



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Contribution à la mise au point d'un système promoter probe répondant au régulateur transcriptionnel CtrA de *Brucella abortus*

Viro, Sophie

Award date:
1998

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

10.6 JUN 1998

UNIVERSITÉ DE NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES
10.6 JUN 1998

Faculté des Sciences

**CONTRIBUTION À LA MISE AU POINT D'UN SYSTÈME "PROMOTER
PROBE" RÉPONDANT AU RÉGULATEUR TRANSCRIPTIONNEL CtrA
DE *BRUCELLA ABORTUS***

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

Sophie VIROT

Juin 1998

Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix
FACULTES DES SCIENCES
Secrétariat du département de biologie
Rue de Bruxelles, 61 -5000 NAMUR
Téléphone: +32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.44.20
E-mail: Joelle.Jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Contribution à la mise au point d'un système "promoter probe"
répondant au facteur transcriptionnel CtrA chez *Brucella abortus***

VIROT Sophie

Résumé

Ce travail s'insère dans le cadre d'une recherche visant à identifier des gènes régulés par le facteur transcriptionnel CtrA, régulateur de réponse appartenant à un système à deux composants de *Brucella abortus*. Il a consisté à la mise au point, chez *E. coli*, d'un système utilisant un plasmide sonde à promoteurs.

Nous avons, dans un premier temps, intégré dans le génome d'*E. coli*, le gène *ctrA* sous le contrôle d'un promoteur fort et inductible (*ptrc*). L'expression de la protéine CtrA dans cette souche a été vérifiée en Western Blot. En parallèle, des plasmides "promoter probe" tests ont été construits avec des promoteurs potentiellement régulés par CtrA.

Une expérience de simulation a ensuite été menée avec ces plasmides tests dans la souche *E. coli* exprimant CtrA. Les résultats obtenus ne nous ont pas permis de valider ce système *in vivo*. Une technique alternative, *in vitro*, est envisagée en guise de perspective à ce travail.

Mémoire de Licence en Sciences Biologiques

juin 1998

promoteur: J. Vandenhoute (Laboratoire de Génétique Moléculaire, U.R.B.M.)

copromoteur: J.J. Letesson (Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie, U.R.B.M.)

Qui ne tente rien n'a rien

Je tiens tout d'abord à remercier M. Vandenhautte pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et guidée tout au long de ce travail ainsi que M. Letesson pour ses conseils lors des réunions de labo.

Je remercie aussi Madame B. Bernier ainsi que Messieurs E. Depiereux, J. C. Dujardin et J. Messiaen pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce manuscrit.

Flore je te remercie tout particulièrement pour ta disponibilité, ton soutien et ton suivi pendant toute la durée de ce mémoire.

Merci à Domi notre chef sauveur en informatique (!), Rose Ma, Monique pour leurs conseils et leur bonne humeur, à David pour ses conseils et son aide lors de la rédaction ainsi qu'à Damien, Isa, Vincent et Madame Libion sans qui tout serait plus long.

Enfin je remercie Xavier DeBolle, Anne Tibor, Fabrice Godefroid et Isabelle Danese pour les réponses qu'ils m'ont apportées et le temps qu'ils m'ont consacré ainsi que Damien D. pour ses superbes photos.

Chers parents, merci de m'avoir soutenue dans ce projet ERASMUS qui n'aurait pu voir le jour sans votre aide.

Il serait trop long de citer tout le monde mais je tiens à remercier ceux qui, de près ou de loin, d'une façon ou d'une autre m'ont fait rire et sourire pendant cette année "belge". Merci ma très chère "Ronique", merci Kader, merci Sophie (SoB! mais ce n'est pas beau!!), Hanna, Lilia, Thynna, merci Greg, Murielle.

Doucement mais sûrement.....

ABREVIATIONS

ADN	Acide Déoxyribonucléique
Amp	Ampiciline
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
bp	paire de base
cat	Chloramphénicol Acétyl Transférase
5-FOA	5 Fluoro Orotic Acid
Cm	Chloramphénicol
Da	Dalton
DO	Densité Optique
EDTA	Ethylènediamine-tétraacétate
g	gramme
HK	Histidine Kinase
IPTG	Isopropyl- β -galactoside
Kan	Kanamycine
Kb	Kilo paire de bases
KDa	Kilo Dalton
l	Litre
mg	milligramme
ml	millilitre
μ l	microlitre
M	Molaire
MCS	Site Multiple de Clonage
mol	mole
nM	nanomolaire
ORF	phase ouverte de lecture
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne
PM	poids moléculaire
RBS	site de fixation du ribosome
RR	Régulateur de Réponse
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
Tris	Tris-(hydrométhyl)-ammonométhane
V	Volt
UV	ultra violet

GLOSSAIRE

CtrA	Cell Cycle Transcription Regulator
BaCtrA	CtrA de <i>Brucella abortus</i>
CcCtrA	CtrA de <i>Caulobacter crescens</i>
CcrM	ADN méthyltransférase

Par convention:

-*ctrA* et CtrA désignent respectivement le gène et la protéine

-*pctrA* désigne le promoteur

1. INTRODUCTION.....	2
1.1 LES BACTERIES DU GENRE <i>BRUCELLA</i>	3
1.1.1 Caractéristiques principales.....	3
1.1.2 Pathologies liées à <i>Brucella</i> spp.	3
1.2 LE PARADIGME DE LA TRANSDUCTION DU SIGNAL A DEUX COMPOSANTS	4
1.2.1 Système <i>EnvZ/OmpR</i> : deux domaines conservés couplés à deux domaines variables.....	5
1.2.2 Complexification du système.....	6
1.3 CTRA ET LA TRANSDUCTION DU SIGNAL CHEZ <i>C. CRESCENTUS</i>	7
1.3.1 Le cycle de division et le développement morphologique sont liés.....	7
1.3.2 Rôle de <i>CtrA</i> chez <i>C. crescentus</i>	7
1.4 QUESTIONS POSEES PAR L'EXISTENCE D'UN HOMOLOGUE A CTRA CHEZ <i>B. ABORTUS</i>	8
2. OBJECTIF.	10
3. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	11
3.1 ANTECEDENTS DU TRAVAIL	11
3.1.1 Description du plasmide sonde à promoteurs.....	11
3.1.2 Application à la recherche de promoteurs de <i>B. abortus</i> régulés par <i>CtrA</i> dans l'organisme hôte <i>E. coli</i>	12
3.1.3 Tentative de validation du modèle "deux-en-un"	13
3.2 CREATION PAR INTEGRATION DE LA SOUCHE <i>E. COLI</i> TG1CTRA	14
3.2.1 Principe de la stratégie.....	14
3.2.2 Construction du module d'intégration	15
3.2.3 Création proprement dite de la souche TG1 <i>CtrA</i>	18
3.3 MISE A L'EPREUVE DU SYSTEME SONDE A PROMOTEURS DANS LA SOUCHE TG1CTRA	21
3.3.1 Principe et Stratégie.....	21
3.3.2 Construction des vecteurs tests.....	22
3.3.3 Transformation de la souche TG1 <i>ctrA</i> par les plasmides tests et observation des phénotypes	24
4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	27
5. MATERIELS ET METHODES.	29
5.1 SOUCHES BACTERIENNES ET PLASMIDES	29
5.1.1 Les souches.....	29
5.1.2 Les plasmides.....	29
5.2 MILIEUX DE CULTURE.....	30
5.2.1 milieu <i>Luria Bertani (LB)</i> liquide.....	30
5.2.2 milieu <i>LB</i> solide	31
5.2.3 milieu minimum.....	31
5.2.4 milieu <i>SOC</i>	31
5.2.5 Antibiotiques et autres substances.....	32
5.3 TECHNIQUES DE L'ADN RECOMBINANT.....	32
5.3.1 Minipréparation d'ADN plasmidique de <i>E. coli</i>	32
5.3.2 Midipréparation d'ADN plasmidique (sur colonne).....	33
5.3.3 Préparation d'ADN génomique de <i>E. coli</i>	34
5.3.4 Restriction.....	34
5.3.5 Electrophorèse en gel d'agarose	35
5.3.6 Récupération d'ADN dans un gel d'agarose.....	36
5.3.7 Réaction de " fill in ".....	36
5.3.8 Déphosphorylation	37
5.3.9 Réaction de ligation.....	37
5.3.10 Extraction des protéines d'une solution d'ADN.....	37
5.3.11 Transformation.....	38
5.3.12 PCR (Polymérisation en chaîne).....	40
5.4 TECHNIQUES RELATIVES AUX PROTEINES: LE WESTERN BLOT	41
5.4.1 Electrophorèse en gel SDS-PAGE	41
5.4.2 Transfert de protéines sur filtre (Western blot).....	44
5.4.3 détection et révélation.....	45

Introduction

1. Introduction.

L'URBM (Unité de Recherche en Biologie Moléculaire) entreprend depuis plusieurs années des recherches sur les mécanismes de virulence des bactéries du genre *Brucella*, pathogène à parasitisme intracellulaire facultatif, responsable d'une zoonose de répartition mondiale visant particulièrement les animaux de rente. Un des aspects importants des mécanismes assurant à cette bactérie ses caractéristiques virulentes est sa capacité à envahir les cellules hôtes et à s'y maintenir. L'existence chez les bactéries de systèmes à deux composants (essentiellement un senseur couplé à un régulateur transactivateur de gènes), connus pour jouer un rôle dans la transmission de signaux - externes mais aussi internes - jusqu'à la machinerie d'expression des gènes, suscite l'hypothèse qu'il peut s'agir là d'un des moyens utilisés par *Brucella* pour accomplir les diverses étapes de son cycle infectieux.

Dans le cadre de l'étude des systèmes de transduction du signal à deux composants, un gène encodant une protéine homologue à CtrA, régulateur de réponse chez *Caulobacter crescentus*, a été isolé chez *Brucella abortus*. Chez *C. crescentus*, CtrA est un facteur de transcription qui intervient dans la régulation du développement morphologique (notamment au niveau de la synthèse du flagelle) et dans le cycle cellulaire.

Nous avons choisi d'étudier le rôle de CtrA chez *B. abortus* par une approche "promoter probe" en recherchant les gènes que CtrA régule directement. Cette approche repose sur l'utilisation d'un gène rapporteur dépourvu de promoteur en amont duquel seront clonés des fragments génomiques "shot gun" parmi lesquels on espère découvrir des promoteurs potentiellement régulés par CtrA. Des milieux de culture appropriés permettront de sélectionner les clones présentant une activité promotrice en présence de CtrA. Une fois les promoteurs isolés il sera possible de rechercher les gènes auxquels ils appartiennent.

Après un bref rappel de quelques caractéristiques de *Brucella spp.* et des systèmes à deux composants, nous résumerons les connaissances acquises sur CtrA chez *C. crescentus* et nous nous interrogerons sur la signification d'un homologue à CtrA chez *B. abortus*.

Paroi bactérienne
à Gram négatif

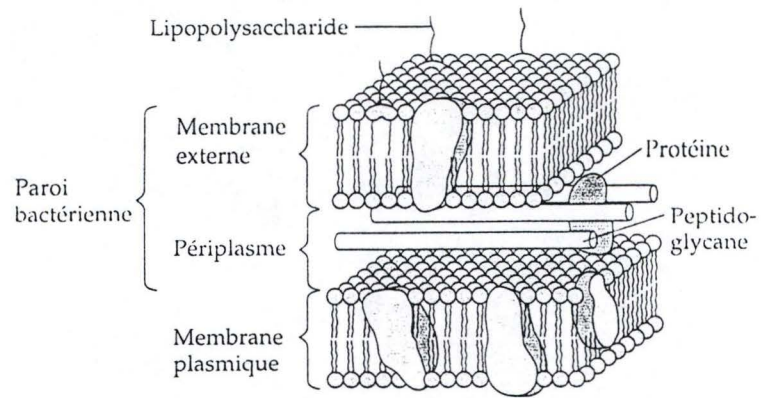
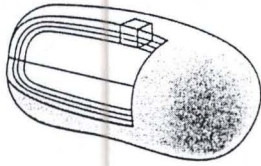
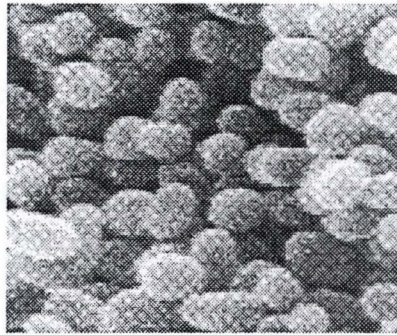


Figure 1.1: Représentation schématique de la paroi des bactéries gram négatives
(Campbell, 1995)



1 μ m

Figure 1.2: *Brucella abortus* vue en microscopie électronique à balayage
(Devos *et al.*, à paraître)

1.1 Les bactéries du genre *Brucella*

1.1.1 Caractéristiques principales

Les bactéries du genre *Brucella* sont des coccobacilles Gram négatifs (figure 1.1), décrits comme immobiles, asporulés et strictement aérobies (Alton *et al.*, 1988). Leur taille est comprise entre 0,5 et 0,7 μm de long sur 0,6 à 1,5 μm (figure 1.2).

Le génome de *B. abortus* a une taille d'environ 3,2.10⁶ pb (pour 4.10⁶ chez *E. coli*) réparties sur deux chromosomes circulaires de 2,05 et 1,15.10⁶ pb (Michaux *et al.*, 1993). Son contenu en G et C est relativement élevé : 57 à 59 % (pour 50 % chez *E. coli*) (De Ley *et al.*, 1987).

Une étude basée sur l'analyse des séquences de l'ARN 16S et la composition du lipide A du LPS classe le genre *Brucella* dans la subdivision $\alpha 2$ de la classe des Protéobacteriacées (Moreno *et al.*, 1990). On retrouve aussi dans cette subdivision des genres tels que *Caulobacter*, *Agrobacterium* et *Rhizobium* (figure 1.3).

1.1.2 Pathologies liées à *Brucella spp.*

Les *Brucella spp.* sont des parasites intracellulaires facultatifs responsables d'une zoonose de répartition mondiale (An., 1993).

Chez les mammifères domestiques, les principales conséquences de l'infection par *Brucella* sont l'avortement chez la femelle et la stérilité chez le mâle.

Brucella pénètre dans l'organisme principalement par des lésions au niveau des muqueuses buccales et respiratoires (Smith and Ficht, 1990). *Brucella* se multiplie et se dissémine dans l'organisme via le système immunitaire (elle infecte les macrophages) puis s'implante essentiellement dans les organes génitaux. Ainsi, en fonction du sexe et du stade physiologique, l'infection primaire se traduit par des symptômes différents (Verger, 1993).

En s'attaquant aux animaux de rente, *Brucella* est responsable d'un véritable fléau économique s'accompagnant d'un lourd impact en santé publique suite à sa transmissibilité à l'homme, soit par contact direct avec des animaux brucelliques, soit par ingestion de préparations à base de lait cru. La brucellose humaine (ou fièvre de Malte) est difficile à diagnostiquer sur la base des seuls symptômes

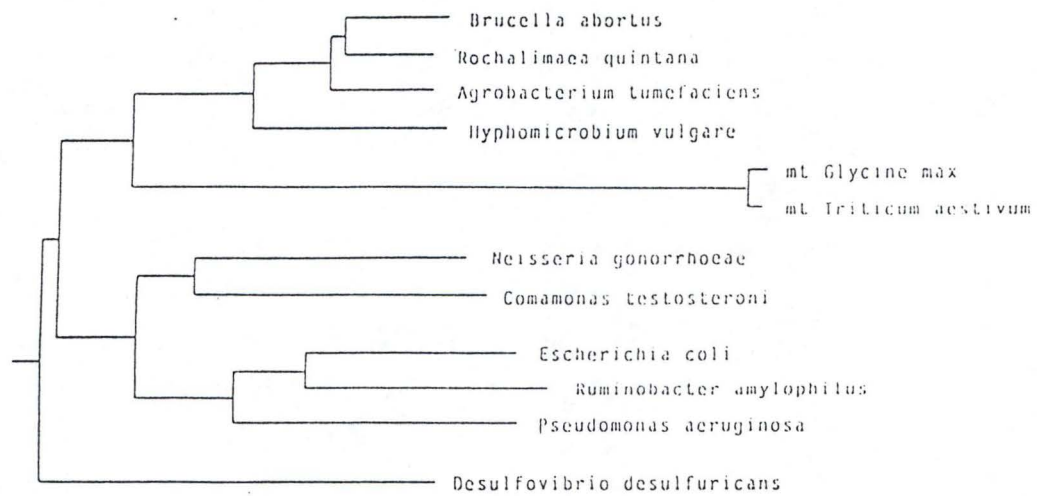


Figure 1.3: Arbre phylogénétique des bactéries de la classe des protéobactériacées basé sur l'analyse des séquences de l'ARN 16S et de composition du lipide A du LPS

L'arbre permet de distinguer quatre sous-classes de Protéobactériacées, parmi lesquelles on retrouve la subdivision $\alpha 2$ contenant *B. abortus*, *A. tumefaciens*.
(Moreno et al., 1990)

cliniques qui sont communs à toutes une série de maladies infectieuses, tels que la fièvre, la sueur, l'anorexie, les problèmes musculaires et articulaires.

Les principales méthodes de dépistage sont basées sur la détection d'anticorps anti-LipoPolySaccharide dans le lait ou le sérum du sang. La détection de la maladie sur base d'un diagnostic sérologique chez le bovin entraîne son abattage immédiat et celui du troupeau. Or, les tests sérologiques ne permettent pas de différencier les animaux vaccinés de ceux ayant été en contact direct avec *Brucella*, c'est pourquoi le traitement vaccinal chez le bovin est interdit (Garin-Bastuji, 1993). En outre, ces tests ne permettent pas non plus de discriminer entre une infection par *B. abortus* ou par *Yersinia enterocolitica* o:9, alors que cette dernière est responsable d'une infection bénigne ne nécessitant pas l'abattage du bovin (Saegerman and Pelzer, 1992)). C'est pourquoi, le traitement vaccinal chez le bovin est interdit. De plus, à l'heure actuelle les vaccins utilisables chez les bovins sont toujours contaminants pour l'homme (Blasco, 1993).

Aussi, outre l'intérêt fondamental d'étudier la biologie moléculaire et la génétique de *B. abortus*, il est clair que pour lutter efficacement contre les maladies qu'elle cause, des connaissances approfondies de cet organisme pathogène sont nécessaires: sa physiologie, sa biochimie, ses mécanismes de réponse à l'environnement et en particulier de virulence sont autant d'informations importantes à connaître. Des études génétiques et biochimiques ont montré qu'un mécanisme majeur de réponse chez les bactéries est le système de transduction du signal à deux composants qui utilise la phosphorylation comme moyen de communication.

