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

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Clonage, surexpression et modélisation d'un régulateur d'un système de transduction du signal à deux composants de Brucella abortus

Rousseau, Christophe

Award date:
1997

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

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

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

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

Download date: 02. May. 2026

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX

NAMUR

Faculté des Sciences

CLONAGE, SUREXPRESSION ET MODELISATION D'UN REGULATEUR D'UN SYSTEME DE TRANSDUCTION DU SIGNAL A DEUX COMPOSANTS DE *BRUCELLA ABORTUS*

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

Christophe ROUSSEAU

Juin 1997

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/23.03.91

Clonage, surexpression et modélisation d'un régulateur d'un système de transduction du signal à deux composants de *Brucella abortus*

ROUSSEAU Christophe

Résumé

Différents systèmes ont été élaborés par les bactéries pour faire face aux variations environnementales. Parmi ceux-ci, le mécanisme le plus répandu est le système de transduction du signal à deux composants. Ce système est composé d'un couple de protéines, le senseur ou histidine kinase et le régulateur. Par un mécanisme commun de phosphorylation, chaque paire de protéine traduit un signal "environnemental " en changements métaboliques.

Un régulateur homologue à DivK de *Caulobacter crescentus* a été cloné chez *Brucella abortus*. Cette protéine possède 78,3% d'identité avec son homologue de *C. crescentus* et 25% avec le protéine CheY d'*Escherichia coli*. Composé uniquement du domaine N-terminal, la protéine DivK de *Brucella* fait partie de la famille de régulateur CheY.

Un modèle de cette protéine a été réalisé avec le logiciel Modeller. La structure de Spo0F, régulateur du système de transduction du signal de *Bacillus subtilis* a été utilisée comme structure de référence. Le modèle a été affiné par un processus de minimisation d'énergie et évalué par un potentiel d'énergie au niveau atomique.

En vue d'étudier les interactions entre DivK de *Brucella* et ses partenaires, la protéine a été surexprimée à l'aide du vecteur pET-15b.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Juin 1997
Promoteur: E. Feytmans

Tout d'abord, je tiens à remercier vivement le Professeur Ernest Feytmans pour l'accueil chaleureux qu'il m'a offert au sein de son laboratoire.

Que soit également vivement remercié le Professeur Jean-Jacques Letesson pour tous les encouragements et la motivation apportés au cours de la réalisation de ce travail.

Damien, même si je ne parviens toujours pas à apprécier ta musique de ..., je voudrais te remercier pour tous ce que tu m'a appris au cours de ce semestre ainsi que pour ta disponibilité et ton optimisme communicatif.

Un tout grand merci à Pancho, le pro de la 3D, sans qui la partie concernant la recherche de la structure tridimensionnelle de la protéine ne serait pas ce qu'elle est. Merci aussi à Guy Baudoux pour m'avoir aidé lors de l'utilisation des Silicon Graphics.

Merci aussi à tous mes "maîtres" de secours, Anne, Fabrice, Jean-Yves, Katalin, Pil, Poos, Vincent, Xavier, ...ainsi qu'aux membres de l'URBM.

Enfin, arriver au terme de ces quatre années d'études, je m'en voudrais de ne pas citer Max et le Nuttion pour tous ces moments partagés ensemble. Encore merci Bertrand pour tout le réconfort de ces derniers jours et surtout pour ces petits plats, jus d'orange, café...apportés lors des longues nuits derrière l'écran.

A tous un immense merci.

Table des matières.

INTRODUCTION **1**

1° L'ADAPTATION DES BACTERIES A LEUR ENVIRONNEMENT : 1

2° TRANSDUCTION DU SIGNAL A DEUX COMPOSANTS : 2

2.1. Caractéristiques générales : *2*

2.2. Les Senseurs : *3*

2.3. Les régulateurs : *4*

2.4. Mécanismes de communication : *5*

2.5. CheY : *6*

2.5.1. Caractéristiques générales : 6

2.5.2. Le site actif : 7

2.5.3. Le noyau hydrophobe et la structure tertiaire : 7

2.5.4. La structure secondaire : 8

2.6. Différentes familles de régulateurs : *9*

3° L'EVOLUTION DE LA COMPLEXITE DES SYSTEMES DE TRANSDUCTION : 10

3.1. Osmorégulation : *10*

3.2. Assimilation de l'azote : *11*

3.3. Chémotaxie : *12*

3.4. La sporulation chez Bacillus, le concept de phosphorelais : *13*

4° LA DIVISION ASYMETRIQUE CHEZ *CAULOBACTER*: 13

5° LE GENRE BRUCELLA : 15

OBJECTIFS DU TRAVAIL **17**

RESULTATS ET DISCUSSION: **18**

1° CLONAGE D'UN REGULATEUR CHEZ *B. ABORTUS* : 18

1.1. Criblage de la banque génomique de Brucella : *18*

1.1.1. Présentation générale : 18

1.1.2. Vérification de l'insert : 18

1.1.3. Séquençage : 20

1.2. Discussion : *22*

2° CONSTRUCTION D'UN MODELE DE LA PROTEINE DIVK : 23

2.1. Recherche de protéines homologues de structure connue : *23*

2.2. Elaboration du modèle : *25*

2.2.1 Alignements de séquences : 25

2.2.2. Vérification de la qualité des modèles obtenus : 25

2.2.3. Amélioration du modèle : 27

2.2.4. Recherche de la structure 3D de DivKBru en utilisant Spo0F comme référence :.....29
2.2.5. Elaboration du second modèle :.....30
2.2.6. Comparaison entre le modèle et le template Spo0F :.....30
2.3. Discussions :.....32
3° SURPRODUCTION DE LA PROTEINE DIVK :.....33
3.1. Introduction :.....33
3.2. Etapes préliminaires :.....33
3.2.1. Définir deux nouveaux oligonucléotides :.....33
3.2.2. Passage par un vecteur intermédiaire :.....34
3.2.3. Clonage du gène Divkbru dans le pET-15b :.....34
3.2.4. Surproduction de la protéine DivkBru :.....35
3.3. Discussions :.....36
Annexe 1 : Réalisation d'une sonde "DivK"......37
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....38
MATERIEL ET METHODES.....41
1° MATERIEL :.....41
1.1. Souches et plasmides :.....41
1.2. Milieux de culture :.....43
1.2.1. Milieux pour bactéries :.....43
1.2.2. Milieux pour phages :.....44
1.2.3. Solutions :.....44
2° TRANSFORMATION :.....45
2.1. Préparation de cellules CACl2 Compétente :.....45
2.2. Préparation de cellules électrocompétentes :.....46
2.3. Transformation de cellules CaCl2 compétentes :.....46
2.4. Electroporation :.....47
3° TECHNIQUES RELATIVES À L'ADN :.....47
3.1. Minipréparation :.....47
3.2. Midipréparation :.....48
3.3. Solutions :.....49
3.4. Extraction au phénol-chloroforme :.....49
3.5. Précipitation de l'ADN :.....50
3.6. Restrictions :.....50
3.7. Ligation :.....51
4° ELECTROPHORESE D'ADN EN GEL D'AGAROSE:.....52
4.1. Introduction :.....52
4.2. Préparation de l'échantillon :.....52
4.3. Gel :.....52

4.4. Solution de bromure d'éthidium : 52
4.5. Migration : 52
4.6. Marqueurs de taille (fig. 47) : 53
4.7. Récupération d'un fragment : 53
4.8. Solutions : 54
5° PCR : 54
5.1. Introduction : 54
5.2. Méthode : 55
5.4. Purification d'amplifications PCR: 57
6° HYBRIDATION SUR PLAGES DE LYSE : 58
6.1. Introductions : 58
6.2. Préparation de la sonde : 58
6.3. Protocole de l'hybridation sur plages de lyse : 59
6.4. Réalisation et détermination du titre d'une solution de phages : 62
6.5. Solutions : 63
7° PRODUCTION D'ADN DE PHAGE : 64
8° ELECTROPHORESE DE PROTEINES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE 65
8.1. Electrophorèse 65
8.1. Solutions (pour un gel 15%) 65
9° RECHERCHE DE LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE D'UNE PROTEINE : 67
9.1. Introduction : 67
9.2. Matériel : 67
9.3. Alignements: 67
9.3.1. Recherche de séquences homologues : 67
9.3.2. Alignements de séquences : 68
9.4. Structure secondaire : 68
9.5. Structure tertiaire : 69
BIBLIOGRAPHIE **72**

Introduction

1° L'adaptation des bactéries à leur environnement :

Au cours de leur développement, les bactéries doivent faire face à de nombreuses modifications, parfois très brutales, de leur environnement immédiat. Ces variations peuvent être chimiques, physiques, physiologiques... Les exemples les plus fréquents sont les variations de pH, osmolarité, température, pression, lumière... D'un autre côté la présence de substances toxiques, la quantité de certains nutriments,... interviennent aussi.

