectionnant les clones exprimant *cat* suffisamment pour résister au Cm ajouté aux macrophages.

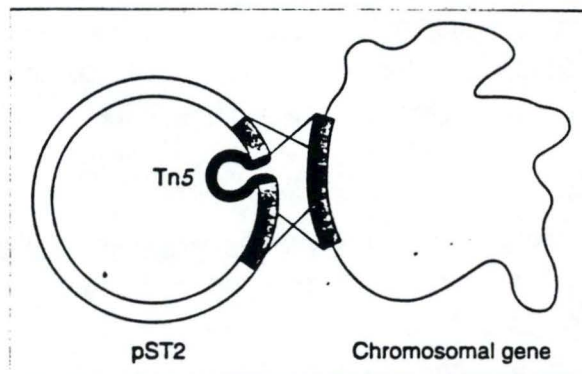


Figure V.1: Récupération du gène sauvage par recombinaison homologue entre la copie mutée (sur le plasmide) et le chromosome bactérien.

Les clones dont la fusion transcriptionnelle est induite dans la souris (un modèle animal de l'infection brucellique) pourraient être sélectionnés après injection de la banque à la souris et traitement de cette dernière au chloramphénicol. Une mise au point préliminaire du traitement antibiotique sera nécessaire pour qu'il assure une sélection efficace. Signalons qu'une variante du système consisterait à n'injecter dans la souris que les clones qui n'expriment pas le gène *cat in vitro*. On pourrait supprimer ainsi, avant la sélection dans la souris, les fusions transcriptionnelles exprimées constitutivement.

Les clones sélectionnés en macrophages ou en souris seront testés pour identifier ceux qui expriment *cat* spécifiquement *in vivo*. Le phénotype des mutants recherchés par ces systèmes est *Cat<sup>+</sup> in vivo* et *Cat<sup>-</sup>* sur milieu bactériologique. Signalons que contrairement à Mahan *et al.* (1995), nous ne disposons que d'un gène reporter pour détecter l'induction spécifique d'un promoteur de *B. melitensis*. Ces auteurs mettent en effet à profit le gène reporter *lacZ* en plus du gène *cat*.

L'identification de gènes mutés ou préférentiellement induits nécessitera l'isolement et le séquençage du fragment d'ADN génomique situé en amont du transposon. Nous avons montré que cet isolement pouvait être réalisé rapidement en appliquant l'IPCR. La séquence obtenue sera ensuite comparée aux séquences nucléotidiques et protéiques accessibles dans les banques de séquences.

Le gène (ou l'opéron) sauvage pourra ensuite être cloné par le criblage d'une banque génomique utilisant comme sonde le fragment amplifié par IPCR. La récupération du gène sauvage peut aussi se faire par recombinaison homologue entre les fragments génomiques flanquant le transposon et les séquences correspondantes du génome. Un plasmide contenant le transposon flanqué des fragments génomiques est introduit dans une souche sauvage de la bactérie et suite à la recombinaison, le gène sauvage sera porté par le plasmide (figure V.1) (Kumar Tripathi, 1995).

Comme cela a été souligné précédemment, une combinaison de systèmes de détection et de sélection devrait assurer l'identification d'un maximum de gènes potentiellement impliqués dans la virulence. On pourrait donc aussi construire une banque d'intégration utilisant le plasmide pIVET8 (gène reporté *cat-lac*; voir dans le chapitre Introduction) (Mahan *et al.*, 1995).

La mise en oeuvre de méthodes génétiques d'identification de gènes de *Brucella* sp. préférentiellement induits *in vivo* devrait entraîner d'importants progrès dans la compréhension de la virulence des bactéries du genre *Brucella*.

La délétion des gènes identifiés par ces techniques pourra aboutir à l'atténuation de la souche de *B. melitensis*, ouvrant la voie à une nouvelle génération de vaccins brucelliques vivants atténués.