1.2 Le paradigme de la transduction du signal à deux composants

Les informations du milieu environnant peuvent être perçues par la bactérie et générer des réponses adaptatives chez celle-ci grâce au système de transduction du signal à deux composants. Ce système est basé sur la phosphorylation et fait intervenir deux familles de protéines. Le signal extérieur est perçu par un senseur membranaire qui s'autophosphoryle sur un résidu histidine très conservé. Le phosphate est ensuite transféré sur le résidu aspartate conservé des régulateurs de réponse. Cette activation permet la médiation de la réponse

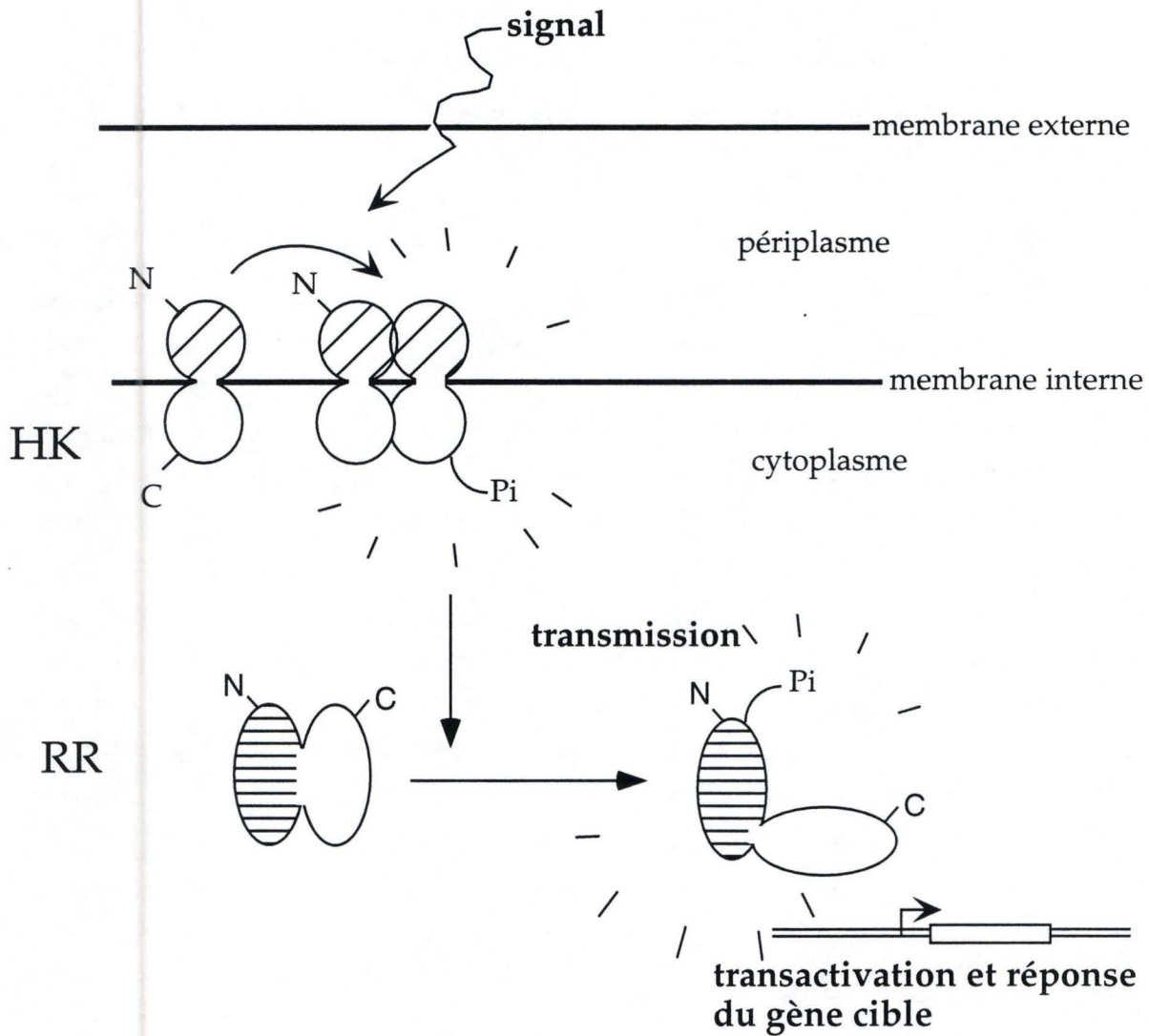
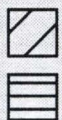


Figure 1. 4: schéma illustrant le principe du système de transduction du signal à deux composants

Le signal est perçu par l'histidine kinase qui s'autophosphoryle et transmet son phosphate au régulateur de réponse qui va alors médier la réponse appropriée au niveau des gènes cibles.



domaines variables



domaines conservés

C: extrémité carboxy-terminale

N: extrémité amino-terminale

adaptative (figure 1.4). C'est la conservation des domaines transmetteur et receveur localisés respectivement au sein des **Histidine Kinases (HK)**¹ et des **Régulateurs de Réponse (RR)**¹ qui a donné son nom à la transduction du signal à deux composants.

1.2.1 Système EnvZ/OmpR: deux domaines conservés couplés à deux domaines variables

Le paradigme le plus connu est celui de EnvZ/OmpR intervenant dans l'osmorégulation chez *E. coli* (Pratt and Silhavy, 1995). EnvZ, en fonction de l'osmolarité du milieu environnant va être activé et va à son tour activé OmpR qui est un facteur de transcription permettant la régulation de porines.

En se basant sur le paradigme que constitue le système EnvZ/OmpR, on peut décrire de manière générale le système de la façon suivante:

Le premier composant à intervenir dans la transduction du signal appartient à la famille des HK localisées le plus souvent en membrane. Les HK sont composées de deux domaines:

-le domaine senseur qui se trouve en position amino-terminale perçoit le signal. De par sa fonction, c'est un domaine variable, générateur de la diversité de perception de signaux d'une HK à une autre.

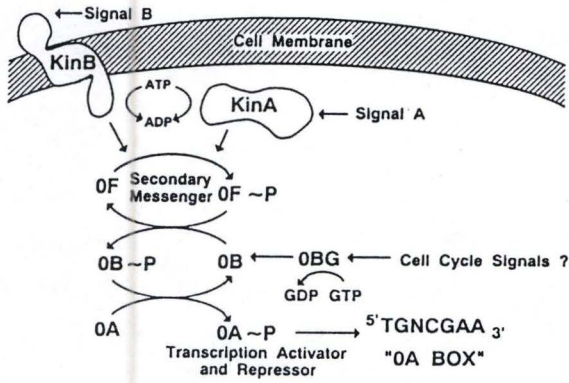
-le domaine transmetteur, en position carboxy-terminale assure la transduction du message aux protéines cytoplasmiques. Ce domaine est conservé au sein des HK. Lors de la perception du signal, la protéine forme un dimère et s'autophosphoryle au niveau d'un résidu histidine conservé (Stock *et al.*, 1995). Ainsi phosphorylée, l'HK sert alors d'intermédiaire hautement énergétique pour le transfert du groupement phosphate de l'histidine du transmetteur à l'aspartate du receveur (Alex and Simon, 1994).

Le deuxième composant appartient à la famille des régulateurs de réponses qui sont des protéines cytoplasmiques généralement composées de deux domaines:

-du côté amino-terminal est localisé le domaine receveur qui contient au sein d'une poche acide un résidu aspartate conservé; c'est sur ce résidu qu'a lieu le transfert du phosphate provenant de l'HK. Les RR partagent tous ce domaine receveur qui comporte quelques 130 résidus.

¹ dans la suite de l'exposé, nous désignerons les histidines kinases par HK et les régulateurs de réponses par RR

a/



b/

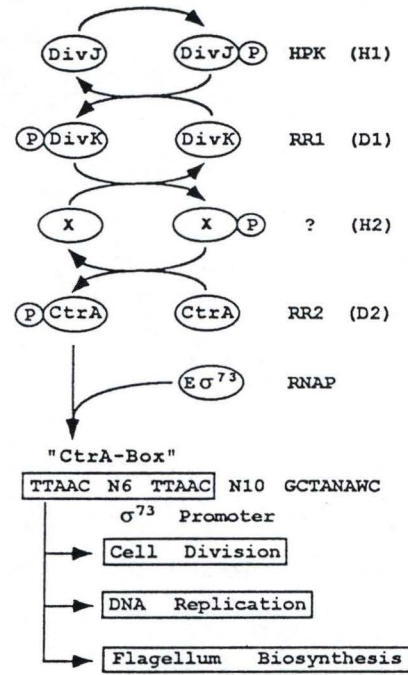


Figure 1.5: Schémas illustrant les systèmes multicomposants

a/ Système de transduction du signal intervenant dans la régulation de l'initiation de la sporulation chez *B. subtilis*.

Deux Histidines kinases (KinA, KinB) interviennent sur un premier RR (OF) qui va transférer son phosphate à une phosphotransférase (OB) qui va le transférer à un deuxième RR (OA) lequel va alors agir comme facteur de transcription.

(Burdulys *et al.*, 1991)

b/ modèle pour le système multicomposants de transduction du signal impliquant CtrA chez *C. crescentus*.

Le modèle classique "un senseur / un régulateur" est remplacé par une cascade de phosphotransfert impliquant des HK, des phosphotransférases et des RR.

(Wu *et al.*, 1998)

-du côté carboxy-terminal se trouve le domaine effecteur qui varie d'un RR à l'autre. Très souvent ce domaine peut se lier à l'ADN et agir directement comme facteur de transcription (Stock *et al.*, 1995).

La structure tridimensionnelle du domaine receveur des RR est bien connue grâce à l'étude du régulateur de réponse CheY composé du domaine receveur seul (Stock *et al.*, 1990). Trois résidus fortement conservés parmi les différents domaines receveurs sont colocalisés au sein d'une poche acide, siège de la phosphorylation. Leur présence permet de définir les domaines receveurs des régulateurs de réponse.

Dans le cas d'un RR agissant directement comme facteur de transcription on explique son activation de la manière suivante: à l'état non phosphorylé, c'est-à-dire à l'état inactif, le domaine amino-terminal interagirait avec le domaine carboxy-terminal, ce qui empêcherait la liaison de ce dernier à l'ADN. La phosphorylation induirait des mouvements conformationnels qui auraient pour effet de libérer l'extrémité carboxy-terminale effectrice qui pourrait alors se lier à l'ADN (Stock, 1995; Kenney *et al.*, 1995).

1.2.2 Complexification du système

Il existe des variantes de complexités diverses du système décrit précédemment. Par exemple, chez *Bacillus subtilis* et *C. crescentus*, les cascades de transduction du signal à deux composants font souvent intervenir plus de deux protéines (Shapiro and Losick, 1997; Domian *et al.*, 1996); le schéma simplifié "un senseur / un régulateur" ne s'applique alors plus et doit être remplacé par la notion de cascade de phosphorylation faisant intervenir des kinases et des phosphotransférases (fig 1.5).

La raison de la complexification du système à deux composants réside peut-être dans la multiplicité des processus physiologiques à réguler tel que le cycle cellulaire chez *C. crescentus* et la sporulation chez *B. subtilis*.

Signalons aussi que des protéines homologues aux HK et aux RR ont été identifiées récemment chez des organismes eucaryotes, tels que *Neurospora crassa*, *Arabidopsis thaliana* et *Saccharomyces cerevisiae* (Alex and Simon, 1994; Kennelly and Potts, 1996).

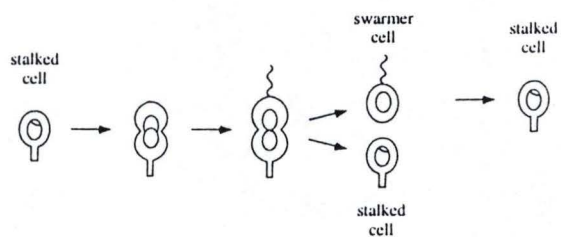


Figure 1.6: Schéma illustrant la division asymétrique chez *C. crescentus*
 Une cellule se divise en une cellule pédonculée et une cellule flagellée. La cellule pédonculée peut entamer sans délai un nouveau cycle de division alors que la cellule flagellée doit préalablement perdre son flagelle et acquérir un pédoncule.
 (Quon *et al.*, 1996)

1.3 CtrA et la transduction du signal chez *C. crescentus*

La protéine CtrA possède toutes les caractéristiques la définissant comme un régulateur de réponse. Elle a été identifiée pour son rôle dans la régulation du cycle cellulaire et du développement morphologique chez *C. crescentus* (Quon *et al.*, 1996).

1.3.1 Le cycle de division et le développement morphologique sont liés

C. crescentus présente une division asymétrique ce qui en fait un excellent prototype d'étude pour le cycle de division bactérien. Une cellule se divise pour donner deux cellules filles: l'une flagellée, l'autre pédonculée. La cellule pédonculée peut, sans délai, entamer un nouveau cycle de division alors que la cellule flagellée doit perdre son flagelle et acquérir un pédoncule avant de pouvoir dupliquer son ADN et donc se diviser (Newton and Otha, 1990); (figure 1.6).

1.3.2 Rôle de CtrA chez *C. crescentus*

CtrA est, comme nous l'avons dit, un régulateur de réponse agissant directement comme facteur de transcription sur de multiples gènes intervenant dans des processus variés. CtrA possède un domaine de liaison à l'ADN reconnaissant de manière spécifique une séquence particulière ("*ctrA* box") présente dans le promoteur des gènes cibles qu'elle contrôle. C'est le cas notamment des gènes flagellaires. Ceux-ci sont organisés en quatre classes s'exprimant l'une après l'autre. Les gènes de classe II tels que *fliL* et *fliQ* possèdent une séquence conservée reconnue par CtrA et nécessaire à leur expression: GTTAAN₇TTAAC. En plus de réguler l'expression des gènes flagellaires de classe II, CtrA est aussi impliquée dans la régulation de la méthylation de l'ADN (via la transcription du gène *ccrM*) et dans la régulation de l'initiation de la réplication de l'ADN (via le promoteur *hemEPs* localisé à proximité de l'ori). On retrouve aussi la "*ctrA* box" dans le promoteur du gène *ccrM* et dans *hemEPs* (Quon *et al.*, 1996).

Des expériences de "footprinting" (protection à l'endonucléase) ont confirmé que CtrA agissait directement sur ces gènes en reconnaissant spécifiquement la

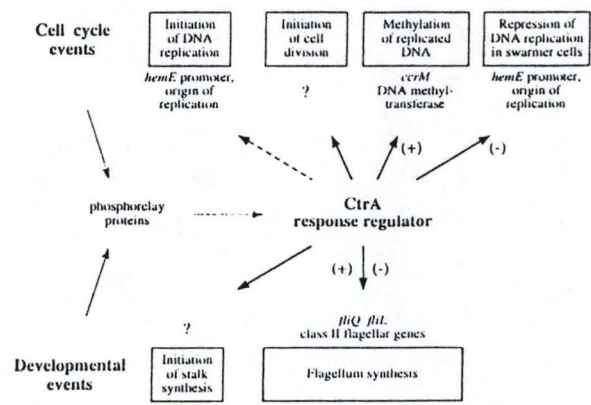


Figure 1.7: Schéma illustrant chez *C. crescentus* le rôle central du régulateur CtrA. CtrA joue un rôle dans le développement morphologique (amorçage de la cascade flagellaire) et dans le cycle cellulaire notamment au niveau de l'initiation de la réplication ou de la méthylation de l'ADN. (Quon *et al.*, 1996)

séquence GTTAAN₇TTAAC et que CtrA pouvait être phosphorylée (Quon *et al.*, 1998). La phosphorylation sur l'aspartate 51 est nécessaire à son activation (Quon *et al.*, 1996).

Le fait que CtrA agisse sur de multiples événements et à différents moments au cours du cycle de division suggère que la cascade de phosphorylation de CtrA réponde à divers signaux et fasse intervenir plusieurs partenaires protéiques. Chez *C. crescentus*, trois protéines ayant un rôle dans la cascade liée à CtrA ont déjà été identifiées: deux HK et un RR à domaine unique (Wu *et al.*, 1998)(figure 1.7).

De ce qui précède, et sachant d'une part que CtrA est essentiel et d'autre part qu'elle agit sur différents sets de gènes, on conçoit CtrA comme étant au centre d'un réseau de régulation, d'où son qualificatif de régulateur central. Par ailleurs, la distribution très large des systèmes à deux composants, en général, chez les bactéries d'une part, et le rôle central de *ctrA* dans la biologie d'une espèce particulière *C. crescentus* d'autre part, laisse penser à priori que d'autres bactéries, et en particulier d'autres $\alpha 2$ Protéobactériacées, pourraient avoir conservé un homologue structural et fonctionnel de ce régulateur.

Le clonage au laboratoire d'un gène de *B. abortus* présentant 80 % d'identité avec CcCtrA pose la question du rôle de CtrA chez cette espèce (Fretin, 1996; de Fays, 1996) a montré que CtrA était effectivement présente dans le genre *Brucella*, mais rien n'est connu du système fonctionnel où elle intervient.

1.4 Questions posées par l'existence d'un homologue à CtrA chez *B. abortus*

Une première observation en relation avec cette interrogation est la présence, chez *B. abortus*, d'autres homologues à des gènes connus pour appartenir au système de régulation auquel CtrA participe chez *C. crescentus*.

Il s'agit du gène *ccrM* (comm. pers., R. Wright), qui chez *C. crescentus* joue un rôle dans la méthylation de l'ADN au moment de la réplication (Stephen *et al.*, 1996). Citons aussi le gène *divK*, dont la protéine a été identifiée comme étant un régulateur de réponse ayant un rôle dans la cascade de phosphorylation liée à CcCtrA. Ce gène a aussi été cloné chez *B. abortus* (D. Devos, comm. pers.). Enfin, bien que *Brucella* soit décrite comme immobile, des gènes homologues à des gènes flagellaires ont été identifiés et leur rôle chez *Brucella sp.* est à l'étude (D. Fretin, thèse en cours). Ajoutons que, comme c'est le cas chez *C. crescentus*, des

expériences de "footprinting" chez *B. abortus* (Bellefontaine, 1997) ont montré que CtrA, *in vitro*, se liait au promoteur de *ccrM* et à son propre promoteur. Toutefois, et bien que *B. abortus* et *C. crescentus* appartiennent toutes deux à la même famille des $\alpha 2$ Protéobactériacées, il faut noter que *B. abortus* ne partage pas les caractéristiques morphologiques liées au développement de *C. crescentus*. Dès lors, et ayant à l'esprit ce qui précède, nous pouvons supposer que l'homologie fonctionnelle entre CcCtrA et BaCtrA pourra concerner aussi des rôles distincts chez les deux espèces.

Dans le but d'identifier la nature de ces rôles, nous avons décidé d'identifier les cibles de CtrA. Pour cela, nous avons opté pour une approche génétique permettant l'identification des cibles directes de BaCtrA.

Objectif du travail

2. Objectif.

Une des approches pour étudier le rôle de CtrA chez *B. abortus* consiste à isoler les cibles régulées par ce facteur. Pour ce faire, nous allons utiliser dans un organisme hôte, *E. coli*, un plasmide "promoter probe". Le système consiste à intégrer dans le génome d'*E. coli* le gène *BactrA* sous le contrôle d'un promoteur fort et régulé et à transformer ensuite la souche ainsi créée avec le vecteur "promoter probe" proprement dit. Celui-ci comporte un rapporteur en aval d'un site multiple de clonage où sera clonée une banque de fragments génomiques "shot gun" de *B. abortus*.

La première étape de notre travail sera de construire la souche hôte *E. coli* exprimant BaCtrA.

Dans une deuxième étape, nous construirons des plasmides "promoter probe" tests en clonant en amont du rapporteur des promoteurs potentiellement régulés par CtrA en vue de valider le système.

La troisième étape consistera à éprouver le système en transformant la souche exprimant CtrA par les plasmides tests, étape préliminaire indispensable avant de passer à l'échelle d'une banque génomique.

Résultats et Discussions

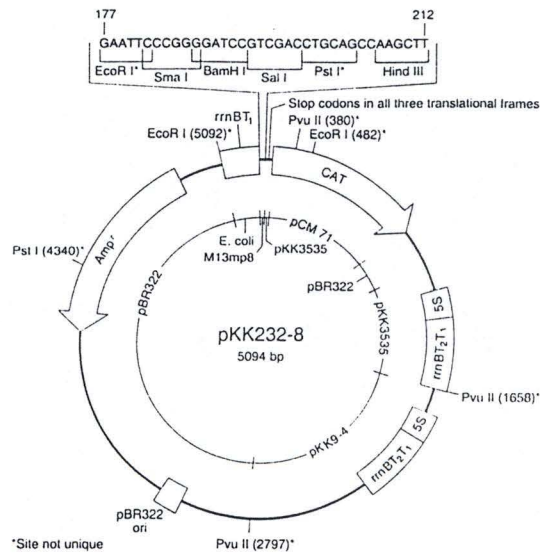


Figure 3.1: Le vecteur pKK232-8 dédié à la sélection de promoteurs

Le vecteur contient:

- Une origine de réplication dans *E. coli*
- Le gène de résistance à l'ampicilline
- Le gène *cat* (chloramphénicol acétyltransférase) dépourvu de promoteur
- Un site multiple de clonage en amont de *cat*
- Des codons stop dans les trois phases de lecture afin d'éviter que la traduction d'un fragment cloné n'entraîne la formation d'une protéine de fusion X-CAT non fonctionnelle pour la résistance au chloramphénicol.
- Des terminateurs de transcription en amont et en aval de *cat* afin d'éviter de déstabiliser le vecteur dans le cas où la transcription progresserait au delà de *cat* ou dans le sens contraire et influencerait négativement l'initiation de la réplication.

3. Résultats et discussions.

3.1 Antécédents du travail

Avant de développer plus en détails le travail réalisé au cours de ce mémoire, nous allons brièvement rappeler le principe du système choisi pour identifier les promoteurs de *B. abortus* régulés par CtrA. Nous expliquerons aussi la tentative réalisée antérieurement à ce travail et ce qui nous a orienté dans le choix d'une stratégie alternative.

3.1.1 Description du plasmide sonde à promoteurs

Dans le but d'identifier des promoteurs régulés par CtrA, le plasmide "promoter probe" pKK232-8 (Pharmacia) a été choisi. Ce plasmide est spécialement conçu pour la recherche en aveugle de promoteurs dans *E. coli*.

Il contient une origine de réplication chez *E. coli*, un gène de résistance à l'ampicilline Amp^R (ou encore *bla*) et un gène de résistance au chloramphénicol (*cat*) dépourvu de promoteur (figure 3.1).

En amont de *cat* se trouve un site multiple de clonage (MCS) permettant d'y cloner des fragments dont on veut tester l'activité promotrice éventuelle. En plus de permettre l'identification de promoteurs, le pKK 232-8 est aussi utilisé pour mesurer la force de ceux-ci grâce à deux tests semi-quantitatif et quantitatif. Le test semi-quantitatif se base sur l'utilisation de différentes concentrations en chloramphénicol. Le test quantitatif fait appel au dosage de l'activité de CAT.