Pour pouvoir survivre, la bactérie doit percevoir rapidement toutes modifications environnementales, intégrer les signaux, au besoin les amplifier et produire une réponse adéquate et rapide (Parkinson, 1993). Pour ce faire, différentes stratégies sont envisageables, comme se déplacer de l'environnement non approprié vers une zone plus favorable. Une autre adaptation possible de la cellule à son nouvel environnement est le changement de l'activité enzymatique ou la modification de l'expression de certains gènes ou groupes de gènes. L'utilisation de ces enzymes modifiés ou des produits de la modification de l'expression génique permet de faire face à des variations temporaires mais aussi permet d'établir des modifications à long terme. Par exemple, l'expression de porines particulières en réponse à toutes modifications d'osmolarité du milieu. Parmi les modifications à long terme, le phénomène de sporulation permet de faire face à un état de privation des ressources nécessaires au bon fonctionnement du métabolisme cellulaire.

Il en va de même pour toutes bactéries pathogènes qui, en plus de faire face aux moyens de défense de l'organisme hôte, doivent coordonner un réseau complexe de facteurs de virulence[1] dont l'expression contrôlée permet la colonisation de ce dernier.

---

[1] Un facteur de virulence est un produit ou un mécanisme qui contribue à la virulence ou à la pathogénie, comme par exemple les facteurs d'adhérence, toxines, capsules et autres propriétés complexes telles que la motilité et l'invasion cellulaire (Salyers et Whitt, 1994).

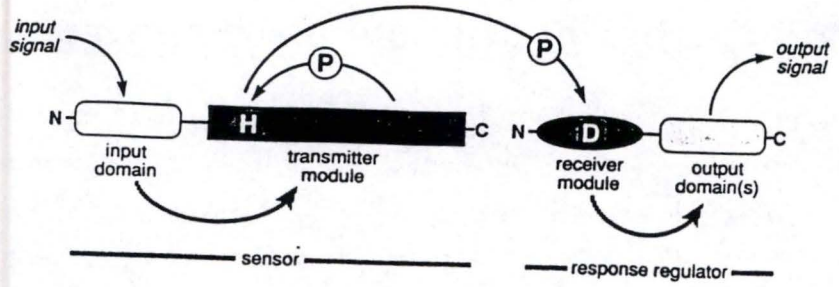


Figure 1 : Paradigme du sytème de transduction du signal à deux composants. L'information se transmet dans ce système via le contrôle d'un domaine sur l'autre (flèches du bas) mais aussi par la phosphorylation (flèches avec un P) d'un résidu histidine et d'un résidu aspartate (Parkinson et Kofoid, 1992).

$$\text{ATP+}\mathbf{S}\text{-}\textit{His} \leftrightarrow \text{ADP} + \mathbf{S}\text{-}\textit{His}\sim\text{P}$$
$$\text{S-}\textit{His}\sim\text{P} + \mathbf{R}\text{-}\textit{Asp} \rightarrow \mathbf{S}\text{-His} + \mathbf{R}\text{-}\textit{Asp}\sim\text{P}$$
$$\text{H}_2\text{O} + \mathbf{R}\text{-}\textit{Asp}\sim\text{P} \rightarrow \mathbf{R}\text{-}\textit{Asp} + \text{P}_i$$

Figure 2 : Représentation du transfert du phosphate dans les systèmes de transduction du signal à deux composants.

La régulation de ces facteurs d'adaptation implique différents mécanismes dont le plus répandu chez les bactéries est probablement le "Système de transduction du signal à deux composants".

2° Transduction du signal à deux composants :

2.1. Caractéristiques générales :

Aussi bien chez les bactéries gram-positives que chez les gram-négatives, l'analyse des gènes contrôlant les réponses aux signaux environnementaux permet de mettre en évidence différentes protéines partageant deux motifs conservés. Ces deux motifs sont dénommés "domaine transmetteur" et "domaine receveur". Les protéines possédant ces derniers appartiennent à la famille des systèmes de régulation aussi appelés ***"Systèmes de transduction du signal à deux composants"***, de part l'importance du rôle joué par ces deux domaines (Stock *et al.*, 1989; Bourret *et al.*, 1991).

Au moyen de mécanismes communs de phosphorylation, chaque paire de protéines traduit un signal "environnemental" en un changement métabolique ou autre (fig. 1).

Le premier composant de cette paire possède le domaine transmetteur. De par sa faculté de s'autophosphoryler sur un résidu histidine, cette protéine est appelée **histidine kinase** ou **senseur** (**S**). La phosphohistidine ainsi produite est alors un intermédiaire énergétique permettant le transfert du groupement phosphoryl vers un résidu aspartate de l'autre protéine, le **régulateur** (**R**). Ce régulateur possède quant à lui, le deuxième motif conservé à savoir, le domaine receveur. La phophorylation induit un changement de conformation de ce domaine qui modifie son activité ou l'activité d'un domaine associé. Le retour à l'état initial du régulateur peut se faire par l'intervention d'une phosphatase (fig. 2).

Les couples histidines kinases-régulateurs sont impliqués dans les réponses adaptatives : chémotaxie, sporulation, pathogénicité, assimilation de l'azote... Plusieurs couples peuvent agir de concert au sein d'une même cellule. Chez *Escherichia coli*, il est fort probable qu'il y ait une cinquantaine de systèmes de transduction du signal (Stock *et al.*, 1989). Certains systèmes de transduction du signal à deux composants, en plus du

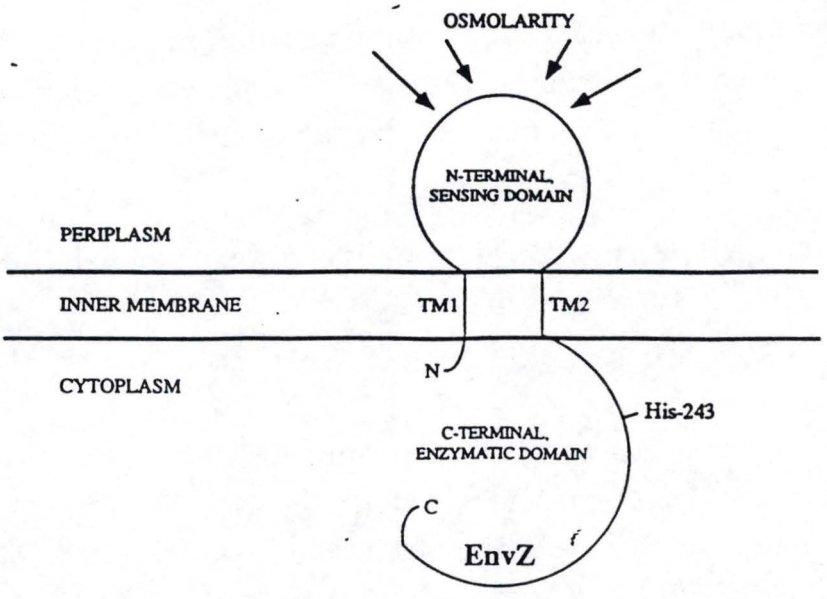


Figure 3 : Représentation du senseur EnvZ. Localisé en membrane interne, le domaine N-terminal est périplasmique, le C-terminal étant lui cytoplasmique. TM1 et TM2 correspondent aux segments transmembranaires, et His-243 représente la position de l'histidine phosphorylée (Pratt et Silhavy, 1995).

senseur et du régulateur, possèdent d'autres protéines importantes ne possédant pas les deux motifs conservés décrits ci-dessus.
Des exemples seront détaillés par la suite.