## BIBLIOGRAPHIE

- Allardet-Servent, A., M. -J. Carles-Nurit, G. Bourg, S. Michaux and M. Ramuz. 1991. Physical map of the *Brucella melitensis* 16M chromosome. *Journal of Bacteriology* **173**: 2219-2224.
- Alton G., Jones L., Angus R., and J.-M. Verger. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris.
- Austyn, J.M. and K.J. Wood. 1993. Principles of cellular and molecular immunology. Oxford University Press, New York.
- Bachrach, G., M. Banai, S. Bardenstein, G. Hoida, A. Genizi and H. Bercovier. 1994. Brucella ribosomal protein L7/L12 is a major component in the antigenicity of brucellin INRA for delayed-type hypersensitivity in Brucella-sensitized guinea pigs. *Infect. Immun.* **62**: 5361-5366.
- Baldwin, C. L., X. Jiang and D. M. Fernandes. 1993. Macrophage control of *Brucella abortus* : influence of cytokines and iron. *Trends in Microbiology* **1**(3): 99-104.
- Baldwin C. L. and A. J. Winter. 1993. Macrophages and *Brucella*, p363. In Zwilling BS, Eisenstein T. K. (eds), *Macrophage-pathogen interactions*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Berg C. M. and D. E. Berg. 1987. Uses of transposable elements and maps of known insertions. In Neidhart FC, Ingraham JL, Low KB, et al (eds), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. ASM, Washington, DC.
- Bricker, B. J., L. B. Tabatabai, B. A. Judge, B. L. Deyoe and J. E. Mayfield. 1990. Cloning, expression and occurrence of the *Brucella* Cu-Zn superoxide dismutase. *Infect. Immun.* **58**: 2935-2939.
- Camilli, A., D. T. Beattie and J. J. Mekalonos. 1994. Use of genetic recombination as a reporter of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2634-2638.
- Campbell, G. A., L. G. Adams and B. A. Sowa. 1994. Mechanisms of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **41**: 295-306.
- Canning, P. C. 1990. Phagocyte function in resistance to brucellosis. In Adams L. G. (ed), *Advances in brucellosis research*. Texas A&M University Press, College Station.
- Canning, P. C., J. A. Roth and B. L. Deyoe. 1986. Release of 5'-guanosine monophosphate and adenine by *Brucella abortus* and their role in the intracellular survival of the bacteria. *J. Infect. Dis.* **154**: 464-470.
- Cellier, M., J. Teyssier, M. Nicolas, J. -P. Liautard, J. Marti and J. Sri Widada. 1992. Cloning and characterization of the *Brucella ovis* heat shock protein DnaK functionally expressed in *Escherichia coli*. *J. Bact.* **174**: 8036-8042.
- Crawford, B., S. Drazek, R. Warren and D. Hoover. 1995. *purE* mutant of *B. melitensis* attenuated in Balb/c mice. 95th ASM annual meeting (Abstract)
- De Ley, J., W. Mannheim, P. Segers, A. Lievens, M. Denijn, M. Vanhoucke and M. Gillis. 1987. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of *Brucella* and CDC groups Vd. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 35-42.
- de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik and K. N. Timmis. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6568-6572.
- Denoël, P. A., M. S. Zygmunt, V. E. Weynants, A. Tibor, B. Lichtfouse, P. Briffeuil, J. N. Limet and J. J. Letesson. 1995. Cloning and sequencing of the bacterioferritin gene of *Brucella melitensis* 16M strain. *FEBS Letters* **361**: 238-242.
- Detilleux, P. G., B. L. Deyoe and N. F. Cheville. 1990. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. *Infect. Immun.* **58**: 2320-2328.
- de Wergifosse, P., P. Lintermans, J. N. Limet and A. Cloeckaert. 1995. Cloning and nucleotide sequence of the gene coding for the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*. *J. Bact.* **177**: 1911-1914.
- Dorsch, M., E. Moreno and E. Stackebrandt. 1989. Nucleotide sequence of the 16S rRNA from *Brucella abortus*. *Nucl. Acids Res.* **17**: 1765.
- Drazek, E. S., H-S. H. Houng, R. M. Crawford, T. L. Hadfield, D. L. Hoover and R. L. Warren. 1995. Deletion of *purE* attenuates *Brucella melitensis* 16M for growth in human monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.* **63**: 3297-3301.
- Elzer, P. H., M. E. Kovach, R. W. Phillips, G. T. Robertson, K. M. Peterson and R. M. Roop II. 1995. *In vivo* and *in vitro* stability of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS in six *Brucella* species. *Plasmid* **33**: 51-57.