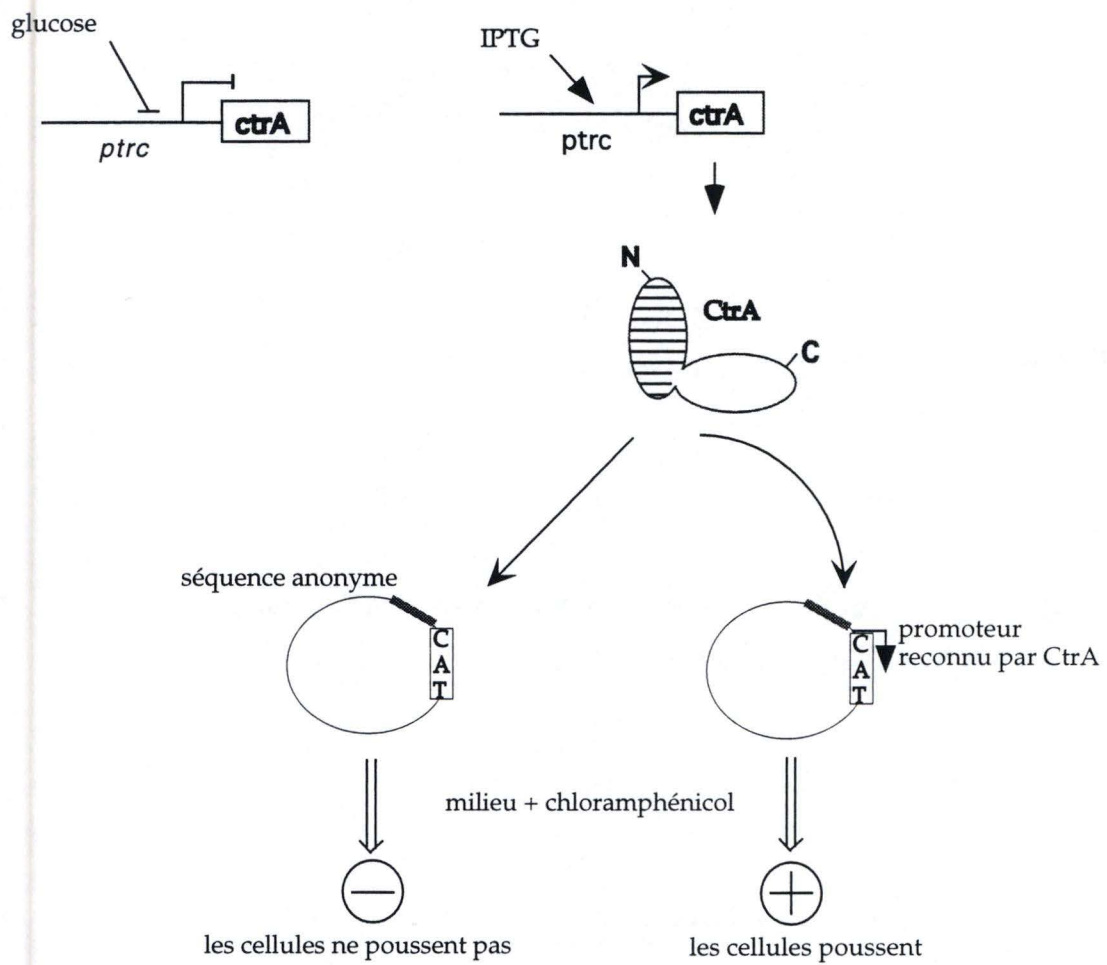


Figure 3.2: Schéma illustrant le principe du "promoter probe"

En présence d'IPTG, CtrA est exprimée et peut activer les promoteurs qu'elle reconnaît spécifiquement.

Si au MSC a été cloné un promoteur spécifique de CtrA la cellule va croître sur milieu contenant du chloramphénicol.

3.1.2 Application à la recherche de promoteurs de *B. abortus* régulés par CtrA dans l'organisme hôte *E. coli*

Comme nous l'avons précédemment expliqué, le pKK232-8 est conçu pour l'identification de promoteurs chez *E. coli*. La stratégie choisie au laboratoire a été d'utiliser ce système pour identifier des promoteurs de *B. abortus* régulés par CtrA. Pour que le système soit opérationnel, il est nécessaire de pouvoir réguler l'expression de CtrA. Comme à l'heure actuelle, il n'existe aucun promoteur réguleable chez *Brucella*, le choix de travailler chez *E. coli* s'est imposé.

Le pari a donc été fait que des cellules *E. coli* exprimant CtrA et transformées par un plasmide pKK232-8 recombinant portant le rapporteur *cat* placé sous la dépendance d'un promoteur spécifique de CtrA seront résistantes au chloramphénicol (figure 3.2). A ce stade, nous faisons donc l'hypothèse qu'une partie de BaCtrA exprimée chez *E. coli* sera sous forme active, grâce à des régulations croisées. La régulation croisée a été définie dans ce contexte comme étant le contrôle d'un régulateur de réponse par un autre système de régulation, appartenant ou non aux deux composants (Wanner, 1992). Il existe des exemples de régulations croisées chez *E. coli* et *Salmonella typhimurium* où un régulateur de réponse est activé par phosphorylation par une histidine kinase différente de son partenaire spécifique habituel. Nous espérons que sous cette forme active CtrA pourra, d'une part, reconnaître ses cibles dans un environnement étranger et, d'autre part, recruter la machinerie transcriptionnelle de *E. coli*.

L'ORF de CtrA a été clonée derrière le *ptrc*², promoteur réguleable dérivé du *plac* (Amann and Brosius, 1985). Ainsi, via le *ptrc*, l'expression de CtrA peut être induite par l'IPTG et réprimée en présence de glucose.

² le préfixe *p* utilisé devant l'écriture en trois lettres d'un gène désigne dans la suite du texte le promoteur de celui-ci.

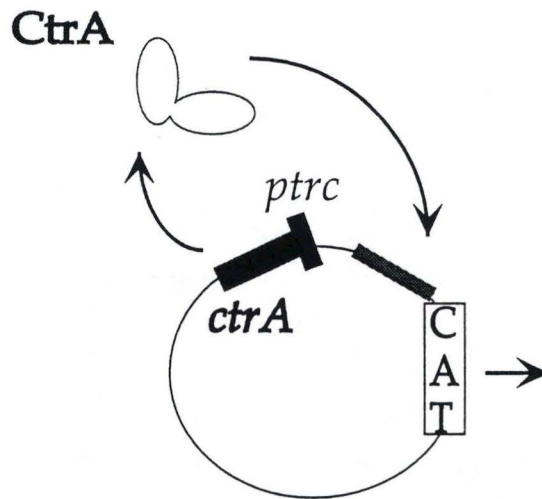


Figure 3.3: Système deux-en-un, proximité entre le facteur *trans* et la séquence *cis*
 Le clonage sur le plasmide "promoteur probe" de la cassette d'expression *ptrc-ctrA* favorise les interactions du facteur *trans* CtrA avec l'élément *cis* (les séquences clonées au MCS).

	IPTG: induction de CtrA		glucose: répression de CtrA	
	-Cm	+Cm	-Cm	+Cm
232-8	+++	-	+++	-
232-8-ctrA	+	-	+++	-
232-8ctrA/ <i>pctrA</i>	+	-	+++	+
232-8-ctrA/ <i>pccrM</i>	+	-	+++	+
232-8-ctrA/ <i>pomp2b</i>	+	-	+++	+

Figure 3.4: Tableau des résultats obtenus lors des tests de validation du modèle "deux-en-un"

Cinq constructions ont été testées: le "promoteur probe" 232-8 seul, le 232-8*ctrA* et trois plasmides 232-8*ctrA* dans lesquels on a respectivement cloné les promoteurs *pctrA*, *pccrM* et *pomp16*. Ces trois dernières constructions représentent respectivement deux contrôles supposés positifs avec des promoteurs présumés cible de CtrA et un contrôle négatif avec un promoteur présumé neutre.

L'analyse des résultats révèle, comme attendu, que les cellules portant le plasmide poussent aussi bien sur IPTG que sur glucose et qu'elles meurent en présence de chloramphénicol. Les cellules transformées par le 232-8*ctrA*, présentent un retard de croissance significatif en présence d'IPTG par comparaison aux mêmes cellules en présence de glucose. Les cellules transformées par le 232-8-*ctrA pomp2b* contenant un promoteur non spécifique se comportent comme celles contenant un promoteur supposé spécifique: elles poussent sur glucose + chloramphénicol et meurent lorsque CtrA est exprimé en présence d'IPTG + chloramphénicol.

Dans cette souche *E. coli* exprimant CtrA de manière régulable, le système "promoter probe" sera testé avec des promoteurs de *B. abortus* potentiellement régulés par CtrA. Cette expérience de simulation est une étape préliminaire à l'utilisation ultérieure de ce système en grandeur réelle avec une banque génomique de *B. abortus*.

Afin que les cellules transformées avec le plasmide "promoter probe" expriment CtrA, la cassette d'expression *ptrc-ctrA* a été clonée dans le plasmide "promoter probe" lui-même, afin de bénéficier d'un effet de proximité entre CtrA et ses cibles (figure 3.3). Ce plasmide désigné 232-8ctrA dans la suite de ce travail a été construit au cours d'un mémoire précédent (Bockstael, 1997).

Nous avons rebaptisé cette stratégie système "deux-en-un": le facteur *trans* (CtrA) et la séquence *cis* (les promoteurs cibles) sont portés par le même plasmide.

3.1.3 Tentative de validation du modèle "deux-en-un"

Des fragments contenant des promoteurs supposés régulés par CtrA ont été clonés dans le plasmide 232-8ctrA au MCS. Les phénotypes attendus pour les cellules transformées avec ces plasmides tests sont montrés en détail à la figure 3.4. Il ressort de l'expérience qu'en condition d'induction (IPTG), et en jouant sur la température afin d'obtenir des protéines BaCtrA en phase soluble³, *E. coli* accuse un fort retard de croissance: BaCtrA semble être un fardeau pour la croissance de *E. coli* (Bellefontaine, 1997).

Plusieurs approches peuvent être tentées afin d'atténuer le fardeau supposé lié à CtrA, notamment diminuer le taux d'expression de *ctrA* en abaissant le nombre de copies présentes par cellule. En effet, le pKK232-8 est un plasmide présent entre 15 et 35 exemplaires dans la cellule.

Dès lors, une stratégie alternative au système "deux-en-un" réside dans l'intégration du gène *ctrA* dans le génome de *E. coli* pour n'avoir plus qu'une

³ à 37 °C la majorité des protéines CtrA se retrouve dans les corps d'inclusion, et donc sous forme non fonctionnelle, alors qu'à 25°C, la majorité des protéines CtrA est sous forme soluble.

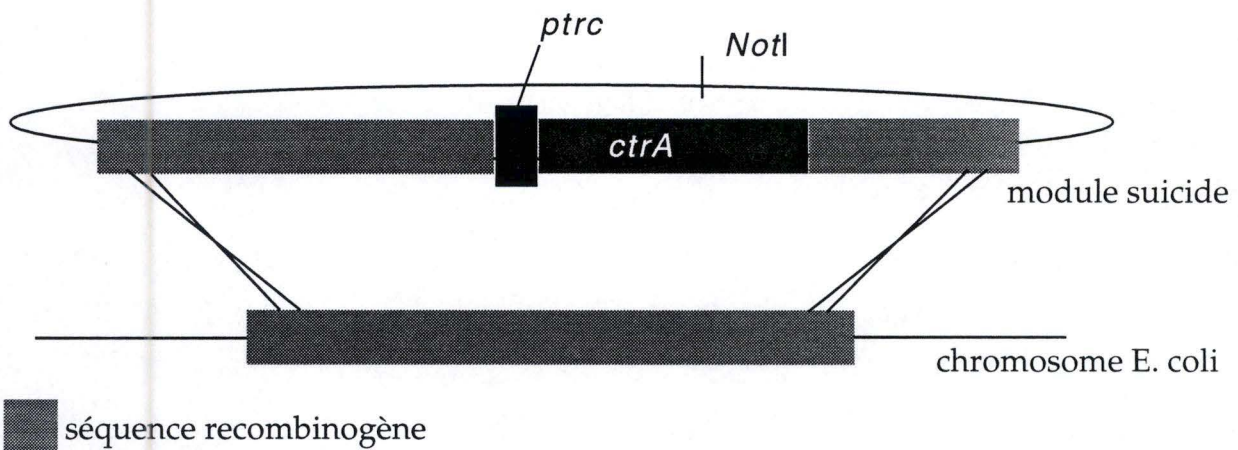


Figure 3.5: Schéma illustrant le principe de l'intégration du module suicide

La cassette d'expression *ptrc-ctrA* est bordée par des séquences identiques au locus d'intégration visé facilitant par la recombinaison homologue l'intégration du module suicide au locus cible.

seule copie par cellule, afin d'éviter ainsi le retard de croissance imputé à une trop grande quantité de protéine CtrA produite.

L'expression de *ctrA* pourra toujours être modulée en jouant sur l'induction/répression du promoteur régulable *ptrc*.

3.2 Création par intégration de la souche *E. coli* TG1ctrA

3.2.1 Principe de la stratégie

Sur base d'expériences antérieures (Lafontaine, 1995; Kraiss *et al.*, 1997), nous avons décidé d'intégrer la cassette d'expression *ptrc-ctrA* dans un locus défini du génome de *E. coli* à l'aide d'un module suicide incapable de se répliquer dans la cellule-hôte et bordé de bras recombinogènes ciblant l'intégration à ce locus spécifique (figure 3.5).

Nous avons utilisé la souche *E. coli* TG1 dont le génotype est décrit au chapitre 5 (matériel et méthodes). Cette souche est sauvage pour le gène *recA*: son taux de recombinaison est mille fois supérieur à celui d'une cellule mutée pour ce gène. Cependant, elle est aussi sauvage pour les gènes *recB*, *C*, *D* et *sbcC*: elle produit normalement l'exonucléase V codée par *recB*, *recC* et *recD* qui dégrade l'ADN linéaire (Goldman & Linn, 1972). Aussi, notre vecteur suicide doit être circularisé afin d'éviter tout risque de dégradation par l'exonucléase V.

La séquence neutre choisie pour l'intégration se trouve au locus du gène *pyrF* qui encode l'orotidine 5'-P-décarboxylase, enzyme intervenant dans la synthèse de l'uracile. Cette enzyme est non essentielle si on fournit à la cellule de l'uracile. On peut donc, en travaillant sur milieu contenant de l'uracile, disrupter ce gène pour intégrer le module suicide sans perte de viabilité de la cellule.

Une fois le vecteur "promoter probe" introduit dans les cellules ayant intégré *ptrc-ctrA*, nous disposerons d'un outil permettant de tester l'activité promotrice

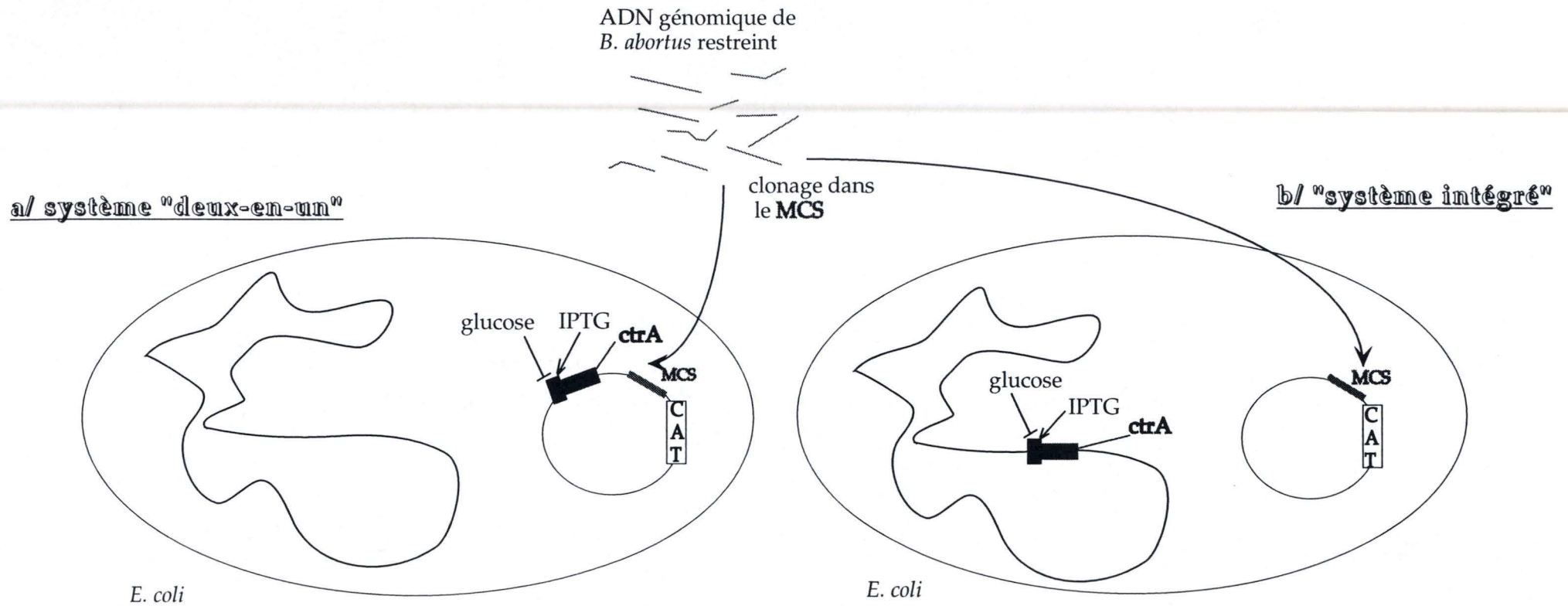


Figure 3.6: Représentation schématique des deux modèles d'étude testés

Via le promoteur *ptrc*, l'expression de CtrA est induite en présence d'IPTG et est réprimée en présence de glucose. La cellule est transformée avec le vecteur "promoter probe" contenant des fragments de restriction d'ADN génomique de *Brucella* dont on teste l'activité promotrice.

a/ La cassette d'expression est clonée dans le plasmide "promoter probe" présent entre 15 et 35 exemplaires dans la cellule.

b/ L'organisme hôte *E. coli* contient la cassette *ptrc-ctrA* intégré dans son génome, c'est-à-dire que *ctrA* est présent en un seul exemplaire dans la cellule.

de fragments génomiques en présence de CtrA. Cette alternative désignée par le terme "système intégratif" est représentée en parallèle au système "deux-en-un" à la figure 3. 6.

3.2.2 Construction du module d'intégration

Notre premier objectif est donc d'obtenir un vecteur non répliatif ou suicide, possédant la cassette *ptrc-ctrA* bordée par des séquences "recombinogènes" chez *E. coli*. Notre vecteur devra aussi contenir la cassette *kan* qui nous permettra de sélectionner facilement les intégrants.

La construction de ce vecteur se résume en 3 étapes. Les deux dernières ont été réalisées au cours de ce travail et seront plus détaillées (figure 3.7).

3.2.2.1 Disruption du gène *pyrF* (cloné dans le *pGEM-T*) par la cassette d'expression *ptrc-ctrA*

La cassette d'expression *ptrc-ctrA* est excisée du plasmide *pKK233-2ctrA* construit précédemment et est clonée par disruption de *pyrF*. Cette construction est nommée par la suite *pFB1* (travail réalisé au laboratoire, par A.F. Bellefontaine).