2.2. Les Senseurs :

Les senseurs sont composés de deux domaines. Le domaine N-terminal est un domaine auquel on attribue le rôle de perception des stimuli. Le deuxième, C-terminal, responsable de la transmission du signal, est généralement nommé "domaine transmetteur".

Les senseurs, dans la plupart des cas, sont localisés en membrane, le domaine transmetteur étant cytoplasmique. Plusieurs senseurs possèdent deux segments transmembranaires, ou plus, assurant la jonction avec le domaine de réception du stimulus qui est déployé de l'autre côté de la membrane cytoplasmique (fig. 3).
Certains senseurs comme NtrB[2] sont quant à eux, retrouvés sous forme soluble dans le cytoplasme.
La communication entre domaines se fait, au besoin, à travers la membrane cytoplasmique. Par la suite ce domaine transmetteur va pouvoir interagir avec l'autre composant du système, le régulateur.

On retrouve une hétérogénéité importante au niveau des séquences primaires des différents domaines de perception, ce qui est à mettre en rapport avec la multitude de stimuli différents que ces derniers peuvent percevoir. Actuellement, on ne connaît que peu de choses concernant la nature exacte des stimuli perçus et des mécanismes entrant en jeu. On sait, par exemple, que certains senseurs se lient à un récepteur situé en membrane, d'autres perçoivent directement le signal eux-même. Exemple: CheA se lie au chémorécepteur Tar qui possède un site de liaison à l'aspartate sur son domaine N-terminal (cfr. 3.3).
Cet exemple sera détaillé par la suite.

Les domaines transmetteurs sont beaucoup plus homogènes. Ils sont capables de s'autophosphoryler sur une histidine, au moyen du groupement phosphate de l'ATP. Les mécanismes d'autophosphorylation ne sont pas encore complètement élucidés, mais il semble que pour certains senseurs, dont EnvZ, il y ait formation d'un dimère (ou

---

[2] Le senseur NtrB intervient dans le système de transduction du signal assurant la régulation de l'assimilation de l'azote. Ce système est présenté en détails au point 3.2.

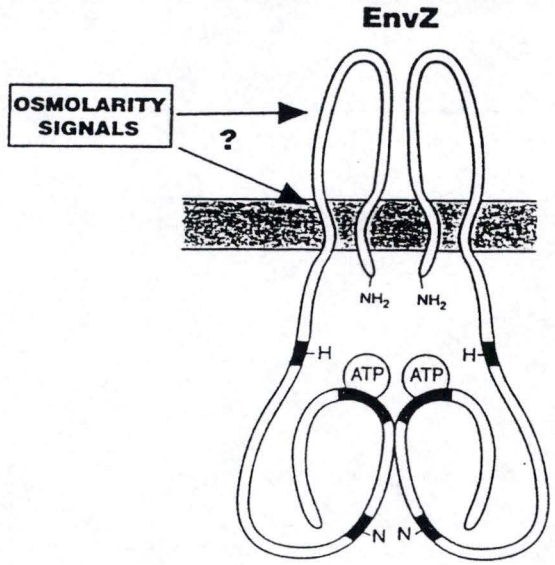


Figure 4 : Représentation de la formation du dimère d'Envz suite à l'autophosphorylation des domaines N-terminaux (Forst et Roberts, 1994).

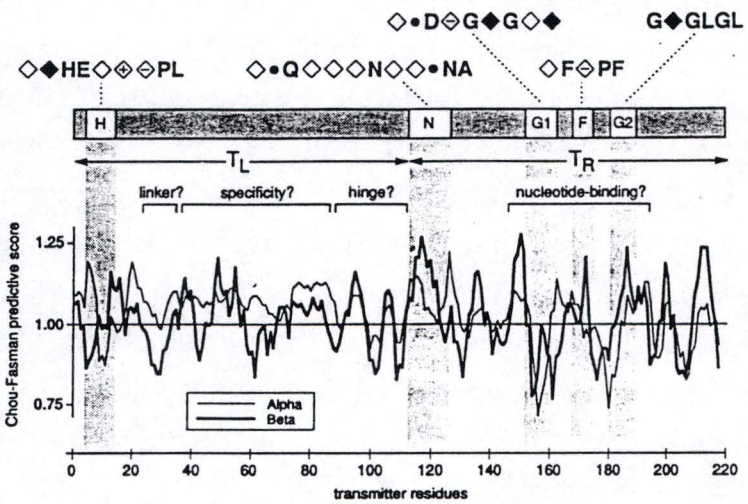


Figure 5 : Caractéristiques structurales des domaines transmetteurs. Les lettres indiquent les acides aminés présent à cette position dans au moins 70% des séquences alignées de transmetteurs. Les losanges indiquent les positions pour lesquelles au moins 50% des acides aminés appartiennent à une même famille chimique : blancs, nonpolaires (I, L, M et V) ; noirs, polaires (A, G, P, S et T); le signe plus, basiques (H, K et R) et, le signe moins, acides (D, E, N et Q) (Parkinson et Kofoid, 1992).

multimère) dont les composants s'autophosphorylent mutuellement (fig. 4) (Yang et Inouye, 1991).
Le domaine transmetteur de quelques senseurs (EnvZ, PhoR, ...) développe une activité phosphatase permettant de réguler la phosphorylation du régulateur.
A partir de la séquence primaire de 240 à 250 résidus, on peut définir cinq boites conservées (Swanson *et al.*, 1994) (fig. 5) :
- la boite "H", zone possédant l'histidine pouvant être phosphorylée ;
- les boites "G_1" et "G_2", riches en glycine, correspondent probablement à des zones de liaison à l'ATP ;
- les boites "F" et "N", dont la fonction reste inconnue.
Le domaine transmetteur peut encore être subdivisé en deux sous-domaines T_L et T_R (Parkinson et Kofoid, 1992) :
- T_L contient la boite H et possède une structure relativement variable. Il semble qu'il joue un rôle dans la reconnaissance des régulateurs cibles.
- T_R quant à lui contient les quatre autres boîtes dont celles, supposées, de liaisons à l'ATP. Dès lors, ce sous-domaine aurait un rôle dans l'autophosphorylation du senseur.

2.3. Les régulateurs :

Presque toujours cytoplasmiques, les régulateurs sont caractérisés par leur domaine amino-terminal, conservé (Stock *et al.*, 1989). D'une taille de 120 acides aminés, ce domaine, est très souvent relié via un lien flexible à un ou plusieurs domaines effecteurs (Parkinson, 1993). Enfin, l'alignement deux à deux du domaine conservé des différents régulateurs connus, montre un taux d'identité au niveau des acides aminés variant de 20 à 30% (Stock et *al.*, 1989).

Le domaine amino-terminal est aussi appelé domaine receveur du fait qu'il reçoit le groupement phosphate du senseur. Cette phosphorylation se fait sur un résidu aspartate déterminé. Par exemple, la phosphorylation de CheY se fait sur l'aspartate 57 (Sanders *et al.*, 1992). La réaction de transfert du phosphate du senseur au régulateur étant catalysée par ce dernier.
Dans certains cas les régulateurs peuvent s'autophosphoryler (cfr. CheB, CheY... -Parkinson et Kofoid, 1992-) au moyen de petites molécules donneuses de phosphate (acétylphosphate, imidazolphosphate, carbamoyl phosphate ... -fig. 6-) (Lukat *et al.*, 1992),

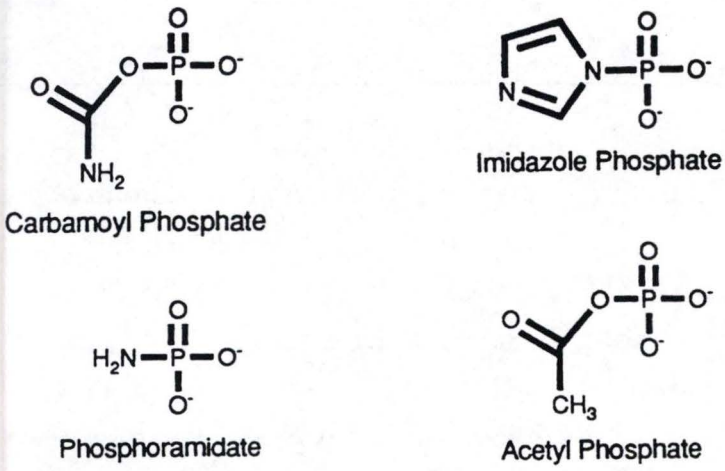


Figure 6 : Représentation de petites molécules donneuses de phosphate pouvant se substituer aux senseurs. (Stock *et al.*, 1995).