- Elzer, P. H., R. W. Phillips, M. E. Kovach, K. M. Peterson and R. M. Roop II. 1994. Characterization and genetic complementation of a *Brucella abortus* high-temperature-requirement A (*htrA*) deletion mutant. *Infect. Immun.* **62** (10): 4135-4139.
- Essenberg, R. C. and Y. K. Sharma. 1993. Cloning of genes for proline and leucine biosynthesis from *Brucella abortus* by functional complementation in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* **139**: 87-93.
- Ficht, T. A., C. A. Allen and G. Song. 1995. Characterization of attenuated *B. abortus* selected from a transposon mutant bank. 95th ASM annual meeting (Abstract).
- Ficht, T. A., S. W. Bearden, B. A. Sowai and L. G. Adams. 1989. DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* **57**: 3281-3291.
- Fields, P. I., R. V. Swanson, C. G. Haidaris and F. Heffron. 1986. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 5189-5193.
- Finlay, B. B. and S. Falkow. 1989. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiological Reviews* **53**(2): 210-230.
- Gerhardt, P., R.G.E. Murray, W.A. Wood and N.R. Krieg. 1994. *Methods for general and molecular bacteriology*. ASM Press, Washington, DC.
- Gor, D. and J. E. Mayfield. 1992. Cloning and nucleotide sequence of the *Brucella abortus groE* operon. *Biochem. Biophys. Acta* **1130**: 120-122.
- Halling, S. M. and B. J. Bricker. 1994. Characterisation and occurrence of two repeated palindromic DNA elements of *Brucella* spp./ Bru-RS1 and Bru-RS2. *Mol. Microbiol.* **14** (4): 681-689.
- Halling, S. M., P. G. Dettileux, F. M. Tatum, B. A. Judge and J. E. Mayfield. 1991. Deletion of the BCSP31 gene of *Brucella abortus* by replacement. *Infect. Immun.* **59**: 3863-3868.
- Halling, S. M., F. M. Tatum and B. J. Bricker. 1993. Sequence and characterization of an insertion sequence, IS711, from *Brucella ovis*. *Gene* **133**: 123-127.
- Herrero, M., V. De Lorenzo and K. H. Timmis. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172** (11): 6557-6567.
- Isberg, R. R. and G. Tran Van Nhieu. 1994. Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors. *Trends in Microbiology* **2**: 10-14.
- Klarsfeld, A. D., P. L. Goossens and P. Cossart. 1994. Five *Listeria monocytogenes* genes preferentially expressed in infected mammalian cells: *plcA*, *purH*, *purD*, *pyrE* and an arginine ABC transporter gene, *arpJ*. *Molecular Microbiology* **13**: 585-597.
- Kovach, M. E., R. W. Phillips, P. H. Elzer, R. M. Roop II and K. M. Peterson. 1994. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**: 800.
- Lai, F., G. G. Schurig and S. M. Boyle. 1990. Electroporation of a suicide plasmid bearing a transposon into *Brucella abortus*. *Microbial Pathogenesis* **9**: 363-368.
- Latimer, E., J. Simmers, N. Siranganathan, R. M. Roop II, G. G. Schurig and S. M. Boyle. 1992. *Brucella abortus* deficient in copper/zinc superoxide dismutase is virulent in BALB/c mice. *Microbial Pathogenesis* **12**: 105-113.
- Lee, C. A. 1994. Genetic approaches to understanding *Salmonella* pathogenicity. In Miller, V. L., Kaper, J. B., Portnoy, D. A., and R. R. Isberg (eds.), *Molecular genetics of bacterial pathogenesis*. ASM, Washington, DC.
- Liesack, W. and K. Finster. 1994. Phylogenetic analysis of five strains of Gram-negative, obligately anaerobic, sulfur-reducing bacteria: description of *Desulfuromyxa* gen. nov., including the species *D. kysingii* sp. nov., *D. bakii* sp. nov. and *D. succinioxidans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 753-758.
- Lin, J., G. L. Adams and T. A. Ficht. 1992. Characterization of heat shock response in *Brucella abortus* and isolation of the genes encoding the GroE heat shock proteins. *Infect. Immun.* **60**: 2425-2431.
- Lin, J. and T. A. Ficht. 1995. Protein synthesis in *Brucella abortus* induced during macrophage infection. *Infect. Immun.* **63**: 1409-1414.
- López-Goni, I., I. Moriyón and J. B. Neilands. 1992. Identification of 2,3-Dihydroxybenzoic acid as a *Brucella abortus* siderophore. *Infect. Immun.* **60**(11): 4496-4503.
- Mahan, M. J., J. M. Slauch, P. C. Hanna, A. Camilli, J. W. Tobias, M. K. Waldor and J. J. Mekalonos. 1994. Selection for bacterial genes that are specifically induced in host tissues: the hunt for virulence factors. *Infectious Agents and Disease* **2**: 263-268.
- Mahan, M. J., J. M. Slauch and J. J. Mekalonos. 1993. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* **259**: 686-688.