3.2.2.2 Clonage du marqueur *kan* dans le *pFB1* (*pFB1-kan*)

Afin de sélectionner l'événement d'intégration nous introduisons à côté de la cassette d'expression *ptrc-ctrA* le gène *kan* apportant la résistance à la kanamycine. Le gène *kan* est excisé du plasmide commercial *pUC4K* par restriction totale *SalI* et est cloné au site *SalI* (1951) dans le *pFB1*. Le *pFB1* contient deux sites *SalI*, l'un dans *pyrF* en position 1951 et l'autre en dehors de *pyrF* en position 2394. Il existe donc plusieurs possibilités de clonage de *kan* (figure 3.8). Seul le clonage au site 1951 permet d'obtenir la cassette *kan* comprise entre les deux séquences "recombinogènes" du module suicide en construction. Nous

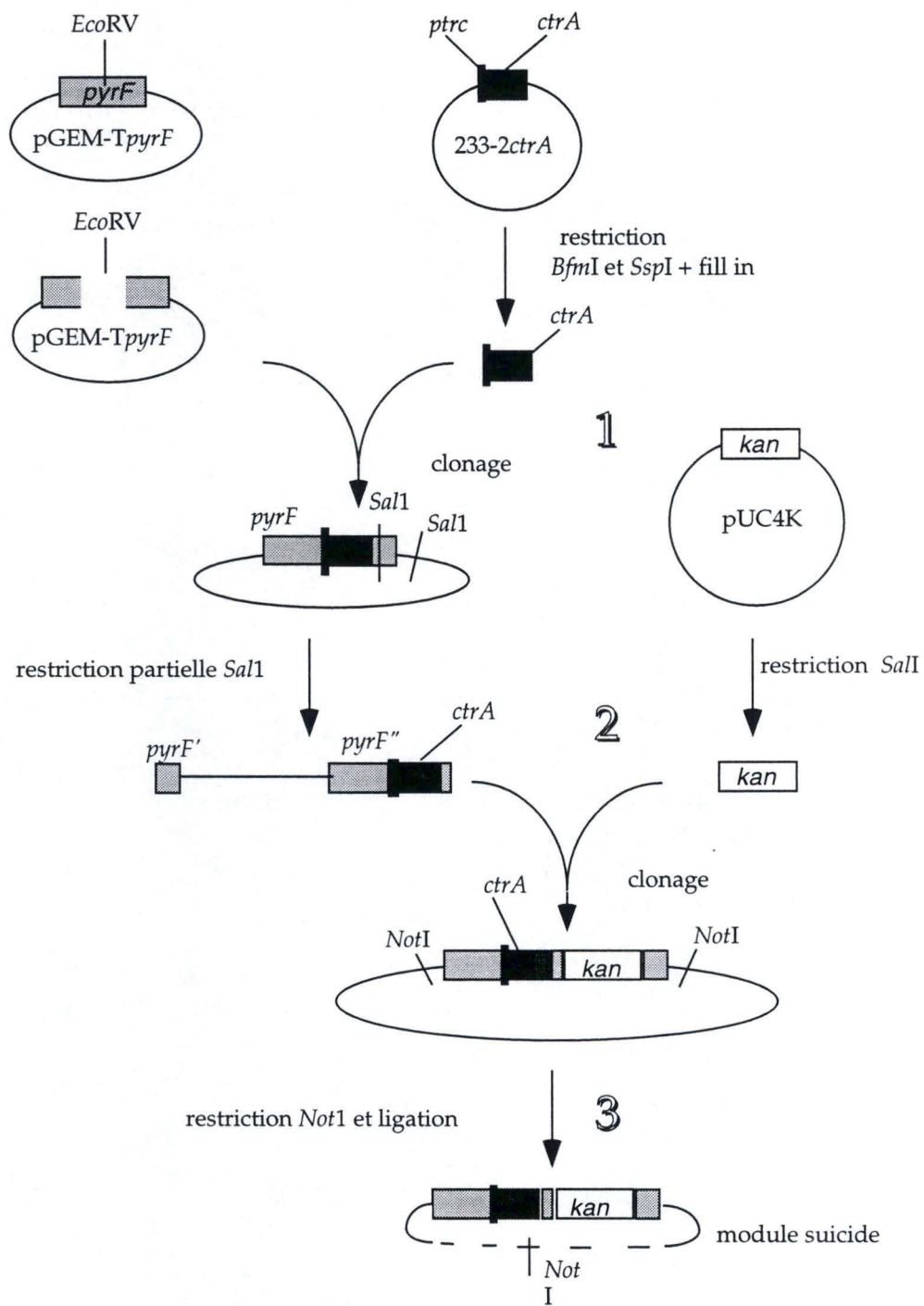


Figure 3.7: les trois étapes de la construction du module suicide

1/ disruption du gène *pyrF* cloné dans le pGEM-T par la cassette d'expression *ptrc-ctrA*

2/ clonage du marqueur *kan* dans le pFB1

3/ restriction *NotI* et récupération du module suicide "religué" sur lui même au niveau des sites *NotI*

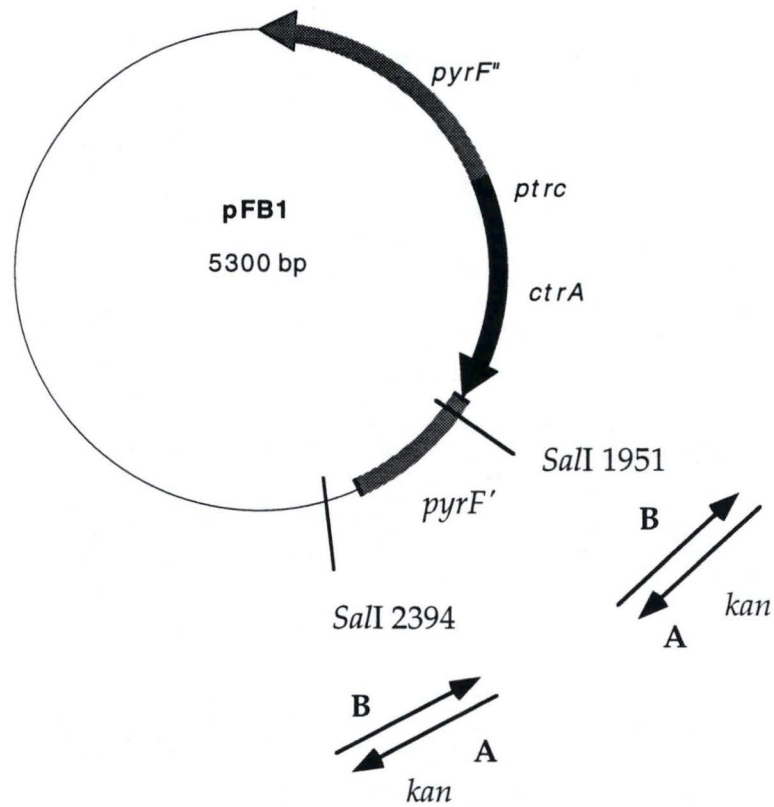


Figure 3.8. Les différentes possibilités de clonage de la cassette kan

Six possibilités se présentent:

- la cassette *kan* peut s'insérer au site 1951 dans 2 orientations (A ou B)
- la cassette *kan* peut s'insérer au site 2394 dans 2 orientations (A ou B)
- la cassette *kan* peut remplacer le fragment compris entre les deux sites *SalI* (#1951 et 2394) et ce dans les deux orientations (A ou B).

devons donc sélectionner, parmi les clones ayant reçu la cassette *kan*, ceux où elle s'est insérée au site 1951.

La sélection se fait après transformation par choc thermique de cellules DH10B CaCl₂ compétentes. Les cellules sont cultivées sur milieu LB supplémenté en ampicilline 100 µg/ml et kanamycine 25 µg/ml. Nous avons tout d'abord discriminé, par PCR, les clones où la cassette *kan* s'était insérée au site 1951. Puis, pour connaître l'orientation de la cassette kanamycine, une restriction diagnostique *Ava*II a été réalisée. Le tableau suivant donne les tailles attendues (en pb) des fragments PCR et des fragments de restriction *Ava*II:

	PCR	<i>Ava</i> II
<i>Sal</i> I 1951	2312	A: 4314-2038-222 B: 3335-3017-222
<i>Sal</i> I 2394	1060	A: 4757-1595-222 B: 3778-2574-222
<i>Sal</i> I double	1910	A: 4314-1595-222 B: 3316-2573-222

A et B donnent l'orientation de la cassette *kan* (cf figure 3.8)

Les résultats que nous avons obtenus en PCR et en restriction *Ava*II sont présentés à la figure 3.9. Nous avons isolé deux clones ayant la cassette *kan* au site 1951 dans l'orientation B, c'est-à-dire en opposition avec *ptrc-ctrA*.

A ce stade nous avons vérifié par Western blot que CtrA s'exprimait bien dans le pFB1kan. La cassette *ptrc-ctrA* étant en opposition avec celle de *kan* on peut craindre que lorsque *ctrA* est transcrit, *kan* ne puisse l'être ou inversement, en raison d'un effet induit de surenroulement local de l'ADN. Les résultats du Western Blot montrent qu'en présence d'IPTG, les clones testés présentent une bande à la taille attendue pour CtrA de 26 kDa (détection faite avec un sérum polyclonal de lapin anti-CtrA; résultats non montrés). La construction du module suicide a donc pu se poursuivre.

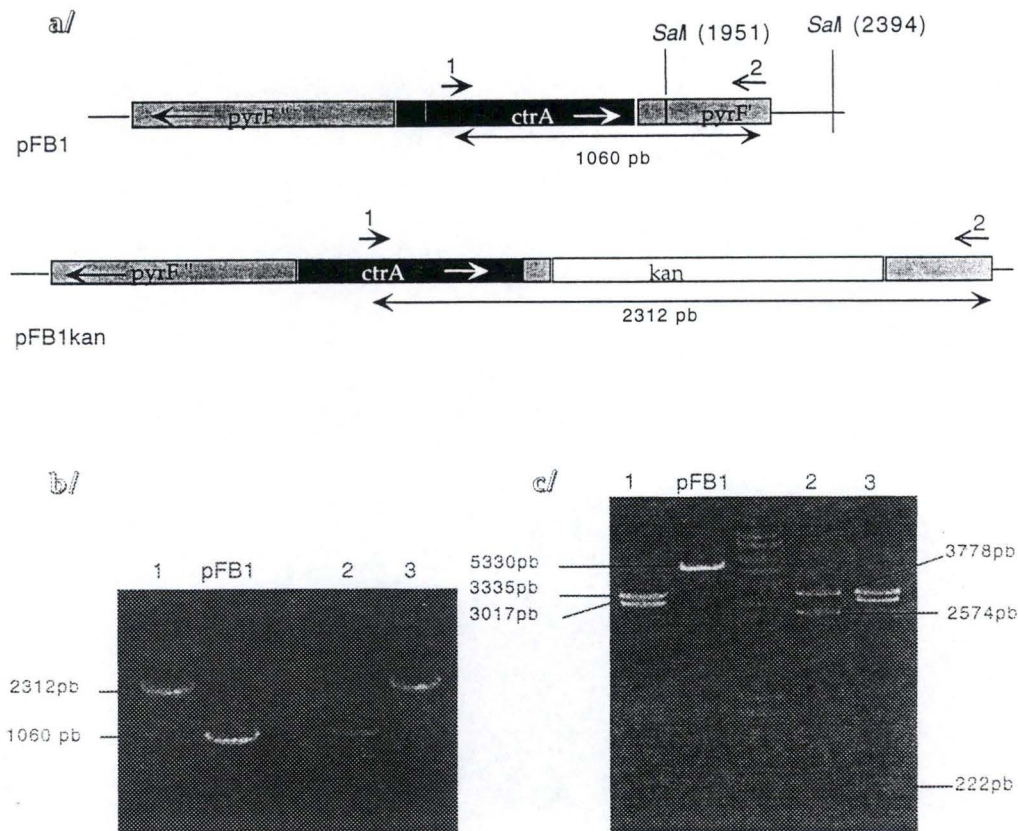


Figure 9: Obtention du vecteur intermédiaire pFB1kan

a) primers utilisés pour la PCR diagnostique du pFB1kan

Le primer 1 se trouve 150 bp en aval de l'ATG de l'ORF de *ctrA* et le primer 2 se trouve à l'extrémité 5' de *pyrF*.

Le fragment amplifié mesure 1060 bp en l'absence de *kan* au site *SalI* (1951) et mesure 2312 bp si la cassette *kan* est clonée à ce site.

b) résultats obtenus pour trois clones résistants à la kanamycine

les clones 1 et 3 présentent un profil d'insertion de *kan* au site 1951.
le clone 2 est aligné sur le pFB1: l'insertion s'est faite au site 2394.

c) profils de restriction *AvaII* obtenus sur trois clones testés

La restriction confirme les résultats obtenus en PCR. De plus elle permet de dire que l'insertion au site 1951 s'est faite dans l'orientation B.

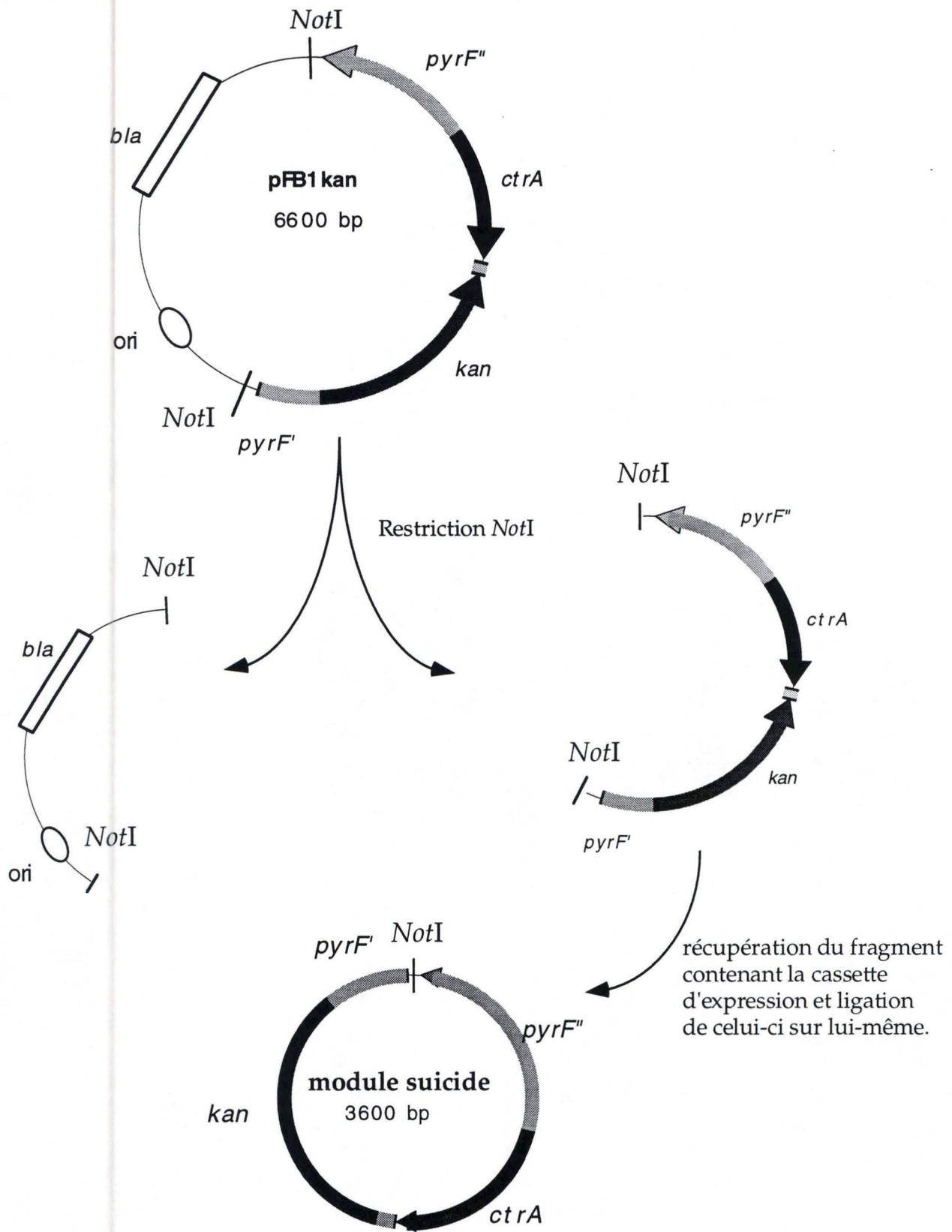


Figure 3.10: construction du module suicide à partir du pFB1kan

Après restriction *NotI* du pFB1kan, le fragment contenant *pyrF* est recircularisé par ligation. La cassette d'expression *ptrc-ctrA* est assortie à ses extrémités de séquences du gène *pyrF* permettant l'insertion au locus spécifique *pyrF* par double recombinaison homologue. La cassette kanamycine permet la sélection des clones intégrant après transformation.

3.2.2.3 Obtention du module suicide non répliatif

Le plasmide intermédiaire pFB1kan fait 6600 pb. Il est composé de deux parties délimitées par des sites *NotI*: l'une comporte le gène *pyrF* disrupté par les cassettes *ptrc-ctrA* et *kan* et l'autre comprend le gène *bla* pour la résistance à l'ampicilline et l'origine de répliation (figure 3.10). Après restriction *NotI* du pFB1kan, le fragment contenant *pyrF* disrupté est récupéré et recircularisé sur lui-même.

A ce stade nous disposons du module non répliatif nécessaire à l'intégration de *ctrA* chez *E. coli*. Le gène *ctrA* y est bordé de séquences recombinoènes et la cassette *kan* permettra la sélection des intégrants.

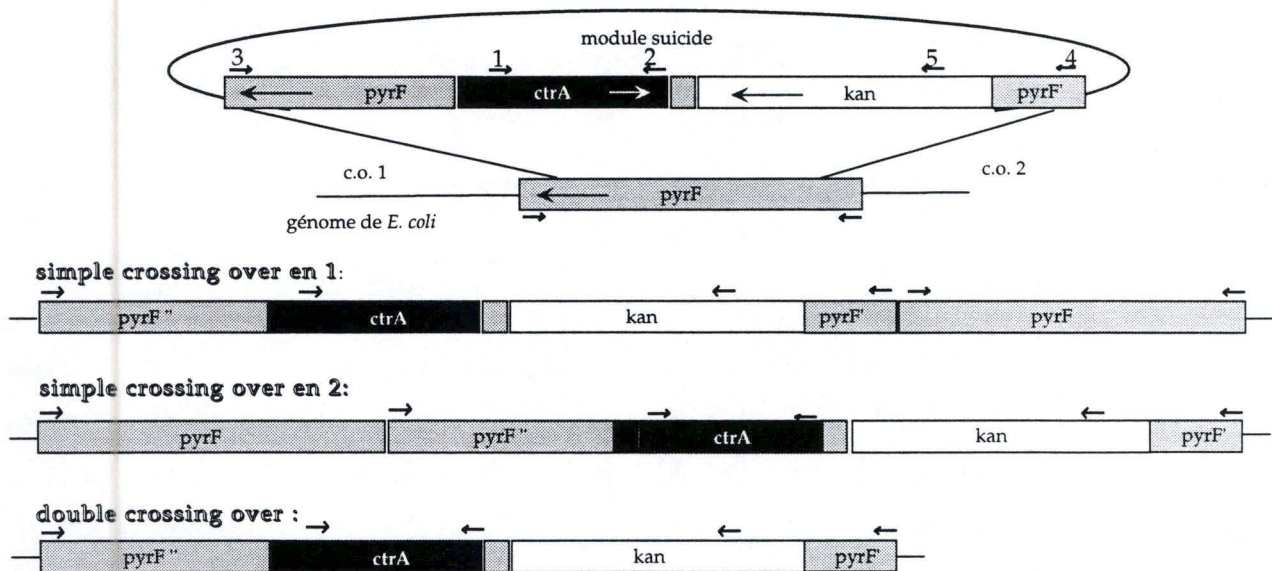


Figure 3.11: possibilités d'intégration du module suicide dans le génome de *E. coli* au sein de *pyrF*

L'intégration peut être duplicative dans le cas d'un simple crossing-over (c.o.) ou disruptive dans le cas d'une recombinaison par double c.o.

Les flèches représentées sur ce schéma symbolisent les primers utilisés ultérieurement lors des PCR diagnostiques.

1 et 2: primers permettant l'amplification de l'ORF de *ctrA*.

3 et 4: primers permettant l'amplification du locus *pyrF*.

5: primer s'hybridant sur la cassette *kan* et utilisé conjointement avec le primer 1 pour amplifier la région en aval de *ctrA*.

3.2.3 Création proprement dite de la souche TG1CtrA

3.2.3.1 Les différentes possibilités d'intégration

Les séquences homologues à *pyrF* comprises dans le module suicide vont permettre l'intégration par crossing-over de la cassette d'expression au locus défini du génome de *E. coli*.

Compte tenu du fait que le module suicide est circulaire, plusieurs possibilités d'intégration sont envisageables. L'intégration peut se faire au locus *pyrF* par simple ou double crossing-over (figure 3.11). Dans le cas d'un simple crossing-over, une copie du gène *pyrF* est reconstituée et l'intégration est dite conservative. Dans le cas d'un double crossing-over, le gène est disrupté et l'intégration est dite disruptive. L'intégration peut aussi être ectopique si le module va s'insérer n'importe où dans le génome.

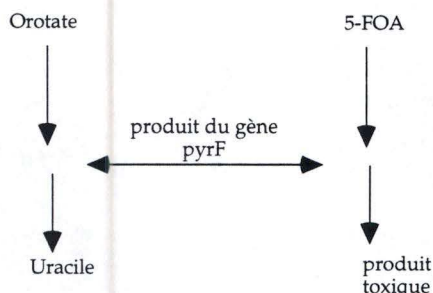
3.2.3.2 Sélection des candidats et caractérisation préliminaire sur différents milieux

Après électroporation de la souche TG1 avec le module suicide, nous avons sélectionné les candidats intégrants sur un milieu LB + kanamycine. Ce milieu nous permet de sélectionner sans distinction tous les clones ayant intégré le module suicide.

Une première discrimination parmi les types d'intégrations se fonde sur le phénotype lié au marqueur *pyrF* choisi comme locus cible de l'intégration. En effet, le gène *pyrF* encode une enzyme intervenant dans la synthèse de l'uracile: seules les cellules possédant une copie entière du gène *pyrF* peuvent pousser sur milieu sans uracile (sélection positive). Inversément, sur milieu contenant de l'uracile et du 5-FOA, seules les cellules ne possédant plus l'activité orotidine 5' phosphate (sélection négative), c'est-à-dire ayant le gène *pyrF* disrupté peuvent

Figure 3.12: Figure illustrant le principe et les résultats de l'identification phénotypique sur milieux sélectifs des différents types d'intégrants obtenus.

a) biosynthèse de l'uracile et toxicité liée au 5-FOA.



Les cellules peuvent synthétiser l'uracile à partir de l'orotate grâce à l'enzyme orotidine 5' phosphatase encodée par le gène *pyrF*.