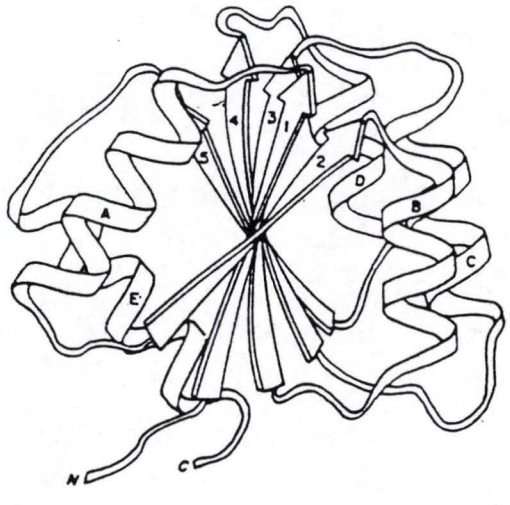


Figure 7 : Représentation de la structure tridimentionnelle de CheY. Protèine simple domaine, CheY est composée de cinq plans β (1 à 5) et de cinq hélices α (A à E) (Stock *et al.*, 1990).

Contrairement aux senseurs, ici nous disposons de la structure tridimensionnelle du domaine receveur. En effet, la configuration tridimensionnelle de CheY, a été déterminée par analyse aux rayons X chez *Salmonella typhimurium* - forme liant le Mg^{++} - (Stock *et al.*, 1989) et chez *E. coli* - forme apo - (Volz et Matsumura, 1991) mais aussi par RMN chez *E. coli* (Bruix *et al.*, 1993; Moy *et al.*, 1994). Plusieurs formes mutantes ont été aussi cristallisées.
CheY est un régulateur composé uniquement du domaine receveur. Ses caractéristiques structurales sont transposables aux domaines receveurs des autres régulateurs (fig. 7) (Stock *et al.*, 1989).

Dans la plupart des cas, le domaine effecteur est un domaine de liaison à l'ADN régulant la transcription d'un ou plusieurs gènes. Certains domaines effecteurs comme ceux de CheB, AlgR, AgrA et SpoOA diffèrent significativement des autres. En effet CheB, par exemple, possède une activité méthylestérase.
Le domaine effecteur est lié au domaine receveur par l'intermédiaire d'un lien flexible, ce qui permet un contrôle du domaine receveur sur le domaine effecteur, probablement via un changement conformationnel (Wootton et Drummond, 1989).

2.4. Mécanismes de communication :

Plusieurs étapes sont caractéristiques du phosphotransfert entre senseurs et régulateurs, l'étape critique étant celle de l'interaction entre les deux partenaires du système (Parkinson et Kofoid, 1992).
- En premier lieu, il y a détection d'un stimulus par le domaine de perception du senseur, ce qui entraîne une activation et une autophosphorylation du domaine transmetteur.
- Suite à cette phosphorylation, il y a une association réversible entre le domaine transmetteur activé et le domaine receveur non phosphorylé.
- Cette interaction permet au domaine receveur de catalyser le transfert du phosphate du résidu histidine du senseur sur un résidu aspartate accepteur.

La phosphorylation du receveur peut avoir deux conséquences. Premièrement, elle peut réduire l'affinité de liaison du receveur phosphorylé pour le transmetteur déphosphorylé, facilitant ainsi la libération de ce dernier. Deuxièmement, cette phosphorylation peut permettre la formation du signal "output" du régulateur. Les changements

dans l'activité du régulateur peuvent persister jusqu'à ce que ce dernier soit déphosphorylé, soit spontanément, soit par une activité autophosphatase ou bien encore par l'activité phosphatase d'autres protéines ou même du senseur.

L'interaction entre transmetteur et receveur et le transfert du phosphate qui s'en suit, sont les éléments clés de la transduction du signal. Malheureusement les déterminants structuraux responsables de l'interaction entre les deux domaines n'ont pas encore été identifiés. Sachant que les régulateurs distinguent, parmi différents senseurs, leurs donneurs de phosphates attitrés, il est raisonnable de penser que la structure locale proche de l'histidine phosphorylée (bloc H) contient les informations pour la reconnaissance du substrat. Cependant, il est tout aussi possible que ces contacts spécifiques soient situés hors du site catalytique.

S'il y a un mécanisme de reconnaissance spécifique entre senseurs et régulateurs, il devrait y avoir des contacts stéréospécifiques entre surfaces exposées des deux protéines. Chez les régulateurs, les hélices externes pourraient être impliquées dans de tels mécanismes. La phosphorylation induirait un changement conformationnel des sites de contacts facilitant ainsi les étapes d'interaction et de libération (Parkinson et Kofoid, 1992).

2.5. CheY :

2.5.1. Caractéristiques générales :

Petite protéine globulaire de 128 acides aminés, CheY est repliée en structure $(\alpha/\beta)_5$ (fig. 7). Les cinq plans sont disposés en feuillets parallèles selon une topologie 2-1-3-4-5. Les hélices α représentent environ 40% des structures secondaires pour 20% chez les plans β. Le reste se répartit entre les coudes - 25% - et les *loops* de tailles variées.

Le noyau, hydrophobe, de la protéine est constitué des trois brins centraux (1, 3 et 4). Les cinq hélices amphiphiles sont disposées en deux groupes de part et d'autre du noyau central de telle façon que les deux brins restant (2 et 5) soient accessibles au solvant.

Les réactions de phosphorylation et de déphosphorylation nécessitent chez CheY, comme probablement chez les autres régulateurs, la présence de Mg^{2+}. Les études cristallographiques ont montré que trois

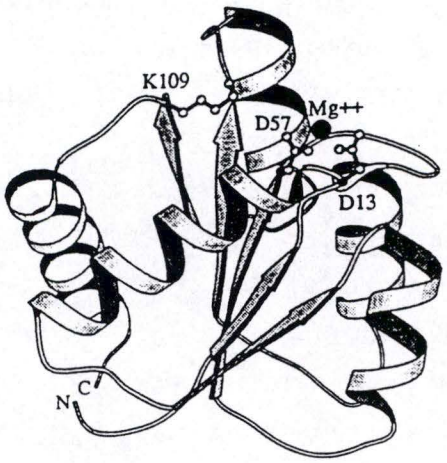


Figure 8 : Schéma de CheY montrant le dépliement α/β ainsi que la position des résidus conservés du site actif au niveau du loop situé au sommet des feuillet β1, β3 et β5. Enfin Mg^{++} est réprésenté par le rond noir (Stock *et al.*, 1993).

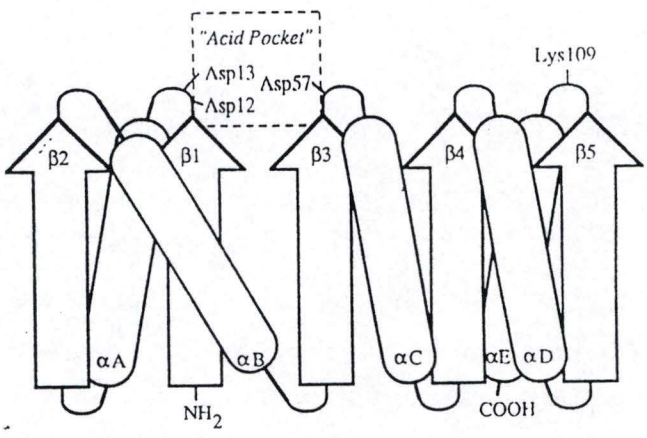


Figure 9 : Organisation de la topologie de CheY (Bourret *et al.*, 1991).

résidus aspartates (12, 13 et 57) sont impliquées dans la liaison de Mg^{++} à la protéine (fig. 8) (Stock *et al.*, 1993). Les différences majeures entre CheY avec et sans Mg^{++} résident principalement au niveau du site actif de cette molécule (Stock *et al.*, 1993).