- Mahan, M. J., J. W. Tobias, J. M. Slauch, P. C. Hanna, R. J. Collier and J. J. Mekalanos.** 1995. Antibiotic-based selection for bacterial genes that are specifically induced during infection of a host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 669-673.
- Marquis, H. and T. A. Ficht.** 1993. The *omp2* gene locus of *Brucella abortus* encodes for two homologous outer membrane proteins with properties characteristic of bacterial porins. *Infect. Immun.* **61(9)**: 3785-3790.
- Mayfield, J. E., B. J. Bricker, H. Godfrey, R. N. Crosby, D. J. Knight, S. M. Halling, D. Balinsky and L. B. Tabatabai.** 1988. The cloning, expression and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic *Brucella abortus* protein. *Gene* **63**: 1-9.
- Michaux, S., J. Paillisson, M.-J. Carles-Nurit, G. Bourg, A. Allardet-Servent and M. Ramuz.** 1993. Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *Journal of Bacteriology* **175(3)**: 701-705.
- Minnick, Michael F. and Gary L. Stiegler.** 1993. Nucleotide sequence and comparison of the 5S ribosomal RNA genes of *Rochalimaea henselae*, *R. quintana* and *Brucella abortus*. *N. A. R.* **21(10)**: 2518.
- Moors, M. A. and P. J. Youngman.** 1995. Analysis of *Listeria monocytogenes* virulence gene expression using a transcriptional reporter gene system. 95th ASM General Meeting (Abstract)
- Moreno, E., E. Stackerbrandt, M. Drosch, J. Wolters, M. Busch and H. Mayer.** 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.
- Neidhart, F.C., J.L. Ingraham and M. Schaechter.** 1990. Physiology of the bacterial cell. A molecular approach. Sinauer Associates, Sunderland.
- Nielsen, K. and J.R. Duncan.** 1990. Animal brucellosis. CRC Press, Boca Raton.
- Ochman, H., A. S. Gerber and D. L. Hartl.** 1988. Genetic applications of an inverse polymer chain reaction. *Genetics* **120**: 621-625.
- Oomen, R. P., N. M. Young and D. R. Bundle.** 1991. Molecular modeling of antibody-antigen complexes between the *Brucella abortus* O-chain polysaccharide and a specific monoclonal antibody. *Protein Engineering* **4(4)**: 427-433.
- Ouahrani, S., S. Michaux, J. Sri Widada, G. Bourg, R. Tournebize, M. Ramuz and J. -P. Liautard.** 1993. Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 3265-3273.
- Price, R. E., J. W. Tempelton and L. G. Adams.** 1990. Survival of smooth, rough and transposon mutant strains of *Brucella abortus* in bovine mammary macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **26**: 353-365.
- Rafie-Kolpin, M., R. C. Essenberg and J. H. Wyckoff.** 1994. Identification of macrophage induced proteins in *Brucella abortus*. 94th ASM General Meeting (Abstract)
- Rankin, S. and R. R. Isberg.** 1994. Identification of *Legionella pneumophila* promoters regulated by the macrophage intracellular environment. *Infectious Agents and Disease* **2**: 269-271.
- Rasool, O., E. Freer, E. Moreno and C. Jarstrand.** 1992. Effect of *Brucella abortus* lipopolysaccharide on oxidative metabolism and lysozyme release by human neutrophils. *Infect. Immun.* **60(4)**: 1699-1702.
- Rigby, C. E. and A. D. E. Fraser.** 1989. Plasmid transfer and plasmid-mediated genetic exchange in *Brucella abortus*. *Can. J. Vet. Res.* **53**: 326-330.
- Riley, L. K. and D. C. Robertson.** 1984. Ingestion and intracellular survival of *Brucella abortus* in human and bovine polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* **46(1)**: 224-230.
- Roop, R. M., T. W. Fletcher, N. M. Sriranganathan, S. M. Boyle and G. G. Schurig.** 1994. Identification of an immunoreactive *Brucella abortus* HtrA stress response protein homolog. *Infect. Immun.* **62**: 1000-1007.
- Roop, R. M., M. L. Price, B. E. Dunn, S. M. Boyle, N. Sriranganathan and G. G. Schurig.** 1992. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the gene encoding the immunoreactive *Brucella abortus* hsp60 protein, BA60K. *Microbial Pathogenesis* **12**: 47-62.
- Salyers, A. A. and D. D. Whitt.** 1994. Bacterial pathogenesis. A molecular approach. ASM Press, Washington, DC.
- Sangari, F. and J. Agüero.** 1991. Mutagenesis of *Brucella abortus*: comparative efficiency of three transposon delivery systems. *Microbial Pathogenesis* **11**: 443-446.
- Sangari, F. J., J. M. Garcia-Lobo and J. Agüero.** 1994. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiology Letters* **121**: 337-342.
- Sha, Z., T. J. Stabel and J. E. Mayfield.** 1994. *Brucella abortus* catalase is a periplasmic protein lacking a standard signal sequence. *J. Bact.* **176**: 7375-7377.
- Simon, R., U. Priefer and A. Pühler.** 1983. A broad host range mobilisation system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology* **7**: 783-791.