Si on ajoute dans le milieu du 5-FOA (5 Fluoro Orotic Acid), celui-ci va être transformé en un composé toxique par le produit du gène *pyrF*. Par contre, si la cellule ne possède pas de copie fonctionnelle de *pyrF*, elle peut pousser en présence de 5-FOA.

b) résultats attendus pour la caractérisation de l'intégration en fonction des milieux.

	TG1	Disruptive	Ectopique	Conservative
LB Kan	-	+	+	+
Min-uracile	+	-	+	+
Min + 5-FOA	-	+	-	-

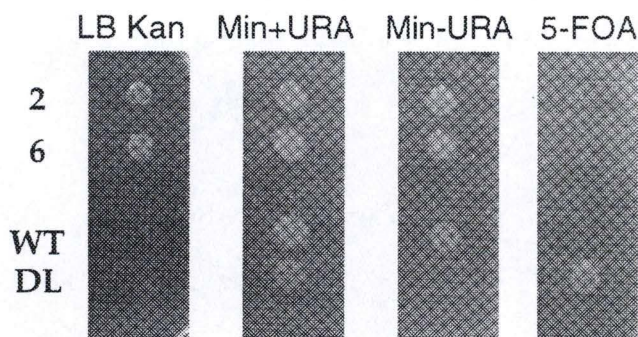
La culture sur milieu kan permet une sélection de tous les clones ayant intégré le module suicide quel que soit le locus d'intégration.

Le milieu sans uracile permet une sélection positive des clones ayant le gène *pyrF* disrupté.

Le 5-FOA permet de confirmer les résultats observés.

Pour valider ces expériences, nous disposons comme contrôle d'une souche DL101 ayant le gène *pyrF* disrupté.

c) observation des phénotypes sur deux clones différents.



Sur cette figure, seuls deux clones sont repris, les résultats obtenus pour les clones 1-3-4-5 sont comparables à ceux des clones 2 et 6. Les phénotypes observés correspondent à une intégration de type conservatif ou ectopique. En effet, les résultats montrent clairement que les clones testés possèdent une copie fonctionnelle de *pyrF*.

pousser (figure 3.12 a). En effet, le 5-FOA est un analogue de l'orotate, composé intermédiaire dans la synthèse de l'uracile, qui est transformé par le produit du gène *pyrF* en composé toxique.

Le milieu 5-FOA, tout comme le milieu sans uracile nous permet donc de tester certaines hypothèses faites quant au type d'intégration (figure 3.12 b).

Les candidats intégrants sélectionnés sur base de leur résistance à la kanamycine ont été testés sur milieu minimum dépourvu d'uracile ou contenant du 5-FOA. Les résultats obtenus pour deux clones sont illustrés à la figure 3.12 c.

De l'ensemble de ces résultats, il ressort que tous les clones testés possèdent une copie fonctionnelle du gène *pyrF*, ce qui suggère que l'intégration est soit de type conservatif, soit de type ectopique.

3.2.3.3 Caractérisation génétique par PCR des clones sélectionnés

Nous avons analysé six clones candidats par PCR pour confirmer le diagnostic apporté par les tests phénotypiques sur milieux et pour préciser la nature de l'intégration.

Nous avons effectué des PCR au moyen de quatre combinaisons d'oligonucléotides:

- 1) des primers « *ctrA* » afin d'amplifier l'ORF de *ctrA*;
- 2) des primers « *pyrF* » localisés aux extrémités du locus *pyrF*;
- 3) un primer dans *ctrA* et un dans *pyrF* afin d'avérer l'intégration de *ctrA* au locus *pyrF*;
- 4) un primer dans *ctrA* et un dans la cassette *kan* afin de vérifier si *ctrA* et *kan* sont toujours reliés physiquement.

Ces primers sont représentés schématiquement à la figure 3.11. Les tailles attendues pour les quatre types de PCR sont illustrées dans le tableau 3.13 a pour les différents types d'intégrations et les profils PCR obtenus pour les six clones testés sont présentés à la figure 3.13 b.

Les résultats de la PCR « *ctrA* » indiquent que tous les clones ont intégré le gène *ctrA*.

Figure 3.13: caractérisation des candidats intégrants par la technique de PCR.

a/ résultats attendus

	TG1	disruptive	ectopique	conservative de type 1	conservative de type 2
ctrA	/	750	750	750	750
pyrF	1500	3600	1500	3600	3600
3'ctrA	/	1800	rien ou 1800	1800	3300
5'ctrA	/	2500	rien ou 2500	4000	2500

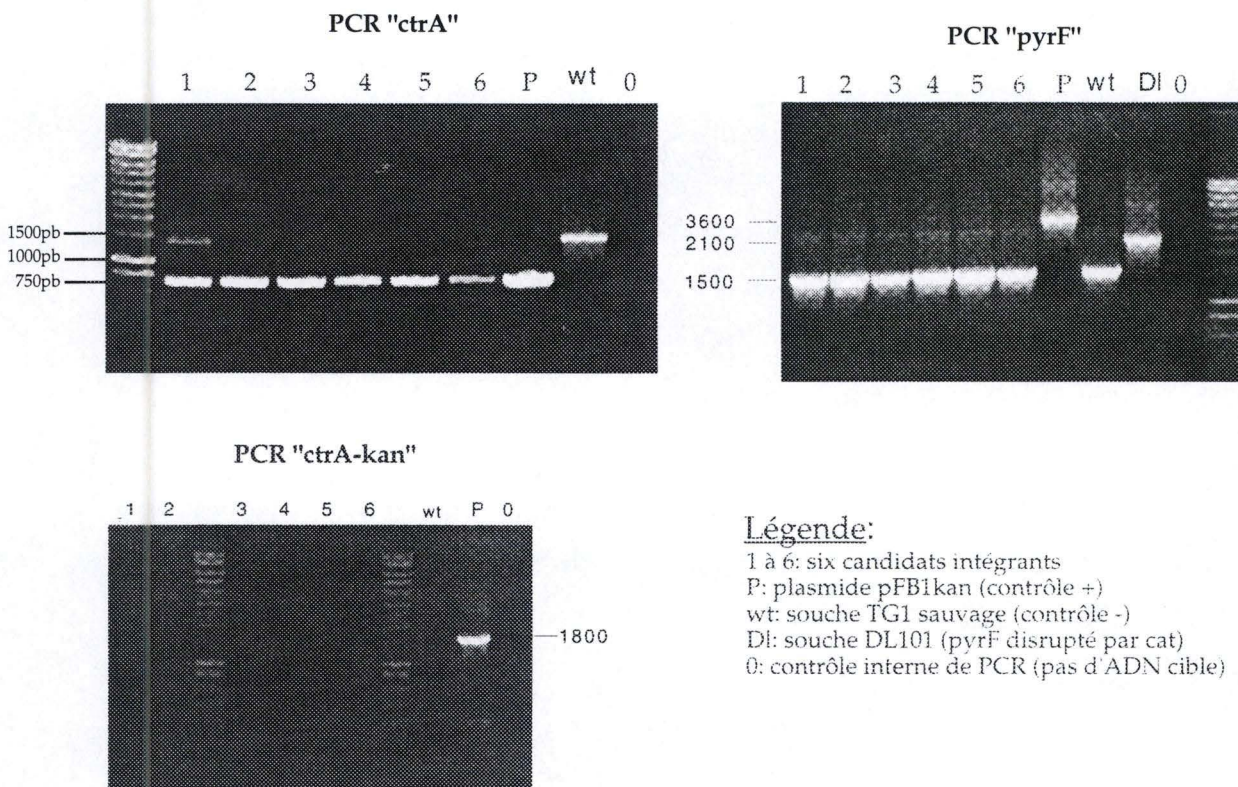
La PCR "ctrA" faite avec les primers situés en amont de l'ATG et du stop de l'ORF permet de vérifier la présence de *ctrA*.

La PCR "pyrF" utilise les primers situés en 5' et en 3' de la séquence *pyrF*. Elle permet d'identifier une intégration de type disruptive.

Les PCR amplifiant les régions amont et aval de *ctrA* permettent de discriminer, dans le cas d'une intégration conservative, le type 1 du type 2.

Si l'intégration est ectopique, on peut imaginer que le module suicide s'est inséré en plusieurs morceaux à différents endroits du génome. Dans ce cas, *ctrA* peut être séparé des séquences recombinogènes qui l'entourent: les PCR ne donnent alors aucun signal.

b/ résultats obtenus en PCR



Les résultats obtenus en PCR sont identiques pour les six clones testés: ils possèdent tous *ctrA* (PCR "ctrA", bande à 750 bp), ils possèdent tous un gène *pyrF* entier (PCR "pyrF", bande à 1500 bp) et aucun ne présente la bande à 1800 attendue en PCR "ctrA-kan".

La PCR « *pyrF* » confirme que tous les clones possèdent un gène *pyrF* sauvage, ce que nous savions déjà grâce aux tests phénotypiques en absence d'uracile et en présence de 5-FOA. L'absence de bande à 3600 pb, correspondant au gène *pyrF* disrupté par le module suicide, semble indiquer que l'intégration s'est faite de manière ectopique, à moins que les conditions de PCR utilisées n'aient pas permis d'amplifier ce fragment. A ce propos, remarquons néanmoins que la bande correspondante est amplifiée au cours de la même réaction de PCR sur le pFB1kan utilisé comme contrôle positif.

Afin de confirmer/infirmer le diagnostic d'intégration ectopique, les PCR « *pyrF-ctrA* » et « *ctrA-kan* » ont été réalisées. Les deux types de PCR sont négatives pour les six clones, ce qui va dans le sens d'une intégration ectopique et fractionnée, à savoir que *ctrA* n'est plus relié à la cassette *kan*.

Etant donné que la procédure favorisait la recombinaison homologue, l'intégration ectopique du module suicide était peu probable, à moins que l'expression de *ctrA* ne soit un fardeau pour *E. coli*. Dans ce cas, n'importe quel schéma d'intégration est de l'ordre du possible.

Cependant, il faut être conscient des limites de la PCR qui n'est qu'une méthode informative rapide, mais pas décisive. Pour conclure sans ambiguïté, un Southern Blot diagnostique devrait être réalisé. Cette expérience a été envisagée mais n'a pu être mise en oeuvre par manque de temps. En utilisant des sondes *pyrF* et *ctrA*, nous pourrions, en fonction des restrictions réalisées, discriminer les schémas d'intégrations des différents clones.

En conclusion, les résultats obtenus en PCR semblent aller dans le sens d'une intégration ectopique du module suicide. Bien que cette intégration n'ait pu être caractérisée plus en détail par Southern Blot, la présence du gène *ctrA* dans les différents clones va nous permettre de passer à l'étape suivante, à savoir vérifier l'expression de la protéine CtrA.

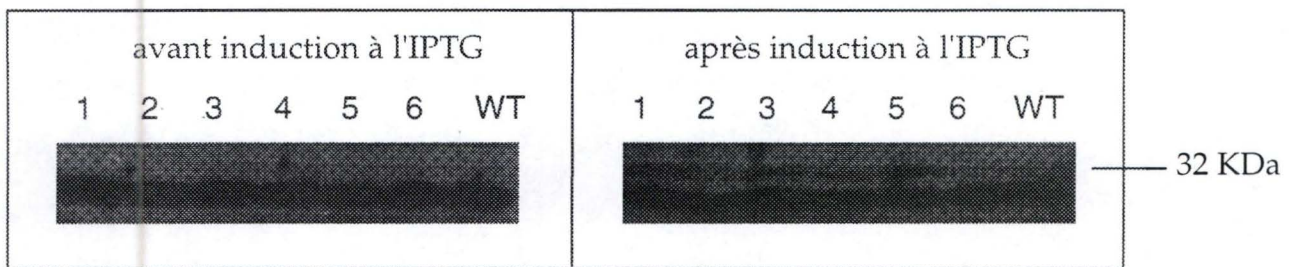


Figure 3.14: Mise en évidence de l'expression de CtrA par la technique du Western Blot

On constate, en condition d'induction, l'apparition d'une bande à 32 KDa ce qui correspond à la taille attendue de CtrA. Cette bande n'est pas visible avant induction. La révélation est faite avec un anticorps polyclonal de lapin anti-CtrA.

3.2.3.4 Vérification de l'expression de CtrA par Western blot

Avant de poursuivre les expériences et de transformer les clones intégrant avec les plasmides "promoter probe", nous devons vérifier, pour que le système puisse être utilisé, que CtrA est exprimée et que son expression est régulable. Un Western Blot sur les six clones candidats (kanamycine résistants, 5-FOA sensibles) a été effectué avant et après induction à l'IPTG. Les résultats obtenus montrent une bande à 26 kDa correspondant à CtrA et qui n'est pas présente avant induction (figure 3.14): *ctrA* est donc bien sous la dépendance de *ptrc*.

Dès lors, nous disposons d'une souche TG1ctrA ayant intégré *ctrA* placé sous le contrôle d'un promoteur régulable et pouvant exprimer CtrA. Cette souche, quelle que soit la localisation de la cassette d'expression *ptrc-ctrA* va nous permettre de tester la validité du modèle d'étude. En effet, l'emplacement même de la cassette importe peu du moment que l'expression de CtrA est avérée et sans conséquence délétère manifeste pour *E. coli*.

3.3 Mise à l'épreuve du système sonde à promoteurs dans la souche TG1ctrA

3.3.1 Principe et Stratégie

Pour tester la validité du "système intégré" et vérifier que le système nous permet bien d'identifier des cibles directes de CtrA, des essais préliminaires ont été pratiqués avec des promoteurs que l'on suppose être régulés par CtrA (des expériences de "footprinting" menées au laboratoire ont montré que CtrA se lie *in vitro* à ces séquences). Pratiquement, nous allons tester la résistance au chloramphénicol de la souche TG1ctrA transformée par les différents vecteurs tests.

D'une manière générale, les résultats attendus sont les suivants:

	LB Amp Kan		LB Amp Kan Cm	
	IPTG	Glucose	IPTG	Glucose
P ⁺	+++	+++	+++	+
P ^c	+++	+++	+	+
P ^o	+++	+++	-	-

P⁺: promoteur régulé positivement par CtrA; P^c promoteur neutre; P^o séquence non promotrice

Plusieurs paramètres interviennent dans la mise au point de ce système. Tout d'abord, nous devons connaître l'intensité de la reconnaissance basale par la machinerie transcriptionnelle de *E. coli*. En effet, tous les promoteurs de *Brucella* testés à ce jour chez *E. coli* sont reconnus de manière basale par sa machinerie transcriptionnelle. Nous devons donc évaluer la concentration seuil de chloramphénicol permettant d'éliminer les faux positifs, c'est-à-dire les clones poussant sur chloramphénicol alors que le promoteur cloné au MCS n'est pas spécifique de CtrA. Dans cette optique, nous utiliserons plusieurs concentrations en chloramphénicol sur milieu LB + glucose et nous sélectionnerons la plus faible de celles qui empêchent les clones de pousser sur ce milieu.

3.3.2 Construction des vecteurs tests

Pour effectuer les tests, nous avons utilisé les promoteurs de *ccrM* (*pccrM*) et *ctrA* (*pctrA*) connus pour être régulés par CtrA et un promoteur que l'on suppose être neutre vis-à-vis de CtrA (le promoteur du gène *omp16* encodant une porine de *B. abortus*).

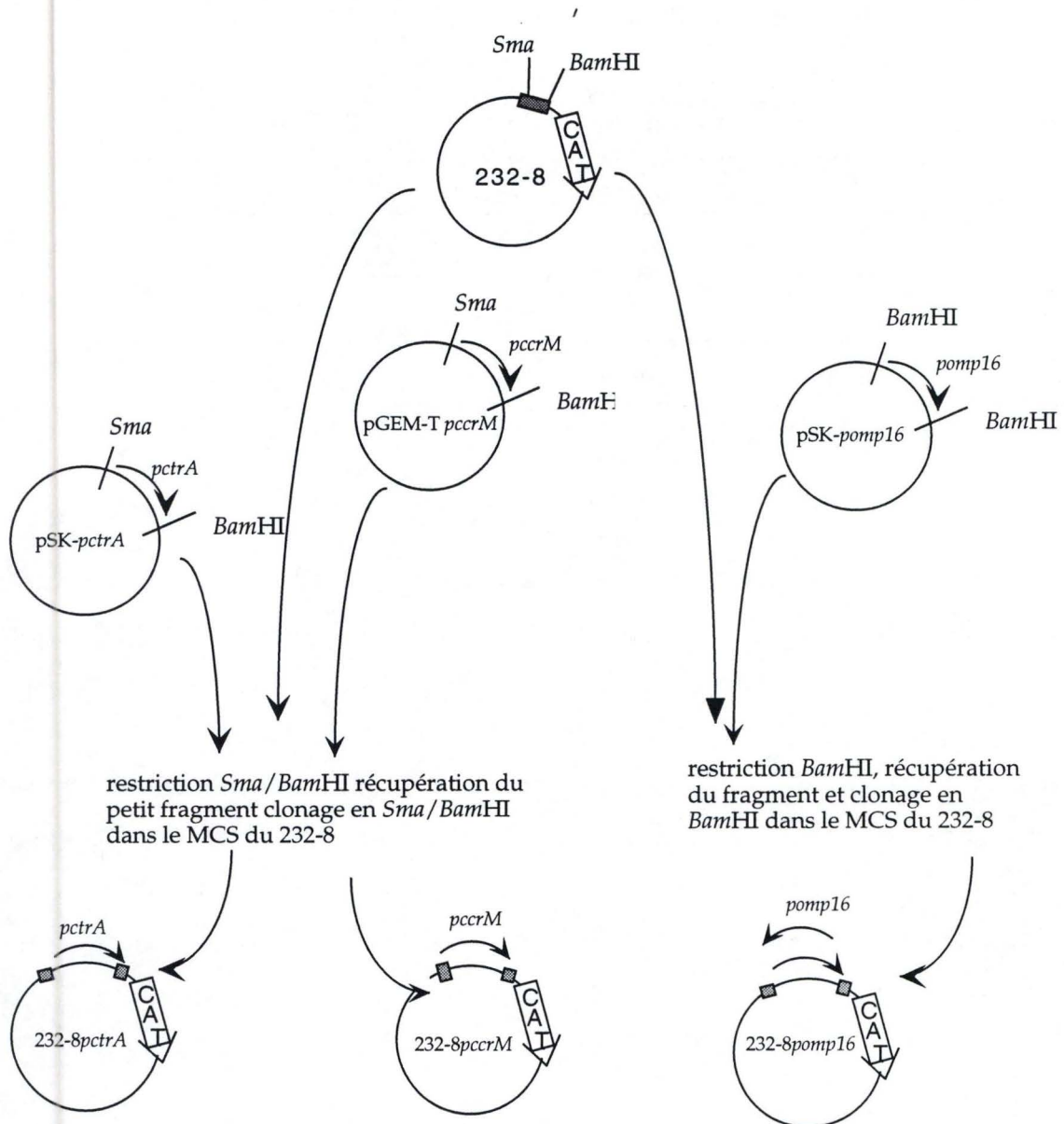


Figure 3.15: construction des plasmides "promoter probe"

Les fragments d'ADN contenant les régions promotrices des gènes *ctrA*, *ccrM* et *omp16* ont été excisés respectivement des plasmides pSK⁻pctrA, pGEM-TpccrM et pSK⁻pomp16 disponibles au laboratoire.

promoteur	plasmide	fragment	restriction
<i>pctrA</i>	pSK ⁻ pctrA	300 pb	<i>Sma</i> I <i>Bam</i> HI
<i>pccrM</i>	pGEM-TpccrM	400 pb	<i>Sma</i> I <i>Bam</i> HI
<i>pomp16</i>	pSK ⁻ pomp16	750 pb	<i>Bam</i> HI

Ces fragments sont clonés en amont de *cat* dans le MCS du pKK232-8 en *Sma*I-*Bam*HI pour les promoteurs *pctrA* et *pccrM* et en *Bam*HI pour le promoteur *pomp16* (figure 3.15).

Le pSK⁻pctrA et le pGEM-TpccrM sont restreints successivement par *Sma*I et *Bam*HI. Les fragments excisés sont ainsi bordés de deux sites de restriction différents ce qui permet un clonage directionnel dans le pKK232-8. Le criblage des clones se fait par restriction diagnostique des plasmides avec une enzyme ayant un site de restriction uniquement présent dans l'insert cloné. Ainsi seuls les clones possédant l'insert pourront être linéarisés. La sélection des clones 232-8pomp16 nécessite une étape supplémentaire car l'insert est ressorti par simple restriction *Bam*HI, ce qui ne permet pas le clonage directionnel. Parmi les clones ayant reçu l'insert, il faut sélectionner ceux dont l'orientation est correcte. Pour cela une restriction diagnostique *Not*I/*Nco*I a été pratiquée.

Cm (cc en µg/ml)		IPTG (1 mM)					Glucose (1%)				
		0	5	10	20	50	0	5	10	20	50
TG1	232-8	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
	232-8pctrA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	232-8pccrM	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
	232-8pomp16	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
TG1 ctrA	232-8	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
	232-8pctrA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	232-8pccrM	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
	232-8	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

Figure 3.16 : Résultats obtenus lors des tests phénotypiques réalisés sur la souche TG1ctrA transformée par les plasmides tests.