2.5.2. Le site actif :

Cinq résidus intervenant dans la phosphorylation de CheY ont été mis en évidence : les aspartates 12, 13 et 57, la thréonine 87 et la lysine 109[3]. Regroupés à l'extrémité carboxy-terminale de feuillets β, les trois résidus aspartates forment la "poche acide" (fig. 9).
D12 et D13 sont regroupés sur la même face de 1 et dirigés vers le site actif.
D57, le résidu phosphorylé, se situe sur le brin central 3 (Sanders *et al.*, 1989).
T87 est disposé sur le brin adjacent -4- dans une position permettant à son groupement γ-hydroxyl de participer au réseau de liaisons hydrogènes entre molécules du solvant, au niveau du site actif.
Enfin, K109 est disposé à l'extrémité du brin le plus externe -5-. La chaîne latérale de cette lysine est en configuration étendue, dans le site actif, formant dès lors une liaison hydrogène avec le groupement carboxyl de D57. Cette paire ainsi formée : D57-K109, est enfouie dans le site actif et ne montre qu'une surface négligeable accessible au solvant.

2.5.3. Le noyau hydrophobe et la structure tertiaire :

Sur base de l'étude et de l'alignement multiple des séquences de 79 homologues à CheY, Volz (1995) étudie la conservation des résidus à travers ce groupe de protéines.

Le trait le plus caractéristique réside dans la conservation, parmi les différents composants, de la nature hautement hydrophobe du noyau formé par les brins 1, 3 et 4. Ce noyau hydrophobe inclut aussi huit sites hautement conservés sur quatre des cinq hélices α avoisinantes. Enfin, 26 résidus provenant des hélices, coudes et brins externes font encore partie de cet ensemble hydrophobe.

---

[3] Cette numérotation se réfère aux résidus de CheY chez *E. coli*. Le rôle de ces derniers est similaire au rôle joué par d'autres résidus analogues chez d'autres régulateurs.

Residue	Role
F8	Hydrophobic core sequence of internal β_1 strand
L9	Hydrophobic core sequence of internal β_1 strand
V10	Hydrophobic core sequence of internal β_1 strand
V11	Hydrophobic core sequence of internal β_1 strand
D12	Mg^{2+} binding
D13	Mg^{2+} binding and catalysis
M17	Hydrophobic cover of α_1-α_5-interface
R18	Hydrophobic cover of α_1-β_1-interface
V21	Hydrophobic core
L25	Hydrophobic core
G29	α_L-conformation; C-cap of α_1
F30	Hydrophobic cluster with F8, F53, and F124
V33	Sole hydrophobic residue of exposed β_2-strand; buried
L46	Hydrophobic core
G52	Aspartate by consensus; start of β_3
F53	Hydrophobic cluster with F8, F30, and F124
V54	Hydrophobic core sequence of internal β_3-strand
I55	Hydrophobic core sequence of internal β_3-strand
S56	Hydrophobic core sequence of internal β_3-strand
D57	Invariant; required for phosphorylation-induced activation
W58	Hydrophobic closure to α_3-β_4-α_4-interface
M60	Hydrophobic plug for crevice between β_1, α_2, β_3, and α_3
P61	Rigid group in γ-turn loop
N62	Positive ϕ-conformation; required for γ-turn
D64	N-cap of α_3
G65	Internal start of α_3; severe steric restrictions on β-substituent
L66	Internal residue of α_3
L68	Internal residue of α_3; hydrophobic core
L69	Internal residue of α_3; hydrophobic core
L72	Internal residue of α_3; hydrophobic core
P82	Start of β_4
V83	Hydrophobic core sequence of internal β_4-strand
L84	Hydrophobic core sequence of internal β_4-strand
M85	Hydrophobic core sequence of internal β_4-strand
V86	Hydrophobic core sequence of internal β_4-strand
T87	Invariant hydroxyl; proton donor to active site
A88	Reduced bulk; required for access to D57 active site
I96	Conserved solvent accessible hydrophobic residue
G102	α_L-conformation; C-cap of α_4
A103	Reciprocally covariant with position 106
Y106	Conserved aromatic; reciprocally covariant with 103
V107	Sole hydrophobic residue of exposed β_5-strand; buried
K109	Invariant; required for activation
P110	*cis* peptide following K109; rigidity to β_5-α_5-loop
F111	Outer shell of hydrophobic core
L116	Internal residue of α_5; hydrophobic core
L120	Internal residue of α_5; hydrophobic core
F124	Hydrophobic cluster with F8, F30, and F53

Figure 10 : Rôle structural des différents résidus conservés du régulateur CheY (Volz, 1995).

Les cinq hélices présentent une variabilité importante au niveau de leur séquence primaire et ce principalement pour des raisons structurales. L'hélice 2 la plus exposée, présente le plus de variation, la plus conservée étant 3 qui est située entre 2 et 5.
En général, les zones les plus distantes du site actif présentent une plus grande variabilité au niveau de la structure primaire. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces régions sont plus tolérantes à toutes modifications structurales sans affecter le fonctionnement de la protéine.

2.5.4. La structure secondaire :

L'analyse de la structure secondaire permet de déduire que tous les autres résidus hautement conservés sont à mettre en rapport avec des caractéristiques structurales importantes de CheY (fig. 10).
L'exemple le plus caractéristique est celui du "γ-turn loop"[4]. Cette structure compliquée, rigide, exposée au solvant et localisée auprès de la zone de phosphorylation de la molécule caractérise le régulateur. Elle pourrait servir pour la reconnaissance de ce dernier par les kinases.
L'apparente immuabilité de cette caractéristique peut s'expliquer par cinq éléments structuraux :
- la présence exclusive d'un résidu hydrophobe "enfoui" à la position 60 ;
- une proline conservée en position 61 ;
- le γ-turn centré en position 62 ;
- le résidu de capping[5] amino-terminal de l'hélice 3 en position 64 ;
- et finalement le premier résidu de l'hélice 3 est une glycine conservée en position 65.
Les résidus présents dans les zones variables proches pourraient eux servir à affiner la spécificité de reconnaissance.

---

[4] Les γ-turns sont définis par un pont hydrogène entre le groupement carbonyl d'un acide aminé et le groupement amine de l'acide aminé situé deux résidus en amont au niveau de la séquence.

[5] Une hélice peut être considérée comme un macro dipôle, car les ponts hydrogènes qui la maintiennent dans sa conformation pointent tous dans la même direction. Un résidu de "capping" est un résidu qui neutralise les charges partielles ainsi formées aux extrémités de l'hélice (Serrano et Fersht, 1989).

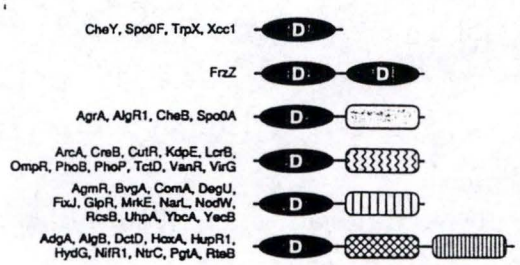


Figure 11 : Présentation schématique des principales protèines composants les cinq familles de régulateur (Parkinson et Kofoid, 1992).

L'autre caractéristique structurale peu commune réside dans la région hautement conservée de type "VIb turn"[6] impliquant les résidus K109, P110 et F111. Ce coude se distingue par la formation d'un lien peptidique *cis* entre la lysine et la proline. La conservation de ce coude pourrait être lié à sa fonction, assurer la rigidité du lien connectif entre l'hélice 5 et le plan 5. Ce lien rigide pourrait transmettre plus rapidement les effets d'une activation d'une région à l'autre.
Enfin, il y a encore plusieurs résidus conservés jouant un rôle particulier, par exemple les glycines 29 et 102 jouant un rôle de terminateur d'hélice α.