**Smith, L. D. and T. A. Ficht.** 1990. Pathogenesis of *Brucella*. *Critical Reviews in Microbiology* **17**(3): 209-230.

**Smith, L. D. and F. Heffron.** 1987. Transposon Tn5 mutagenesis of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* **55** (11): 2774-2776.

**Sriranganathan, N., S. M. Boyle, G. Schurig and H. Misra.** 1991. Superoxide dismutases of virulent and avirulent strains of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* **26**: 359-366.

**Suzuki, D., A. Griffiths, S. Miller and R. Lewontin.** 1989. Introduction à l'analyse génétique. Editions Universitaires, Paris.

**Tatum, M.F., P. G. Dettileux, J. M. Sacks and S. M. Halling.** 1992. Construction of Cu-Zn superoxyde dismutase deletion mutants of *Brucella abortus*: analysis of survival in vitro in epithelial and phagocytic cells and in vivo in mice. *Infect. Immun.* **60**(7): 2863-2869.

**Tatum, F. M., N. F. Cheville and D. Morfitt.** 1994. Cloning, characterization and construction of *htrA* and *htrA*-like mutants of *Brucella abortus* and their survival in BALB/c mice. *Microbial Pathogenesis* **17**: 23-36.

**Tibor, A., V. Weynants, P. Denoel, B. Lichtfouse, X. De Bolle, E. Saman, J. N. Limet and J. J. Letesson.** 1994. Molecular cloning, nucleotide sequence, and occurrence of a 16.5-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus* with similarity to pal lipoproteins. *Infect. Immun.* **62**: 3633-3639.

**Tripathi, A. K.** 1995. Cloning wild-type chromosomal genes using transposon mutagenized DNA in Gram-negative bacteria. *TIG* **11**: 340.

**Verger, J. -M., F. Grimont, P. A. D. Grimont and M. Grayon.** 1985. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology* **35**(3): 292-295.

**Verger, J. M., M. Grayon, E. Chaslus-Dancla, M. Meurisse and J. P. Lafont.** 1993. Conjugative transfer and *in vitro/in vivo* stability of the broad-host-range incP R751 plasmid in *Brucella* spp. *Plasmid* **29**: 142-146.

**White, P. G. and J. B. Wilson.** 1951. Differentiation of smooth and non-smooth colonies of brucellae. *J. Bacteriol.* **61**: 239-240.

**Zhu, Y., S. C. Oliveira and G. A. Splitter.** 1993. Isolation of *Brucella abortus* *ssb* and *uvrA* genes from a genomic library by use of lymphocytes as probes. *Infect. Immun.* **61**(12): 5339-5344.