Les souches TG1 sauvage et TG1ctrA ont été transformées par le plasmide 232-8 "vide" et par les plasmides 232-8 recombinants 232-8pctrA, 232-8pccrM et 232-8pomp16.

Les signes +, - indiquent respectivement la croissance ou non des cellules

Après transformation des cellules TG1ctrA par les plasmides pKK232-8 tests on s'attend aux résultats suivants:

	LB Amp Kan en absence de chloramphénicol		LB Amp Kan en présence de chloramphénicol	
	IPTG CtrA exprimée	Glucose pas d'expression	IPTG CtrA exprimée	Glucose pas d'expression
232-8	+++	+++	-	-
232-8pctrA	+++	+++	+++	+
232-8pccrM	+++	+++	+++	+
232-8pomp16	+++	+++	+	+

Les souches TG1 et TG1ctrA ont été rendues compétentes par la méthode TSS (matériel et méthodes) et transformées par les quatre plasmides tests.

3.3.3 Transformation de la souche TG1ctrA par les plasmides tests et observation des phénotypes

Les souches TG1 et TG1ctrA transformées par les quatre plasmides tests sont cultivées sur milieu sélectif avec ou sans kanamycine respectivement, et en présence d'ampicilline pour sélectionner les transformants avec les quatre plasmides tests.

Les huit clones ainsi obtenus sont testés sous forme de gouttes sur milieu solide en présence de 1 mM d'IPTG (pour induire l'expression de CtrA) ou en présence de glucose 1% (pour réprimer l'expression de CtrA), et ce sur différentes concentrations en chloramphénicol (0, 5, 10, 20 et 50 µg/ml).

Les résultats obtenus lors de ce test sont représentés dans la figure 3.16.

L'analyse de ces résultats fait ressortir deux points importants: 1°) il existe une hétérogénéité de reconnaissance des promoteurs de *B. abortus* par la machinerie

transcriptionnelle d'*E. coli*, manifestée par les différences de réponses enregistrées pour chacun d'eux; et 2°) il n'y a pas de différence entre les souches TG1 et TG1ctrA, et ce que l'on soit sur milieu IPTG ou glucose, respectivement inducteur ou répresseur de l'expression de *ctrA*.

L'hétérogénéité de résistance au chloramphénicol pour les différents promoteurs testés, qu'ils soient des cibles spécifiques ou pas de CtrA, empêche la définition d'une concentration seuil en chloramphénicol, ce qui à notre point de vue est une hypothèque à l'exploitation de ce système à l'échelle de la banque génomique de *B. abortus*. En effet, nous risquons de ne jamais parvenir à faire la part entre le niveau basal de reconnaissance des promoteurs de *B. abortus* par la machinerie transcriptionnelle d'*E. coli* et la transactivation d'une cible spécifique par CtrA.

En ce qui concerne l'absence de différence entre la souche TG1 sauvage et la souche TG1ctrA, plusieurs hypothèses sont à envisager:

1°) il est possible que dans les conditions testées, la protéine CtrA n'ait pas le temps d'être exprimée avant que la cellule ne subisse l'effet toxique lié au chloramphénicol. Rappelons que l'expression de CtrA a été vérifiée par Western Blot sur extraits liquides et que l'induction à l'IPTG est effectuée alors que la culture est en pleine phase exponentielle de croissance ou début de phase stationnaire. Les tests réalisés avec les quatre plasmides tests sont effectués sur milieu solide où les différentes étapes -ensemencement, induction et expression de CtrA- ont lieu en même temps, par opposition au milieu solide où ces trois étapes sont séquentielles;

2°) dans le cas où la protéine CtrA est produite, il se peut qu'elle soit sous forme inactive (non phosphorylée), ou que la quantité de CtrA activée soit trop faible pour lui permettre d'exercer sa fonction;

3°) si CtrA est exprimée et activée par régulation croisée, il est possible que compte tenu des conditions hétérologues, elle soit empêchée de s'attacher à sa cible. Cette dernière, en raison de sa localisation plasmidique, peut aussi ne pas être reconnaissable par CtrA.

4°) enfin, bien qu'activée et bien que reconnaissant sa cible, CtrA est peut-être incapable d'interagir avec la machinerie transcriptionnelle d'*E. coli* et donc de

produire une augmentation sensible de l'activité de celle-ci, qui se marquerait par une résistance accrue au chloramphénicol.

Conclusions et Perspectives

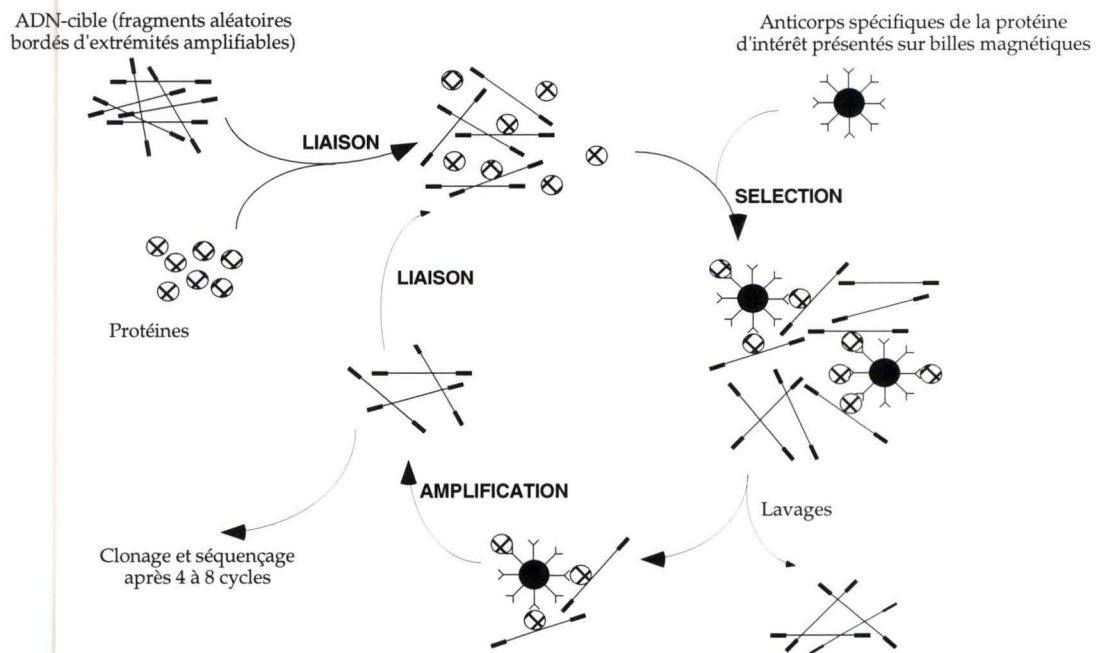


Figure 4.1: Le principe du CASTing (Cyclic Amplification and Selection of Targets)

4. Conclusions et perspectives

Au terme de ce travail, nous sommes amenés à dresser un constat: le système "promoter probe" n'a pas tenu les promesses que nous avons mises en lui.

En effet, aussi bien l'expérience précédente utilisant CtrA exprimée au départ d'un plasmide en multicopie (entraînant un fardeau pour *E. coli*), que la variante intégrative (et donc en monocopie) que nous avons adoptée dans ce travail, n'ont pas permis de satisfaire au test préliminaire. Ce test consistait à vérifier l'expression d'un rapporteur *cat* sous contrôle de promoteurs CtrA-dépendants.

Les hypothèses qui pèsent sur le système tel qu'il a été mis en oeuvre, et que nous avons discutées au chapitre précédent, ne semblent pas aisées à lever.

En effet, l'observation d'un niveau d'expression basal élevé et variable selon la nature des promoteurs utilisés dans l'expérience pilote, et donc l'existence d'un bruit de fond dans les résultats du test, sont incompatibles avec une discrimination efficace des séquences promotrices régulées par CtrA. De plus le comportement de la souche TG1ctrA en tout point identique à celui de la souche sauvage sur les différents milieux est un argument supplémentaire en défaveur de ce système.

Une stratégie alternative à ce système *in vivo* consiste à recourir à la méthode *in vitro* de CASTing (Cyclic Amplification and Selection of Target). Cette méthode réside dans l'amplification et la sélection des cibles nucléiques d'un facteur donné sur base de leur interaction avec celui-ci (Wright and Funk, 1993). La méthode de CASTing illustrée à la figure 4.1 repose sur la répétition cyclique de trois étapes qui sont:

- l'incubation de la protéine d'intérêt avec l'ADN cible
- l'isolement des complexes protéines/ADN et l'élimination de l'ADN non lié par lavage
- l'amplification par PCR de l'ADN lié.

En répétant les cycles, on enrichit au fur et à mesure le mélange en cibles spécifiques du facteur étudié.

Cette méthode a l'avantage de ne pas dépendre de facteurs biologiques tels que ceux rencontrés dans le système que nous avons tenté de mettre au point au cours de ce mémoire.

Nous espérons que par cette méthode, l'identification de gènes cibles de BaCtrA sera possible et permettra ainsi d'aborder la question du rôle fonctionnel de ce régulateur de réponse chez *B. abortus*.

Matériel et Méthodes

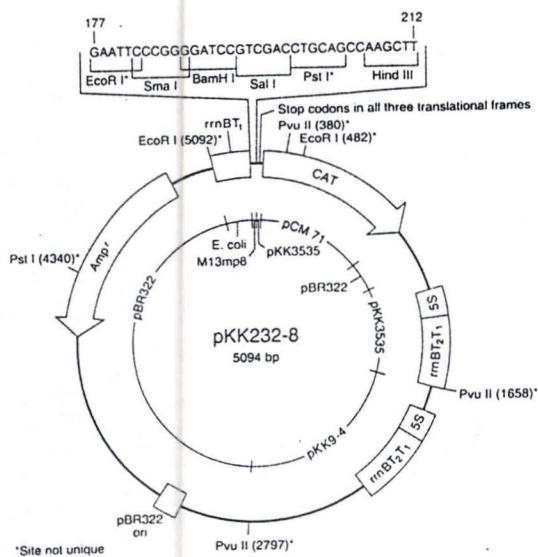


figure 5.1: plasmide pKK 232-8 "promoter probe" (Pharmacia)

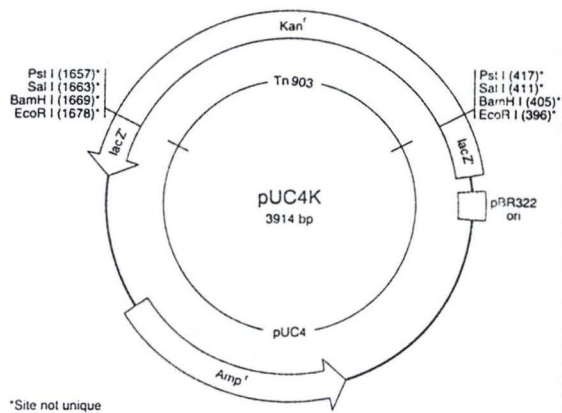


figure 5.2: plasmide puc4K (Pharmacia)

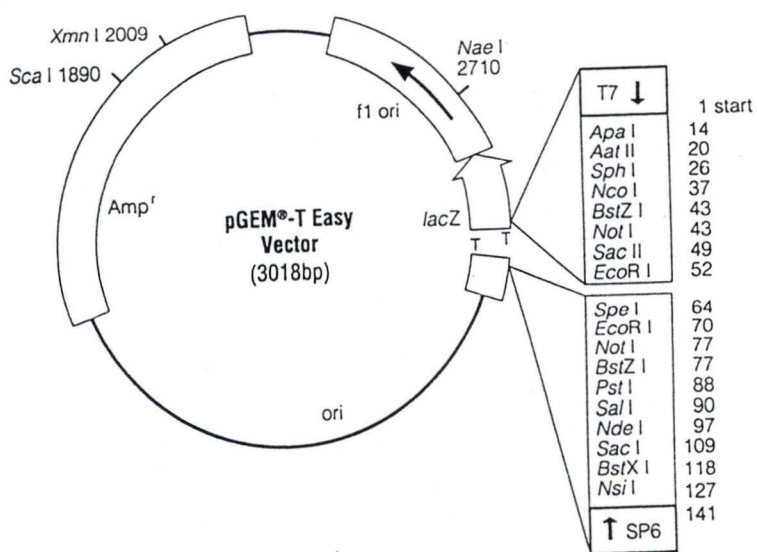


figure 5.3: plasmide pGEM-T (Proméga)

5. Matériels et méthodes.

5.1 Souches bactériennes et plasmides

5.1.1 Les souches

5.1.1.1 TG1

génotype: *sup E*; *hsdΔ5*; *thi*: $\Delta(\text{lac-pro AB})$; F'(tra D36; pro AB⁺; lac Iq; lac ZΔM15)

thi : ces cellules doivent pousser sur un milieu contenant de la thiamine.

Cette souche *recA*⁺ est utilisée pour l'intégration car son taux de recombinaison est 1000 fois supérieur à celui d'une souche *recA*⁻.

5.1.1.2 DH10B

génotype: F⁻*mcr A*, $\Delta(\text{mrr-hsdRMSmcrBC})$, $\phi 80\text{dlac Z}\Delta\text{M15}$, ΔlacX74 , *deoR*, *recA1*, *end A1*, *ara D139*, $\Delta(\text{ara,leu })7697$, *gal U*, *gal K*, λ^- , *rps L*, *nup G*.

Ces cellules sont utilisées en routine pour les constructions car elles permettent l'utilisation du test blanc-bleu, elles sont *recA*⁻ afin de minimiser les recombinaisons.

5.1.2 Les plasmides

5.1.2.1 *pKK232-8* (Pharmacia)

(figure 5.1)

Ce plasmide est spécialement conçu pour tester ou sélectionner des promoteurs dans *E. coli*.

Il contient le gène *cat* encodant la chloramphénicol acétyle transférase qui apporte la résistance au chloramphénicol. Ce gène est dépourvu de promoteur. En amont de *cat* se trouve un site multiple de clonage (MCS) permettant d'insérer des fragments dont on veut tester l'activité promotrice éventuelle. Le taux d'expression du gène *cat*, c'est-à-dire la résistance acquise des cellules au chloramphénicol, permet de mesurer l'activité promotrice des fragments clonés dans le MCS.

Le gène *cat* est flanqué de part et d'autre de terminateurs de transcription afin d'éviter la transcription "readthrough". De plus, il possède aussi comme marqueur de sélection le gène *bla* qui confère la résistance à l'ampicilline.

5.1.2.2 *pUC 4K (Pharmacia)*

(figure 5.2)

Ce plasmide de 3914 pb porte un gène encodant la résistance à la kanamycine (*kan*), La cassette *kan* est rendue mobilisable par la présence de part et d'autre de 4 doubles sites de restriction.

5.1.2.3 *pGEM-T (Proméga)*

(figure 5.3)

Ce plasmide est spécialement conçu pour le clonage de fragments de PCR car il est vendu linéarisé au niveau du MCS avec une base T protrudante, ce qui permet d'y cloner efficacement un fragment PCR. En effet, plusieurs DNA polymérases dont la dynazyme ajoutent une base A aux extrémités 3' des fragments PCR: ils sont donc compatibles avec les extrémités de *pGEM-T*. Le site de clonage se trouve dans le gène codant pour l' α -peptide de la β -galactosidase, ce qui permet de détecter les plasmides recombinants avec le test blanc-bleu. De plus le *pGEM-T* porte comme marqueur de sélection le gène *bla*.

5.2 Milieux de culture

Les milieux de culture en fonction de leur contenu permettent de faire une première sélection des clones de cellules ayant un caractère, d'intérêt. Ils peuvent être supplémentés par des antibiotiques, du 5-FOA ou de l'uracile le cas échéant.

5.2.1 milieu Luria Bertani (LB) liquide

(pour 400ml)

-4 g de tryptone (hydrolysat brut de caséine pancréatique)

-2 g de NaCl

-2 g de yeast extract

La préparation est autoclavée 20 minutes à 120° C.

5.2.2 milieu LB solide

Avant d'autoclaver le LB liquide, nous ajoutons 2 % d'agar. Si le milieu doit être complétement en antibiotiques ou autres substances thermolabiles, il est refroidi à 55° C après autoclavage, puis complétement et enfin coulé dans des boîtes de Petri.

5.2.3 milieu minimum

(pour 400 ml)

-autoclaver 10g d'agar et 360 ml d'eau puis ajouter en travaillant stérilement :

- 40 ml de M9 salt
- 400 µl MgSO₄ 1 M
- 40 µl de CaCl₂ 1 M
- 800 µl de thiamine HCl 1 M
- 8 ml de glucose 20%
- 4 ml de casamino acides 20%

préparation du M9 salt

- Na₂HPO₄.2H₂O 60g / L
- KH₂PO₄ 30g / L
- NH₄Cl 10g / L
- NaCl 5g / L

5.2.4 milieu SOC

Ce milieu riche est utilisé après électroporation des cellules pour leur permettre de récupérer du choc thermique visant à les transformer.

- 950 ml d'eau distillée
- 20 g de bactotryptone
- 5 g de bacto yeast extract
- mélanger jusqu'à dissolution totale
- ajouter 10 ml de KCl 250mM (préparé avec 1,86 g de KCl pour 100ml d'eau)
- ajuster le pH à 7 avec du NaOH (+/- 0,2 ml)
- ajuster le volume à 1 l avec de l'eau distillée
- autoclaver et laisser refroidir jusqu'à 60° C
- ajouter 20ml de glucose 1 M
- ajouter 5 ml de MgCl₂ 2 M (préparé avec 19 g de MgCl₂ pour 100ml d'eau)

5.2.5 Antibiotiques et autres substances

antibiotiques	solution stock	solvant	concentration de travail
ampicilline	100 mg/ml	eau	100 µg/ml
kanamycine	50 mg/ml	eau	50 µg/ml
chloramphénicol	50 mg/ml	éthanol	34 µg/ml*

*dans le cadre du crible au chloramphénicol, nous avons testé les concentrations de 0, 5, 10, 20 et 50 µg/ml.

Le 5 FOA est ajouté au milieu à raison de 2 mg/ml, et l'uracile à une concentration finale de 80 µg/ml.

5.3 Techniques de l'ADN recombinant

5.3.1 Minipréparation d'ADN plasmidique de *E. coli*

Il s'agit de faire une préparation rapide de vecteurs. La manipulation repose sur cinq étapes principales qui sont la lyse alcaline des cellules, la centrifugation de l'ADN génomique et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, son lavage et sa resuspension.

- préparer une culture de 5 ml de milieu liquide (LB + antibiotique) inoculée à partir d'une colonie isolée
- incuber la nuit à 37° C sous agitation
- centrifuger 1,5 ml de la préculture et éliminer le surnageant
- resuspendre le culot dans 300 µl de P1
- ajouter 300 µl de P2 et laisser incuber 5 minutes sur table
- ajouter 300 µl de P3 et laisser incuber 10 minutes sur glace puis centrifuger à 13500 rpm 15 minutes
- récupérer le surnageant qui contient l'ADN plasmidique et le précipiter avec 0,8 fois son volume en isopropanol tempéré (soit 720 µl)
- agiter énergiquement puis centrifuger à 13500 rpm 15 minutes et éliminer le surnageant
- ajouter 100 µl d'éthanol 70% froid, centrifuger à 13500 rpm 5 minutes et éliminer le surnageant
- sécher le culot sous vide et le resuspendre dans 50 µl d'eau

5.3.2 Midipréparation d'ADN plasmidique (sur colonne)

Le principe est le même que celui de la minipréparation, mais on travaille avec des volumes plus gros dans le but de récupérer plus de matériel.

La chromatographie est réalisée sur une colonne Nucleobond AX 100 (Macherey Nagel) échangeuse d'anions qui permet de séparer l'ADN plasmidique du reste des constituants cellulaires et d'avoir un échantillon d'ADN plus pur que dans la miniprep.

- la veille, lancer une préculture de 5 ml à partir d'une colonie isolée et laisser à 37° C toute la nuit sous agitation
- inoculer avec 2 ml de préculture 200 ml de milieu LB+antibiotique, laisser incuber la nuit à 37° C sous agitation
- centrifuger 5 minutes à 5000 rpm à 4° C, éliminer le surnageant et resuspendre le culot avec 4 ml de P1
- ajouter 4 ml de P2, laisser incuber 5 minutes
- ajouter 4 ml de P3, laisser incuber 10 minutes sur glace
- centrifuger 38 minutes à 13000 rpm à 4° C, éliminer le surnageant
- préparer la colonne et l'équilibrer avec 2 ml de N2
- déposer la solution d'ADN sur colonne
- laver 2 fois avec 4 ml de N3 puis éluer avec 2 ml de N5
- précipiter l'ADN avec 0,8 volume d'isopropanol, agiter énergiquement et centrifuger 30 minutes à 13000 rpm à 4° C
- éliminer le surnageant, rincer le culot avec 1 ml d'éthanol 70% froid, centrifuger 5 minutes à 13000 rpm à 4° C
- éliminer l'éthanol et sécher le culot sous vide
- resuspendre le culot dans 100 à 500 µl d'eau

solutions tampon

P1 (pour resuspendre les cellules et éliminer l'ARN grâce au traitement à la RNase)

- 50 mM Tris pH 8,0
- 10 mM EDTA
- 100 µg/ml RNase
- la RNase aura été préalablement bouillie 15 minutes dans 1 ml d'eau.