2.6. Différentes familles de régulateurs :

La classification des régulateurs en différentes familles se fait sur base de similarité de séquences pour la partie C-terminale, le domaine effecteur (Stock *et al.*, 1989). Cinq familles sont à ce jour définies, chacune portant le nom d'une protéine représentative: CheY, NtrC, FixJ, OmpR et les "miscellaneous", famille plus hétérologue regroupant les inclassables (Volz, 1993) (fig. 11).
- La famille CheY regroupe les régulateurs ne possédant que le domaine receveur. Hormis CheY et Spo0F, trois autres membres de cette famille possèdent entre 10 et 50 résidus supplémentaires, du côté C-terminal, dont la fonction reste inconnue. Toutes les autres familles sont multidomaines.
- La famille NtrC regroupe les régulateurs d'environ 460 résidus, possédant deux domaines après le domaine receveur et homologues à NtrC. Le domaine conservé de ces protéines interagit avec le facteur $E\sigma^{54}$ de la RNA polymérase.
- La famille FixJ regroupe les régulateurs partageant un domaine particulier à leur extrémité carboxy-terminale et ayant une longueur totale d'environ 220 résidus. Les composants de cette famille ont un rôle de régulateur de transcription, mais les mécanismes de leur fonctionnement n'ont pas encore été élucidé.

---

[6] Les β turns sont des structures secondaires présentes lorsque la distance entre les C_i (α) et C_{i+3} (α) est inférieure à 7 Å et que le résidu central n'est pas un résidu dont les angles et correspondent à des angles de résidus présent dans une hélice . On peut classer les turn en fonction de la valeur des angles ψ et ϕ pris par certains résidus. Exemple, le VIb turn est caractérisé par des angles ψ et ϕ de +120° et -120° en i+1 et des angles ψ et ϕ de 0° et -60° en position i+2 (Wilmot et Thornton, 1990).

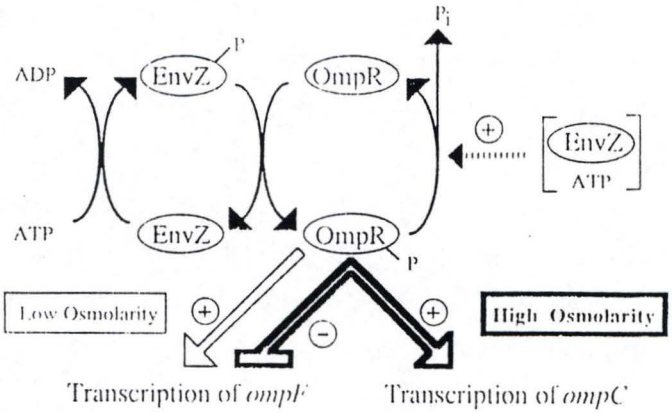


Figure 12 : Représentation du système de transduction du signal EnvZ-OmpR assurant la régulation de la transcription des protéines de la membrane externe. La flèche hachurée avec le signe "plus" indique une stimulation, les flèches en trait non plein, les cibles finales du système de régulation (Bourret *et al.*, 1991).

- La famille OmpR est composée de PhoP, PhoB, VirG et d'autres homologues à OmpR possédant un domaine de liaison à l'ADN après le domaine receveur. La longueur de ces régulateurs avoisine les 230 acides aminés.

3° L'évolution de la complexité des systèmes de transduction :

3.1. Osmorégulation :

Le système EnvZ-OmpR peut être considéré comme le modèle le plus élémentaire de système de transduction du signal (Parkinson, 1993). Etudié principalement chez *E. coli*, ce système est présent chez d'autres espèces. *E. coli* occupe différentes niches écologiques; de l'eau douce, où l'approvisionnement en nutriments est limité, au tractus intestinal des animaux où elle est exposée à des conditions stressantes et une osmolarité importante. Pour s'adapter à ces changements d'osmolarité, elle modifie le type de pores de diffusion existant au niveau de sa membrane externe (Csonka et Hanson, 1991). Ces pores, au travers desquels diffusent de petites molécules (les nutriments), sont constitués des porines, homotrimères protéiques, OmpF et OmpC. Les gènes encodant ces porines, sont régulés de manière différentielle en fonction des changements d'osmolarité du milieu de croissance de la bactérie. OmpF est prédominant, à 37°C, dans des conditions de faible osmolarité. Par contre dans des conditions de grande osmolarité, OmpC est préférentiellement produit et OmpF réprimé. Quel que soit le type d'environnement, le nombre global de porines reste constant. Les deux porines sont encodées par les gènes *ompF* et *ompC*, le locus *ompB* encodant lui les acteurs, EnvZ et OmpR, de la régulation de l'expression des deux porines, l'état de phosphorylation d'OmpR modulant l'expression de *ompF* et de *ompC* (Forst *et al.* 1989) (fig. 12).

EnvZ, senseur situé en membrane interne est constitué de 450 résidus (Forst *et al.*, 1987). Il est composé de deux régions transmembranaires, un domaine périplasmique de 115 acides aminés et un domaine cytoplasmique de 270 résidus. La phosphorylation se fait sur l'histidine 243. Le domaine de liaison à l'ATP est lui constitué des glycines

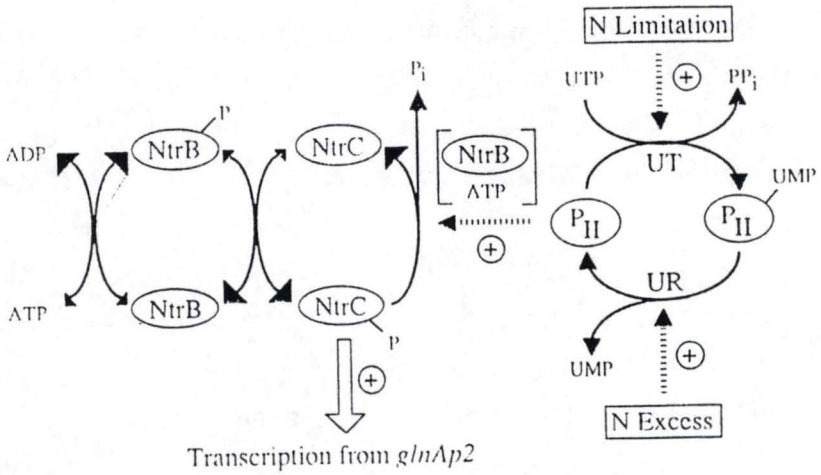


Figure 13 : Représentation du système de transduction du signal NtrB-NtrC assurant la régulation de la transcription de la glutamine synthetase. Les flèches hachurées avec le signe "plus" indiquent une stimulation, les flèches en trait non plein, les cibles finales du système de régulation (Bourret *et al.*, 1991).

375, 377, 401, 403 et 405. Enfin la boite "N" est localisée sur l'asparagine 347. En plus de l'activité kinase, cette protéine assure une activité phosphatase vis à vis du régulateur OmpR (Aiba *et al.*, 1989). La perception des modifications d'osmolarité du milieu se fait par EnvZ au moyen de mécanismes non encore élucidés, mais il semble que le senseur détecte des modifications spatiales ou de fluidité de la membrane (Aiba *et al.*, 1989).

Le domaine amino-terminal (130 résidus) d'OmpR dispose d'une séquence similaire à CheY. La phosphorylation se fait sur l'aspartate 55. La portion C-terminale de cette protéine est un domaine de liaison à l'ADN (Tsung *et al.*, 1991).

3.2. Assimilation de l'azote :

La plupart des bactéries régulent à la fois leur quantité et l'activité de la glutamine synthétase en réponse à la disponibilité en azote. L'assimilation du NH_3 présent en faible concentration se fait au moyen de la glutamine synthétase. En présence d'ATP et de NH_3, l'enzyme convertit le glutamate en glutamine. Cette glutamine étant une source directe d'azote pour de nombreuses voies biosynthétiques.

Le contrôle de l'expression du gène de la glutamine synthétase, *glnA*, se fait au moyen du couple senseur (NtrB) - régulateur (NtrC) (fig. 13). Comme pour les autres systèmes de transduction, il y a transfert de phosphate entre le senseur et le régulateur. La déphosphorylation de NtrC est favorisée, en présence d'ATP, par la protéine P_{II}. Cette dernière assure le lien entre, d'un côté, les réactions de phosphorylation et, de l'autre, le système de détection de l'azote.

La disponibilité en azote influence l'activité de deux enzymes, l'uridylyltransférase (UT) et l'"uridylyl-removing enzyme" (UR), ces deux enzymes modifiant l'activité de la P_{II}. Sous des conditions d'excès en azote, il y a stimulation de l'UR qui désuridyle la protéine P_{II}. En présence d'ATP, cette dernière favorise la déphosphorylation de NtrC, ce qui permet la désactivation rapide de la transcription de *glnAp2*[7] (review in Bourret *et al.*, 1989).