P2 (pour lyser les membranes)

- 200 mM de NaOH
- 1% SDS

P3 (pour éliminer les protéines)

- 2,55 M KAc (acétate de potassium)
- acide acétique 37%
- pH 4,8

Les tampon N2, N3 et N5 sont fournis par le kit Macherey Nagel.

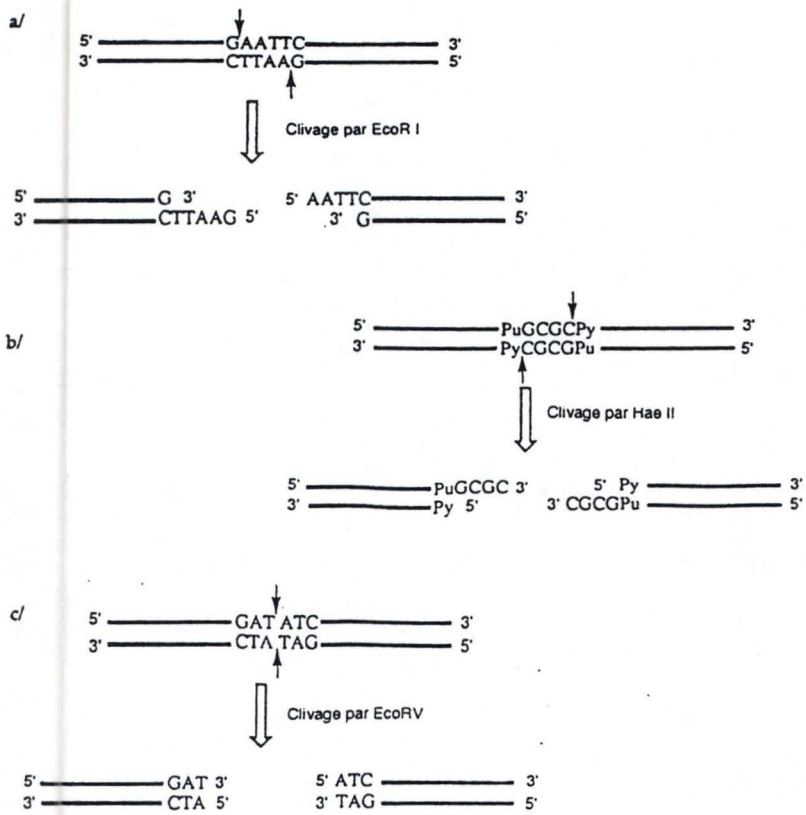


figure 5.4 : clivage de l'ADN par différents types d'enzymes de restriction
 les trois types de clivages se distinguent par la nature des fragments obtenus : a/ 5' protubérants; b/ 3' protubérants; c/ francs

5.3.3 Préparation d'ADN génomique de *E. coli*

- centrifuger 1,5 ml de préculture lancée la veille à partir d'une colonie isolée (si nécessaire centrifuger 2 x 1,5 ml)
- resuspendre le culot bactérien dans 567 µl de TENa
- ajouter 30 µl de SDS 10 % et 3 µl de protéinase K à 20 mg/ml
- homogénéiser en agitant doucement l'eppendorf et incubé à 37°C pendant une heure
- ajouter 600 µl de phénol saturé en tampon TENa et agiter fortement l'eppendorf
- centrifuger 20 minutes à 4 °C à 13500 rpm
- récupérer la phase aqueuse supérieure sans emporter le voile à l'interface
- ajouter 80 µl de NaClO₄ 5M et 600 µl de chloroforme, agiter fortement
- centrifuger à 4 °C pendant 10 minutes à 5000 rpm. Répéter cette extraction si un nodule blanc est visible à l'interface
- récupérer la phase aqueuse et ajouter 1 ml d'éthanol 100% (à -20 °C)
- mélanger en inversant l'eppendorf. L'ADN génomique forme un amas visible
- centrifuger à 4 °C pendant 10 minutes à 13500 rpm et éliminer le surnageant
- ajouter 1 ml d'éthanol 70 % (à -20°C)
- centrifuger 5 minutes à 13500 rpm et éliminer le surnageant
- sécher sous vide et ajouter 100 µl d'eau distillée stérile
- pour faciliter la resuspension, incubé pendant plusieurs heures à 37°C

TENa: 50mM Tris pH 8; 50mM EDTA; 100mM NaCl

5.3.4 Restriction

Le clivage de l'ADN bicaténaire à des sites précis se fait par des endonucléases de restriction qui reconnaissent de courtes séquences d'ADN et coupent la liaison phosphodiester libérant une extrémité 5'-phosphate et une extrémité 3'-hydroxyle. Les coupures peuvent être de trois types (figure 5.4):

- à bouts francs
- à bouts "collants" 3' protrudants, ou 5' protrudants

Pratiquement, la réaction se fait par l'incubation de l'ADN en présence d'une ou plusieurs enzymes commerciales.

mélange de restriction :

- x ng d'ADN à restreindre en suspension dans de l'eau distillée
- 1/10 du volume en tampon de restriction 10 fois concentré (la majorité des enzymes utilisées au labo sont fournies par la firme GIBCO BRL; nous utilisons leur tampons)
- enzyme de restriction : au maximum 1/10 du volume final. Il faut compter entre 2 et 10 unités d'enzymes par µg d'ADN en fonction de la pureté de l'ADN et de l'efficacité de l'enzyme
- eau distillée pour atteindre le volume final
- incubation 1 heure à la température optimale de l'enzyme

La plupart des enzymes agissent à 37°C mais pour certaines, la température optimale est supérieure ou inférieure à 37°C. Il est possible de réaliser en une seule étape des restrictions multiples à condition que les tampons soient compatibles.

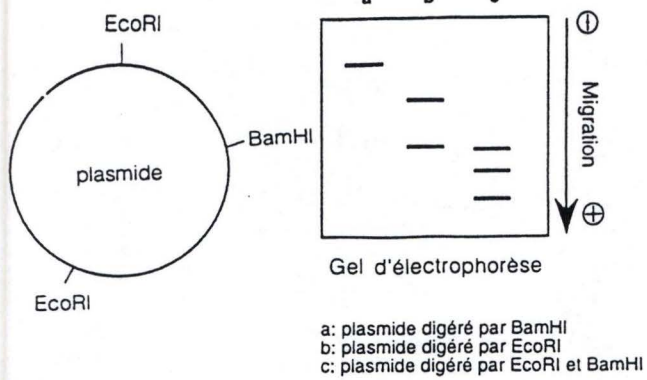


figure 5.5: électrophorèse des acides nucléiques
 Plus un fragment est petit, plus sa vitesse de migration est rapide. Des fragments d'ADN peuvent ainsi être séparés.

Généralement, le temps de réaction est de 1 heure et l'inactivation se fait à la chaleur ou en ajoutant de l'alourdisseur.

alourdisseur

- sucrose 50%
- EDTA 100mM
- SDS 1%
- bleu de bromophénol 0,1%

5.3.5 Electrophorèse en gel d'agarose

Afin de séparer et d'analyser les produits de restriction de l'ADN, on effectue une migration des fragments sur un gel d'agarose que l'on maintient dans un tampon où l'on applique une différence de potentiel; les différents fragments d'ADN chargés négativement vont alors se séparer en fonction de leur taille sous l'effet de la différence de potentiel (figure 5.5).

Généralement on coule des gels à 1 % d'agarose mais le pourcentage peut varier de 0,5 à 2 % en fonction de la taille des fragments que l'on désire observer (voir tableau ci-dessous)

pourcentage d'agarose (poid/volume)	taille des fragments que l'on désire séparer (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2	0,1-2

-l'agarose est dissous dans du tampon d'électrophorèse TAE par chauffage
-au moment de couler le gel, on ajoute du bromure d'éthidium qui va permettre de visualiser les fragments d'ADN sous les UV (figure 5.6).

Afin d'évaluer la taille des fragments observés, on fait comigrer dans un puit adjacent un marqueur de taille. Celui utilisé pendant ce mémoire est le Smart Ladder commercialisé par Eurogentec (figure 5.7)

TAE Buffer

- à pH 8
- 10 mM de Tris HCl pH 8
- 1mM d'EDTA

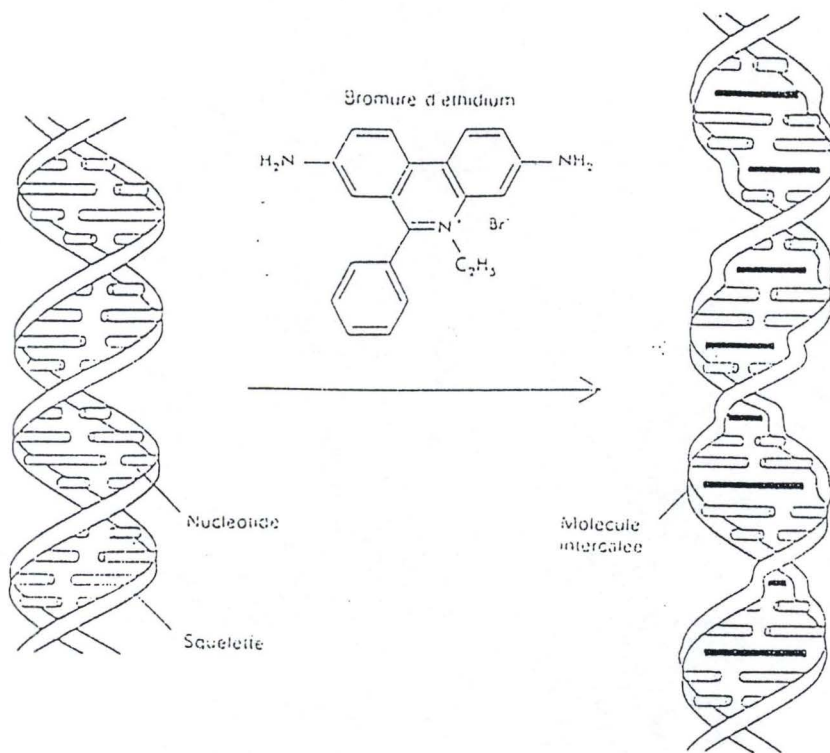


figure 5.6: insertion du bromure d'éthidium dans une molécule d'ADN

le bromure d'éthidium est un agent intercalant, pouvant se glisser entre les bases de la double hélices de l'ADN.

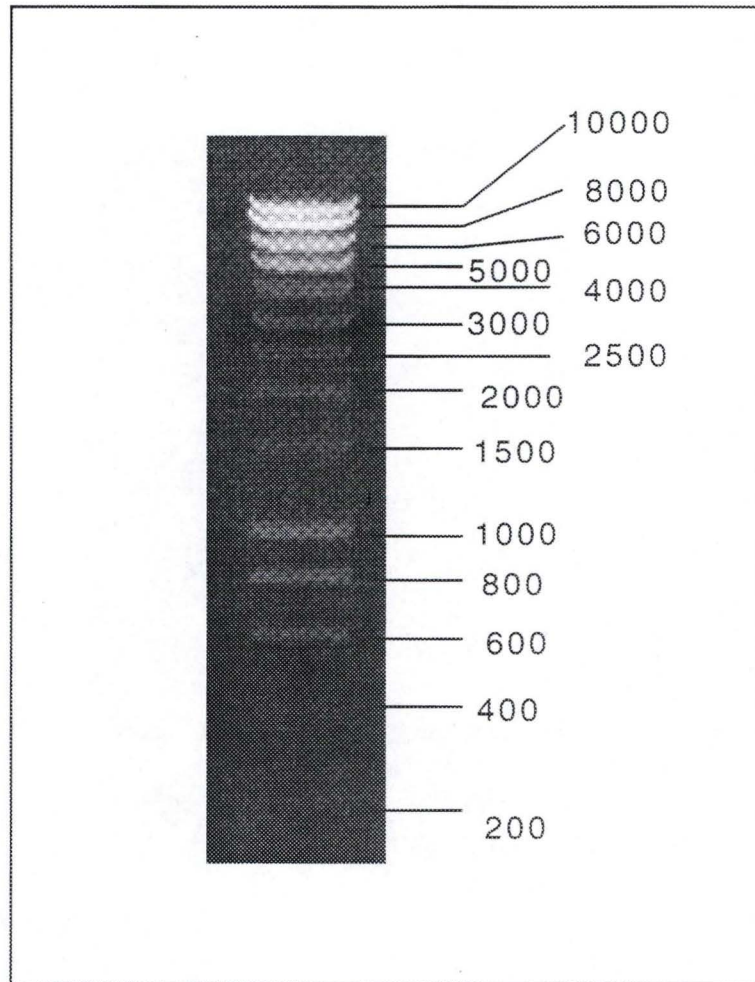


Figure 5.7: marqueur de taille
Smart Ladder

5.3.6 Récupération d'ADN dans un gel d'agarose

Pour cette opération, nous utilisons le Kit geneclean (Bio 101). Il s'agit de récupérer des fragments après migration dans un gel d'agarose. L'ADN récupéré est débarrassé des enzymes avec lesquelles il a été traité.

- récupérer la bande d'intérêt et ajouter trois fois son volume en NaI (peser au préalable les eppendorfs)
- laisser incuber 5-10 minutes à 55° C jusqu'à dissolution complète de l'agarose
- ajouter 5 µl de matrice commerciale (qui aura été au préalable vortexée afin de l'homogénéiser)
- vortexer et laisser incuber cinq minutes (ne pas hésiter à agiter de temps en temps)
- centrifuger 5 secondes à 13000 rpm et éliminer le surnageant
- faire 3 lavages consécutifs
 - resuspendre le culot dans 500 µl de new wash buffer
 - centrifuger et éliminer le surnageant
- resuspendre le culot dans 15 à 20 µl d'eau
- laisser incuber 3 minutes à 55° C
- centrifuger 30 secondes et récupérer délicatement le surnageant qui contient l'ADN

5.3.7 Réaction de " fill in "

Pour passer d'une extrémité d'ADN cohésive à une extrémité à bouts francs, on utilise le grand fragment de l'ADN polymérase 'Klenow'. Cette polymérase possède une activité 3'-5' exonucléase mais est dépourvue d'activité 5'-3' exonucléase. Les extrémités 5' protrudantes sont complétées (fill in) et les 3' sont rognées.

Pratiquement on met en présence :

- l'ADN à filler
- 1 µl de Klenow (firme GIBCO BRL)
- 4 µl de dNTP 5mM chacun
- tampon n°2 de la firme GIBCO BRL
- eau

La réaction se fait à 37° C pendant 30 minutes puis on inactive 10 minutes à 75° C en présence de bleu alourdisseur.

5.3.8 Déphosphorylation

Dans le cadre d'une construction, il est possible, avant de réaliser une ligation, de traiter la matrice dans laquelle on veut introduire un insert de manière à ce qu'elle ne puisse pas se refermer sur elle-même. Cette étape est réalisée en déphosphorylant les extrémités 5' de la matrice à l'aide d'une enzyme déphosphorylante telle que la SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase commercialisée par USB).

Pratiquement, en fonction du volume final de la réaction, on ajoute 1 ou plusieurs μl de SAP à l'ADN restreint que l'on désire déphosphoryler, (on supplémente le milieu en MgCl_2 si le tampon de restriction n'en contient pas) et on laisse une heure à 37°C .

Il est à noter que cette étape ne doit en aucun cas être réalisée lorsque l'insert possède lui aussi des extrémités 5' déphosphorylées comme c'est le cas des produits PCR.

5.3.9 Réaction de ligation

Pour lier de manière covalente deux fragments d'ADN, on utilise l'ADN ligase du phage T4. Elle catalyse la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyle 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' d'une extrémité proche. L'enzyme pour être active nécessite la présence d'ATP et d'ions Mg^{2+} .

Méthode :

- dans un eppendorf, placer un mélange des deux fragments à liguer (en général dans un rapport molaire matrice/insert de 1:5 au moins)
 - ajouter 1 μl d'ADN ligase T4 (Boehringer)
 - ajouter 1/5 du volume total de tampon de ligation
 - compléter avec de l'eau distillée
 - incuber une nuit à 14°C
- Le mélange peut se conserver à -20°C .

5.3.10 Extraction des protéines d'une solution d'ADN

Nous avons utilisé le kit micropure EZ commercialisé par AMICON et suivi le protocole indiqué par la firme. L'utilisation est simple: on place la solution d'ADN à purifier sur la colonne qui est elle même enchassée dans un tube eppendorf, on centrifuge 30 secondes à 13000 rpm. Il est préférable d'avoir des volumes supérieurs à 50 μl .

5.3.11 Transformation

Le but de la transformation est d'introduire dans les cellules des informations sous forme d'ADN généralement plasmidique. Pour ce faire, les parois des cellules doivent être rendues perméables. Les cellules sont alors dites compétentes.

5.3.11.1 Préparation de cellules CaCl₂ compétentes

Ces cellules vont nous servir à réaliser des transformations par choc thermique.

La préparation de ces cellules se fait en milieu stérile (travail à la flamme)

- réaliser une préculture de 5 à 50 ml; laisser agiter toute la nuit à 37° C
- inoculer 400 ml de LB avec 4 ml de la préculture et laisser pousser à 37° C jusqu'à une DO de 0,375 à 590 nm (compter environ 2h30 à 3h00 pour DH10B)
- laisser 10 minutes sur glace
- centrifuger 7 minutes à 3000 rpm à 4° C et éliminer le surnageant
- resuspendre le culot dans 80 ml de solution de CaCl₂ froide
- centrifuger 5 minutes à 2500 rpm à 4° C et resuspendre le culot dans 80 ml de solution de CaCl₂ froide; laisser incubé 30 minutes sur glace
- centrifuger 5 minutes à 2500 rpm à 4° C et resuspendre le culot dans 8 ml de solution de CaCl₂ froide
- aliquoter et stocker à -70° C

solution de CaCl₂

-60 mM de CaCl₂

-glycérol 15 % vol/vol

5.3.11.2 Transformation par choc thermique

- décongeler les cellules CaCl₂ compétentes en main et y ajouter l'ADN (100 ng et plus) maintenu au préalable sur glace
- laisser sur glace entre 10 et 30 minutes
- incuber 2 minutes à 42° C
- ajouter 1ml de LB et laisser incubé 1 heure à 37° C
- étaier sur boîte contenant le milieu de sélection adéquat

5.3.11.3 Préparation de cellules électrocompétentes

- resuspendre une colonie isolée dans 5ml de milieu liquide et laisser incubé à 37° C sous agitation pendant la journée
- inoculer une culture de 50 ml avec un 1/10 de préculture et laisser croître toute la nuit
- inoculer une culture de 400 ml à partir de la 40 ml de culture

- laisser pousser jusqu'à une DO de 0,5 à 0,8 à 590 nm
- transvaser la culture dans un récipient préalablement refroidi et laisser incuber 30 minutes sur glace
- centrifuger 15 minutes à 5000 rpm à 4° C
- éliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 400 ml d'eau froide stérile
- centrifuger 15 minutes à 5000 rpm à 4° C
- éliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 200 ml d'eau froide stérile
- centrifuger 15 minutes à 5000 rpm à 4° C
- éliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 8 ml de glycérol 10% froid
- centrifuger 15 minutes à 5000 rpm à 4° C
- éliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 800 µl de glycérol 10% froid
- aliquoter par 100 µl

5.3.11.4 Electroporation

- stériliser les cuvettes d'électroporation 3 minutes aux UV puis les mettre dans la glace
- décongeler les cellules sur glace et ajouter l'ADN (en général 20 ng, il faut éviter les fortes concentrations en sels qui engendrent la formation d'arcs)
- transférer dans les cuvettes et électroporer à 2000V, 200 Ω, 25mF
- rajouter 1ml de SOC et laisser incuber 1 heure à 37°C avant d'étaler sur boîte contenant le milieu de sélection adéquat.

5.3.11.5 Préparation rapide de cellules compétentes: cellules TSS

- Diluer 1:100 d'une préculture lancée la veille au soir et incuber à 37°C avec agitation importante pendant 1h30-2h00.
 - Centrifuger les cellules à 3000 rpm, 5 minutes à 4°C et resuspendre le culot dans 1:10 volume de TSS froid auquel on aura juste ajouté du DMSO (1:20). Le DMSO est à ajouter juste avant emploi, pour éviter l'apparition de produits d'oxydation du DMSO qui inhibent l'évènement de transformation.
- A ce stade, les cellules sont prêtes à l'emploi, on peut aussi les stocker à plus long terme à -70°C.

Milieu TSS:

LB Broth

10% PEG 8000

30 mM MgSO₄

5% (vol/vol) DMSO

On peut mettre du MgCl₂ à la place du MgSO₄, mais faut respecter ions Mg²⁺ entre 20 et 50 mM.

pH final = 6.5 : lors de l'autoclavage, le pH chute. Vérifier le pH après autoclavage et ajuster (entre 6.4 et 6.8, c'est OK)

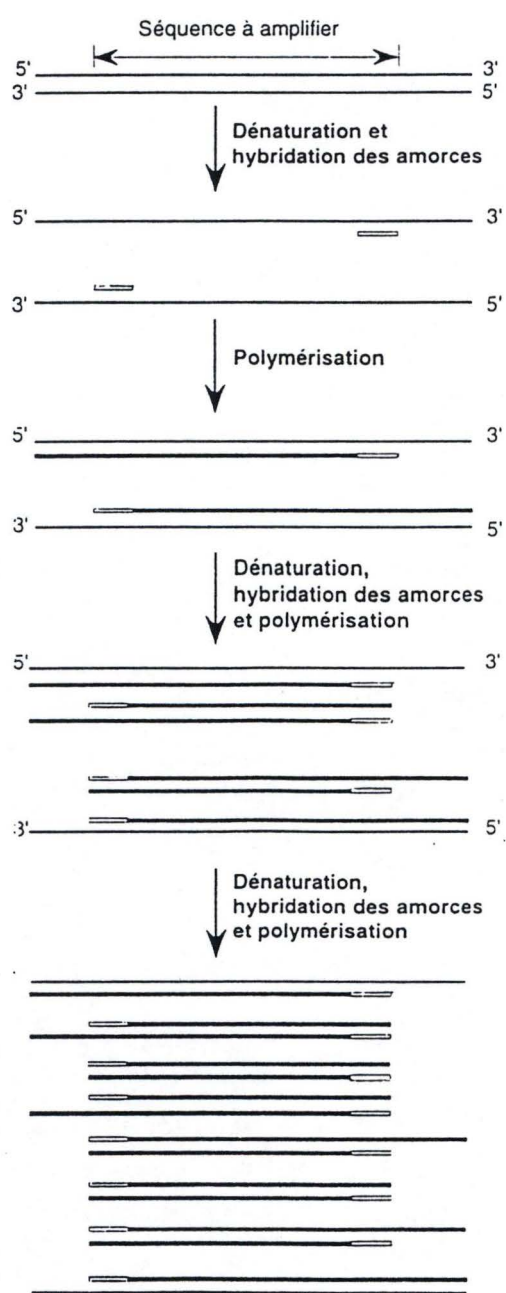


figure 5.8: principe de la PCR
à chaque cycle le nombre de fragments amplifiés va être multiplié par 2.

5.3.11.6 transformation des cellules TSS

- ajouter 200 µl de cellules TSS compétentes dans un eppendorf froid + ADN (de 1 à 10 µl).
- incuber mélange cellules/ADN sur glace pendant 5 à 30 min
- étaier l'entièreté des 200 µl sur milieu sélectif.

5.3.12 PCR (Polymérisation en chaîne)

Principe

Cette technique est utilisée pour amplifier rapidement un fragment d'ADN d'intérêt compris entre deux primers oligonucléotidiques. Les séquences bordant le fragment à amplifier doivent être connues afin de pouvoir synthétiser les oligonucléotides qui serviront d'amorces. Celles-ci sont complémentaires des brins opposés et leurs extrémités 3' sont orientées l'une vers l'autre. L'ADN total est dénaturé par chauffage en présence d'un excès d'oligonucléotides. La diminution de température qui suit cette étape permet l'hybridation spécifique des oligonucléotides avec les séquences anticomplémentaires. On amplifie l'ADN compris entre les deux amorces en présence de déoxyribonucléotides et d'une enzyme thermorésistante, la dynazyme ou Taq DNA Polymerase isolée de la bactérie *Thermus aquaticus* qui allonge l'ADN de 5'en 3'. Après une élongation des amorces sur base de la matrice à la température optimale d'action de l'enzyme, les deux brins (parental et néosynthétisé) sont dénaturés par chauffage et le cycle de température recommence. On recommence ce cycle un nombre de fois déterminé de telle sorte que l'amplification reste exponentielle. Le nombre d'amplicons est, en théorie, doublé à chaque cycle (figure 5.8 et 5.9). Le produit de la PCR peut être utilisé pour le séquençage, ou pour l'analyse diagnostique de clones ou pour être inséré dans un vecteur.

En pratique

Différents éléments doivent être mis en présence :

- l'ADN d'intérêt
- les déoxyribonucléotides : 4 µl d'une solution concentrée 20 mmoles/µl
- les amorces oligonucléotidiques (concentration de 0,1nmole/µl: 5 µl)
- le tampon de PCR (10X) : 10 µl
- l'enzyme : 1 µl (l'activité est de 2 unités/µl)
- l'eau stérile afin d'arriver au volume désiré de 100 µl

Hybridation des primers: la température varie en fonction de la composition en bases des amorces qui doivent avoir le même pourcentage en G et C que la séquence cible; on peut calculer la température de melting de la façon suivante:

$$T_m = 4 \times (G+T) + 2 \times (A+T); \text{température d'hybridation} = T_m - 2$$

Un contrôle négatif doit être réalisé afin de vérifier si les différents composants du mix PCR ne sont pas contaminés par de l'ADN à amplifier. Dans le tube de contrôle, tous les réactifs seront placés exception faite de l'ADN cible qui sera remplacé à

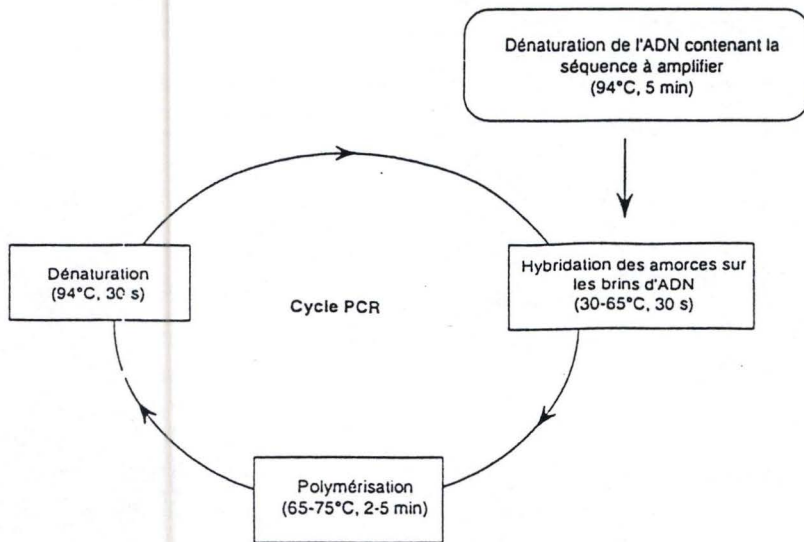


figure 5.9: cycle d'amplification d'ADN par PCR
la réaction repose sur la répétition cyclique de trois étapes
qui sont : 1/ dénaturation; 2/ hybridation et 3/ élongation

volume égal par de l'eau stérile. Ce contrôle sera soumis au même processus de cycle de température que les autres tubes.

Une partie ou la totalité du produit PCR additionné de bleu alourdisseur est placé sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium afin de vérifier la taille de l'amplicon et, le cas échéant, de le récupérer.

oligo	nombre de bases	séquence	% de G et C	Tm
P1 pyr F	20	TAAGCCTCGTTATCGTTG CC	50%	60
P2 pyr F	20	GTTATTGGTCACCAGGTC GG	55%	62
NcoIctrA1 (ORF ctrA)	28	CCATGGGCCGTCCTTTTG ATTGAAGACG	61%	86
NcoIctrA2 (ORF ctrA)	24	CCATGGGAATCAGGCGC TTTCGGCGC	71%	82
ctrAD51N Forward	28	TACGATATCATTCTGCTG AATCTCAATC	35%	68

5.4 Techniques relatives aux protéines: le Western Blot

Le Western blot est une technique utilisée conjointement à l'électrophorèse en SDS-PAGE. Elle allie le pouvoir de résolution du SDS-PAGE à la spécificité des anticorps. Elle est divisée en trois étapes principales:

- séparation des protéines par l'électrophorèse en SDS-PAGE
- électrotransfert sur membrane de nitrocellulose
- détection immunologique

5.4.1 Electrophorèse en gel SDS-PAGE

Principe

La grande majorité des électrophorèses analytiques de protéines sont réalisées sur gel de polyacrylamide. Habituellement, le détergent anionique dodécyl sulfate de sodium (SDS) est utilisé en combinaison avec un agent réducteur et un chauffage pour dissocier les protéines avant leur chargement sur le gel. Les polypeptides dénaturés lient le SDS qui les charge négativement. Comme la quantité de SDS lié est proportionnelle au poids moléculaire du polypeptide et indépendant de sa séquence, la séparation des complexes protéine-SDS tient compte de leur seul poids moléculaire. Des modifications du squelette protéique comme les glycosylations peuvent avoir un impact significatif sur le poids moléculaire apparent.

La migration s'opère d'abord sur un gel de tassement (le "stacking gel") de haute porosité qui va condenser les échantillons en une bande très fine avant leur passage sur le gel de séparation (le "running gel").

Les gels de polyacrylamide sont composés de chaînes d'acrylamide polymérisé, liées entre elles par un agent bifonctionnel. Le degré de séparation des protéines dépend de la concentration en polyacrylamide dans le gel. Pour un rapport molaire de

bisacrylamide-acrylamide de 1:29, le tableau suivant présente la concentration optimale en acrylamide à utiliser selon la taille des protéines à séparer.

Concentration en Acrylamide. (%)	Echelle linéaire de séparation. (KD)
15	12-43
10	16-68
7,5	36-94
5,0	57-212

Réactifs.

• **Acrylamide et bisacrylamide:** préparer une solution stock de polyacrylamide 30%. Cette solution doit être conservée à l'abri de la lumière, qui catalyse la conversion des composants en acide acrylique et bisacrylique. La solution est conservée quelques mois à 4°C.

Composition de la solution polyacrylamide 30%.

Acrylamide.	30 g
Bisacrylamide.	0,8 g
Eau bidistillée.	ad 100 ml

Filter la solution sur Whatman 0,45 µm.

• **Dodécyl sulfate de sodium :** préparer une solution stock 10% dans de l' eau distillée.

• **Tampon TRIS-SDS :** ce tampon diffère quelque peu pour le stacking et le running. Les solutions sont filtrées avant l'addition de SDS et stockées à 4°C.

Composition du tampon de stacking gel : TRIS 0,5M-SDS 0,4% pH 6,8.

Composition du tampon de running gel : TRIS 1,5M-SDS 0,4% pH 8,8.

• **TEMED (N,N,N',N'-tétraméthylethylenediamine):** il accélère la polymérisation du gel en catalysant la production de radicaux libres à partir du persulfate d'ammonium.

• **Persulfate d'ammonium (PAS):** il fournit les radicaux libres indispensables à la réaction. On réalise une solution stock 1% dans de l'eau distillée, elle est stockée à 4°C. Toutefois, il faut idéalement préparer la solution juste avant utilisation.

Préparation des échantillons

La quantité de protéines (x) déposée est identique pour tous les échantillons. Le volume déposé sur gel ne doit pas excéder une trentaine de microlitres.

- placer x µg de protéines dans un eppendorf.
- ajouter 1/5 du volume final de tampon de chargement (5x).
- mettre à volume avec de l' eau distillée.

Composition du tampon de chargement (5x)

Glycérol	50 %
β-mercaptoéthanol	25 %
SDS	10 %
Tris HCl pH 6,8	100 mM
Bleu de bromophénol	0,005 %

Mise en oeuvre de l'électrophorèse

Les plaques de verre doivent être particulièrement propres pour assurer une polymérisation uniforme des gels; elles sont donc lavées à l'eau et à l'alcool avant utilisation.

- assembler le dispositif en assurant au maximum son étanchéité.
- couler le running gel entre les plaques à une hauteur égale au peigne plus 1 cm.

Composition du running gel (quantité pour 1 gel 15%)

Polyacrylamide 30%	12,0 ml
Eau stérile	9,9 ml
Tris 1,5M pH 8,8	7,5 ml
SDS 10%	300 µl
TEMED*	12 µl
PAS*	300 µl

* Ajouter juste avant de couler les gels.

- couvrir la surface du gel avec de l'eau pour assurer une polymérisation correcte de la surface.
- laisser polymériser une trentaine de minutes.
- enlever l'eau avec du papier buvard et déposer les peignes.
- couler le stacking gel en évitant de créer des bulles d'air.

Composition du stacking gel (quantité pour 1 gel 15%)

Polyacrylamide 30%	1 ml
Eau stérile	4,1 ml
Tris 0,5M pH 6,8	0,75 ml
SDS 10%	60 µl
TEMED*	6 µl
PAS*	60 µl

*Ajouter juste avant de couler les gels.

- laisser polymériser une trentaine de minutes.
- enlever délicatement les peignes et placer le support dans la cuve.
- remplir la cuve et le support de tampon d' électrophorèse.

Composition du tampon d' électrophorèse TRIS-Glycine (5x)

Glycine	1,25 M	72 g
Tris	125 mM	15,1 g
SDS	0,5 %	5 g
Eau distillée		ad 1L

- chauffer les échantillons à 100°C pendant 5 minutes.
- charger les gels.
- réaliser la migration à 60 mA, 200V jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas des plaques.
- démouler le gel et marquer l'orientation par une entaille dans un coin.

5.4.2 Transfert de protéines sur filtre (Western blot)

Une fois l'électrophorèse terminée, les gels sont démoulés et placés dans le dispositif de transfert.

Il est important que la membrane ait la même taille que le gel. Il est essentiel d'éliminer les bulles d'air présentes entre le gel et la membrane.

L'appareil est mis en marche: 400mA; 100W et maximum 14V

L' élimination des sites de liaison non spécifique sur la membrane

Avant d'utiliser le blot pour la détection, il faut saturer la membrane pour prévenir l'adsorption non spécifique du réactif immunologique. On incube la nitrocellulose dans une solution de PBS tween 0,05% pendant une heure sous légère agitation.

Composition de la solution PBS

Na ₂ HPO ₄	0,58M	82,3 g
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O	0,17M	23,5 g
NaCl	0,68M	40,0 g
Eau distillée		ad 1L

Mettre à pH 7,5.

PBS tween: PBS 0,05% tween

PBS tween milk: PBS 0,05% tween 5% milk

5.4.3 détection et révélation

1° anticorps primaire

L' anticorps anti-CtrA se trouve sous la forme d' un polysérum de lapin.

On incube la membrane avec le polysérum dilué (1/1000) dans du Tween milk 5% pendant une heure sous agitation à température ambiante, ou une nuit à 4°C.

Il faut ensuite laver la membrane. On procède comme suit:

- récupérer le sérum à la pipette
- laver la membrane 5 minutes avec du PBS Tween milk (5%)
- laver la membrane 5 minutes avec du PBS

2° anticorps secondaire

L'anticorps secondaire que nous avons utilisé est couplé à la HRP (Horseradish peroxidase).

- ajouter l' anticorps secondaire dilué 250 fois dans du PBS
- incuber une heure sous agitation
- laver la membrane 5 minutes avec du PBS-tween-milk
- laver la membrane 5 minutes avec du PBS-tween
- laver la membrane 2 x 5 minutes avec du PBS
- incuber les solutions mélangées avec les bandelettes sous agitation et à l'obscurité jusqu'à ce que des bandes sombres soient visibles sur la membrane. Pour arrêter la réaction, rincer abondamment à l'eau.

Pour la détection, 2 solutions doivent être préparées, elles sont conservées à l'abri de la lumière et mélangées juste avant la révélation.

- solution de Chloronaphthol:

Dissoudre 15 mg de Chloronaphthol dans 5 ml de méthanol.

- solution de TBS-peroxyde d' hydrogène:

Mélanger 25 ml de TBS et 15 µl de H₂O₂ 30%.

Bibliographie

Alex, L. A., and Simon, M. I. (1994). Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet* 10, 133-8.

Alton, G., Jones, L., Angus, R., and Verger, J.-M. (1988). Techniques for the brucellosis laboratory.

Amann, E., and Brosius, J. (1985). "ATG vectors" for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* 40, 183-90.

Bellefontaine, A. F., Bockstael, O., Tibor, A., Letesson, J. J., and Vandenhoute, J. (1997). A promoter probe system for the identification of genes regulated by the response regulator CtrA from *Brucella*. Société Belge et de biochimie et de biologie moléculaire. 168^{ème} réunion.

Bellefontaine, A. F., Viot, S., Devos, D., Depiereux, E., Letesson, J.J., Vandenhoute, J. (1998). Le casting comme méthode potentielle d'identification des cibles génomiques de BaCtrA, un régulateur de réponse de *Brucella abortus*. 5^{ème} congrès de la société française de microbiologie.

Blasco, J. M. (1993). *Brucella melitensis* rev-1 vaccine as a cause of human brucellosis. *The Lancet* 342, 805.

Brosius, J. (1984). Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene* 27, 151-60.

Brosius, J., and Lupski, J. R. (1987). Plasmids for the selection and analysis of prokaryotic promoters. *Methods in Enzymology* 153, 54-68.

Burbulys, D., Trach, K. A., Hoch, J. A. (1991). Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* 64, 545-52.

De Fays, K. (1996) Caractérisation structurale d'un régulateur appartenant au système de transduction du signal à deux composants chez *Brucella* sp. Mémoire de licence.

De Ley, J., Mannheim, W., Segers, P., Lievens, A., Denijn, M., Vanhoucke, M., and Gillis, M. (1987). Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of *Brucella* and CDC groups Vd. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 37, 35-42. (lu dans la thèse de P. Denoël).

Denoël, P. (1997). Identification et production d'antigènes utilisables pour le diagnostic de la brucellose. Thèse de doctorat.

Domian, I. J., Quon, K. C., and Shapiro, L. (1996). The control of temporal and spatial organization during the *Caulobacter* cell cycle. *Curr Opin Genet Dev* 6, 538-44.

Fretin, D. (1996). Caractérisation du gène encodant un régulateur du système à deux composants chez *Brucella*. Mémoire de licence.

Garin-Bastuji, B. (1993). Brucelloses bovine, ovine et caprine : contrôle et prévention. *Point Vét.* 25, 107-114.

Kennelly, P. J., and Potts, M. (1996). Fancy meeting you here! A fresh look at "prokaryotic" protein phosphorylation. *Journal of Bacteriology* 178, 4759-64.

Kenney, L. J., Bauer, M. D., and Silhavy, T. J. (1995). Phosphorylation-dependent conformational changes in OmpR, an osmoregulatory DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 8866-70.

Lafontaine, D. (1993). Two-step disruptive transplacement of the *E. coli* purF gene by the CAT marker along through « suicide » transformation. *Arch. int. de phys., bioch. bioph.*

Leslie, A. P., and Silhavy, T. J. (1995). Porin regulon of *Escherichia coli*. In Two-component signal transduction, J. A. Hoch and T. J. Silhavy, eds. Washington, pp. 105-27.

Michaux, S., Paillisson, J., Carles-Nurit, M.-J., Bourg, G., Allardet-Servent, A., and Ramuz, M. (1993). Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *Journal of Bacteriology* 175, 701-05.

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

Newton, A., and Ohta, N. (1990). Regulation of the cell division cycle and differentiation in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 44, 689-719.

Ohta, N., and Newton, A. (1996). Signal transduction in the cell cycle regulation of *Caulobacter* differentiation. *Trends Microbiol* 4, 326-32.

Pratt, L. A., and Silhavy, T. J. (1995). Identification of base pairs important for OmpR-DNA interaction. *Mol Microbiol* 17, 565-73.

Quon, K. C., Marczynski, G. T., and Shapiro, L. (1996). Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* 84, 83-93.

Quon, K. C., Yang, B., Domian, I. J., Shapiro, L., and Marczynski, G. T. (1998). Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 120-5.

Saegerman, C., Weynants, V., Vo, T. K.-O., De Waele, L., Tibor, A., Denoel, P. A., Godfroid, J., Michel, P., Saman, E., Letesson, J.-J., and Limet, J. N. (1994). Evaluation de l'activité protectrice de la fraction de la paroi de *Brucella* insoluble dans le SDS et identification d'antigènes de *Brucella* utilisables pour le diagnostic. In *Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales*, AUPELF-UREF, ed. (Paris: John Libbey Eurotext), pp. 221-23.

Shapiro, L., and Losick, R. (1997). Protein localization and cell fate in bacteria. *Science* 276, 712-8.

Smith, L. D., and Ficht, T. A. (1990). Pathogenesis of *Brucella*. *Crit Rev Microbiol* 17, 209-30.

Stephens, C., Reisenauer, A., Wright, R., and Shapiro, L. (1996). A cell cycle-regulated bacterial DNA methyltransferase is essential for viability. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 1210-4.

Stock, J. B., Stock, A. M., and Mottonen, J. M. (1990). Signal transduction in bacteria. *Nature* 344, 395-400.

Stock, J. B., Surette, M. G., Levit, M., and Park, P. (1995). Two-component signal transduction systems: structure-function and mechanisms of catalysis. In Two-component signal transduction, J. A. Hoch and T. J. Shilavy, eds. Washington, pp. 25-51.

Veger, J. M. (1993). Editorial. *Le point vétérinaire* 25, 1-37.

Weynants, V. (1998). Développement de nouveaux tests de dépistage dans le cadre de l'épidémiologie-surveillance de la brucellose bovine. Thèse de doctorat.

Wu, J., Ohta, N., and Newton, A. (1998). An essential, multicomponent signal transduction pathway required for cell cycle regulation in *Caulobacter*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 1443-8.