---

[7] *glnAp2* est le promoteur du gène *glnA* qui est fortement activé lors de conditions limitantes en azote.

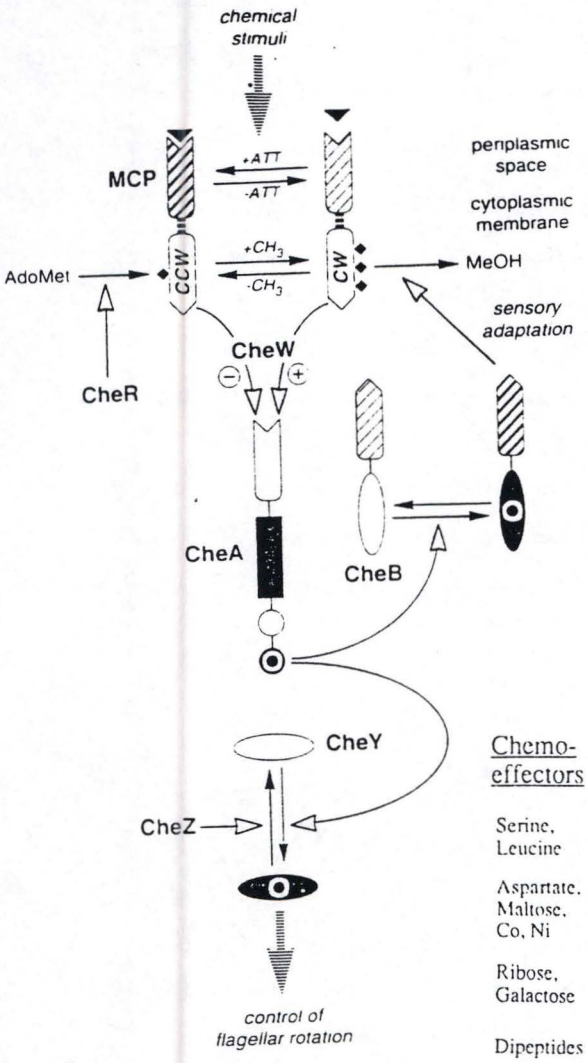


Figure 14 : Représentation du système chémotactique de transduction du signal chez *E. coli*. MCP représente le chémorécepteur, et les carrés noirs les groupements méthyls (leur nombre est arbitraire). Le fonctionnement est expliqué en détail dans le texte (Parkinson, 1993).

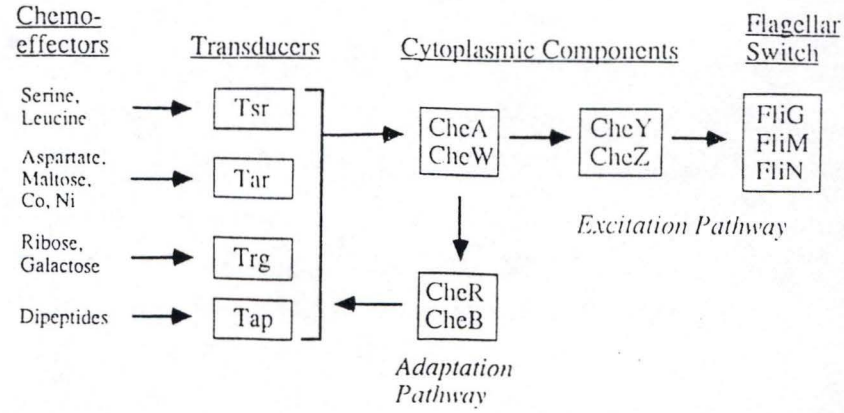


Figure 15 : Schéma du trajet emprunté par les signaux dans le système chémotactique de transduction du signal chez *E. coli* (Bourret *et al.*, 1991).

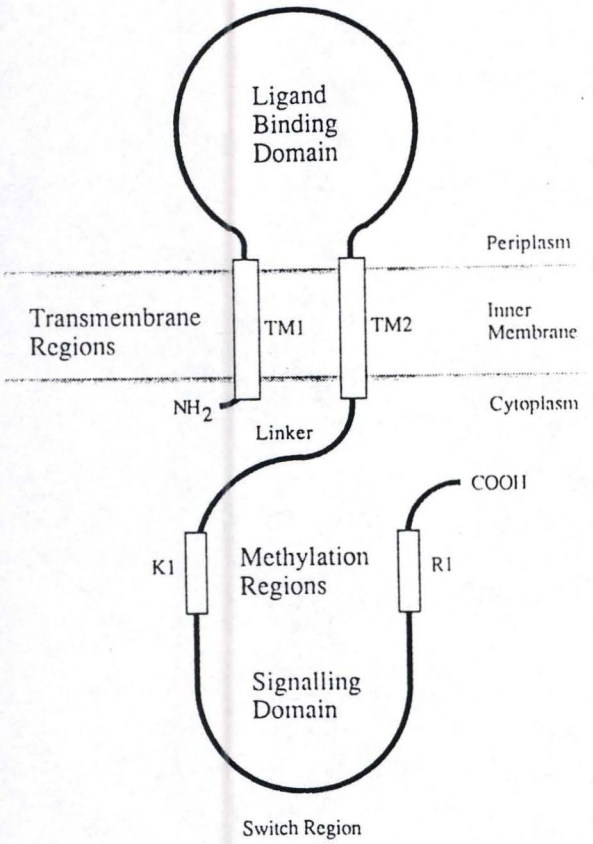


Figure 16 : Schéma présentant l'organisation structurale et fonctionnelle d'un chémorécepteur (Bourret *et al.*, 1991).

3.3. Chémotaxie :

Les déplacements d'une bactérie comme *E. coli* se font par rotation des flagelles. Les mouvements anti-horlogiques (AH) des flagelles assurent le déplacement en avant de la bactérie, les horlogiques (H) assurent eux la rotation de la cellule sur elle même. La combinaison d'AH et d'H permet à la bactérie des mouvements dans les trois dimensions. Les substances attractives (sucres, acides aminés,...) favorisent les mouvements prolongés dans une direction ; par contre les substances répulsives (alcool, acide gras, ...) favorisent les mouvements de rotation de la cellule permettant ainsi une réorientation du mouvement de la cellule.

La machinerie intracellulaire assurant le contrôle du mouvement des flagelles nécessite différentes familles de chémorécepteurs ainsi que six protéines cytoplasmiques : CheA, CheB, CheR, CheW, CheY et CheZ (fig. 14 et fig.15). Les chémorécepteurs sont des protéines transmembranaires de 550 acides aminés possédant un domaine senseur périplasmique ainsi qu'un domaine de "signalisation" situé dans le cytoplasme (fig. 16). La kinase CheA, via le domaine C-terminal, est associée à un chémorécepteur et à la protéine CheW, le tout formant un complexe ternaire. Dans ce complexe, le chémorécepteur, et CheA, forme chacun un dimère ; CheW est présent sous forme de deux monomères. Le chémorécepteur, suite à la perception d'un signal, régule l'activité de CheA. Ce dernier permet le transfert du groupement phosphoryl à la fois vers CheY et vers CheB, deux régulateurs. CheY assure la régulation des protéines responsable des mouvements de rotation du flagelle ; phosphorylé, il favorise la rotation horlogique. Tout ce processus de transfert du phosphate est inhibé par la présence d'un ligand attracteur lié aux chémorécepteurs ; par contre, la méthylation de ces derniers favorise ce phosphotransfert. La méthylation, ou la déméthylation, des chémorécepteurs est un point crucial de la réponse chémotactique. En effet, cette dernière assure la modulation du signal d'excitation.

La régulation de la méthylation des chémorécepteurs se fait au moyen de deux protéines CheB et CheR. Cette dernière assurant la méthylation, la déméthylation étant elle favorisée par CheB phosphorylé.

Enfin, la seule fonction connue de CheZ est d'accélérer la déphosphorylation de CheY (review in Stock *et al.*, 1989 et Parkinson, 1993).

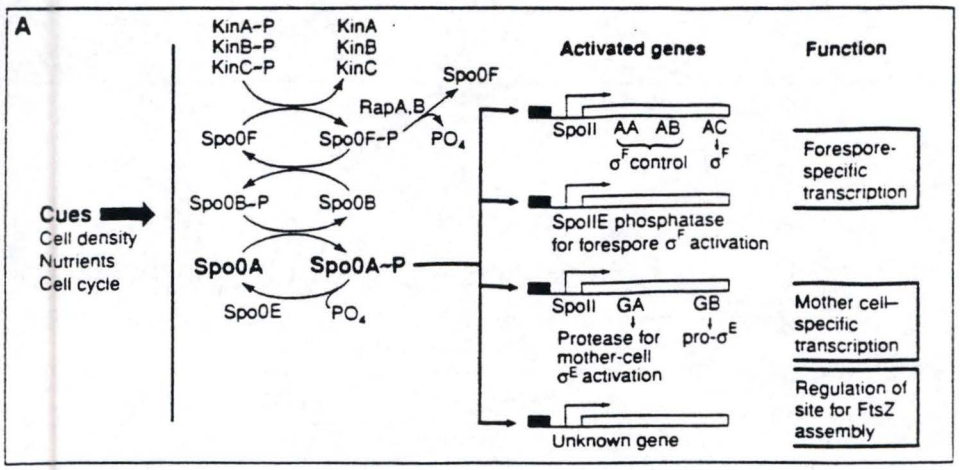


Figure 17 : Représentation du phosphorelais qui intervient dans la sporulation de *B. subtilis*. Spo0A activé agit sur les gènes intervenant dans la formation du préspore, dans la transcription de facteurs spécifiques à la cellule mère et aussi sur un ou des gène(s) inconnu(s) nécessaire(s) au changement de site d'assemblage de la protéine FtsZ (Shapiro et Losick, 1997).

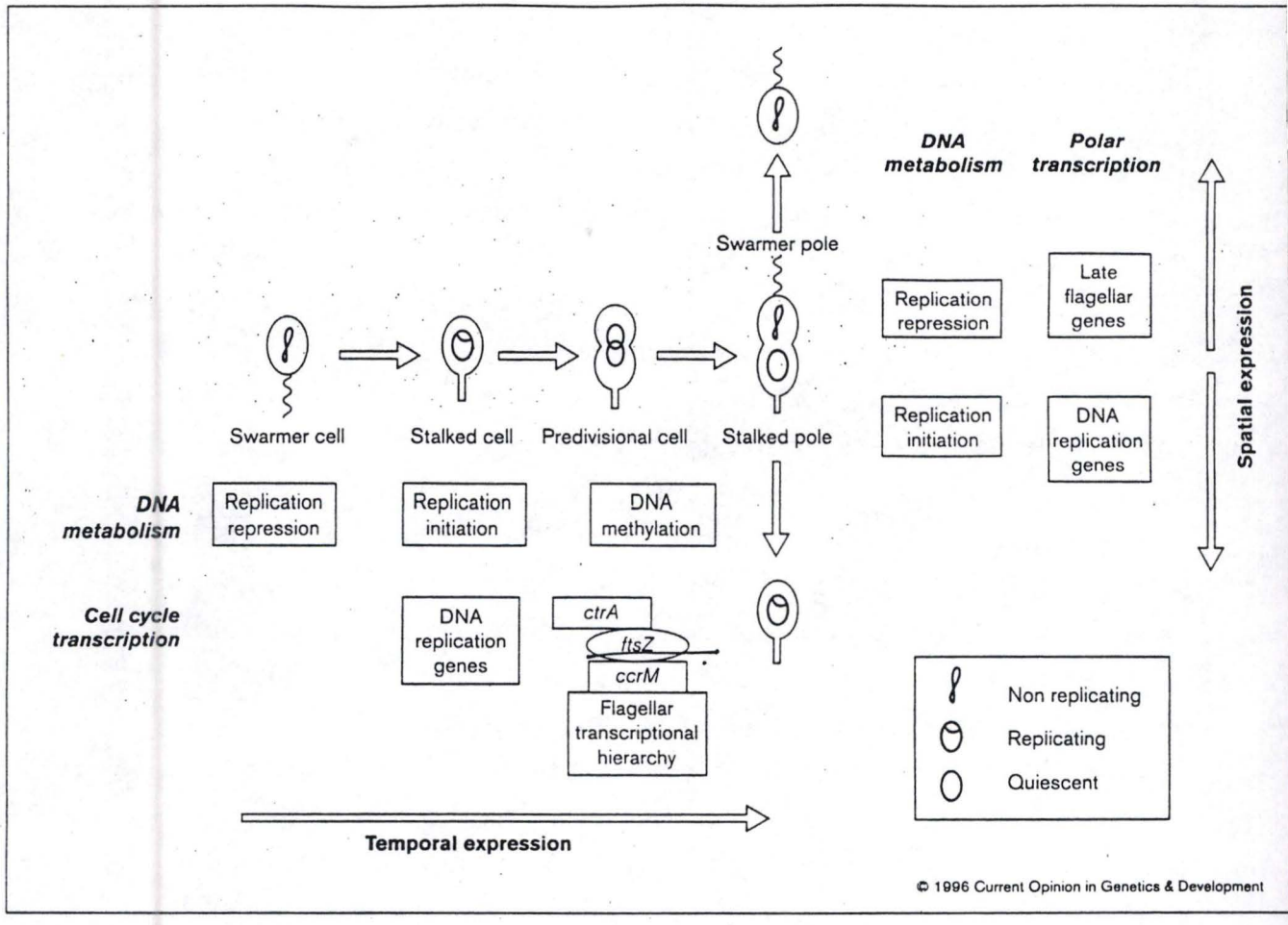


Figure 18 : Représentation schématique de la régulation spatiale et temporelle du cycle cellulaire de *Caulobacter*. Les évènements du cycle cellulaire sont présentés dans des cadres, alignés sur le modèle de cycle cellulaire afin de présenter leur position spatiale ou temporelle. Le gène *ccrM* code pour une méthyltransférase, FtsZ est une protéine interveant dans la division cellulaire (Domian *et al.*, 1996).

3.4. La sporulation chez Bacillus, *le concept de phosphorelais :*

Sous des conditions non limitantes, la division chez *Bacillus subtilis*, se fait de manière binaire. Par contre, lorsque la bactérie se trouve dans un environnement pauvre en nutriments, la bactérie rentre dans un processus de division asymétrique, c'est le phénomène de sporulation.
La sporulation débute par la formation d'un septum aboutissant à la formation d'une petite cellule, le préspore, dans la cellule mère. Le préspore se développe à l'intérieur de cette dernière pour donner un spore mature, résistant aux conditions défavorables. A la fin de ce processus de maturation, la cellule mère est complètement lysée.

Trois histidines kinases sont impliquées dans l'initiation de la sporulation : KinA, KinB et KinC (fig. 17). Toutes trois permettent la phosphorylation du régulateur Spo0F ; régulateur constitué uniquement du domaine receveur. Le groupement phosphoryl est ensuite transféré sur la phosphotransférase Spo0B avant de se retrouver sur le régulateur principal Spo0A. Ce dernier phosphorylé, devient actif et joue un rôle de répresseur ou d'activateur de transcription selon les gènes ciblés (Burbulys *et al.*, 1991).
La caractéristique importante ressortant de ce concept de phosphorelais est la possibilité à chaque niveau de disposer de contrôles empêchant une induction "parasite" de la sporulation. A ce jour, trois phosphatases sont connues pour intervenir dans le phosphorelais, RapA et RapB interviennent au niveau de Spo0F, et Spo0E qui elle agit sur Spo0A. Dès lors la phosphorylation et déphosphorylation des différents composants de ce relais requièrent la présence de signaux pour établir la concentration de Spo0A-phosphorylé nécessaire à déclencher la sporulation.

4° La division asymétrique chez *Caulobacter* :

Contrairement à *B. subtilis*, la division asymétrique est une étape obligatoire dans le cycle cellulaire de *Caulobacter crescentus*.
La cellule mère immobile se divise en donnant une cellule flagellée, mobile, et une cellule pédonculée immobile. Cette dernière peut, à nouveau, entrer directement dans un cycle de division, par contre, la cellule mobile doit entamer un processus de perte de flagelle et de formation d'un pied avant de pouvoir entrer en division (fig. 18).

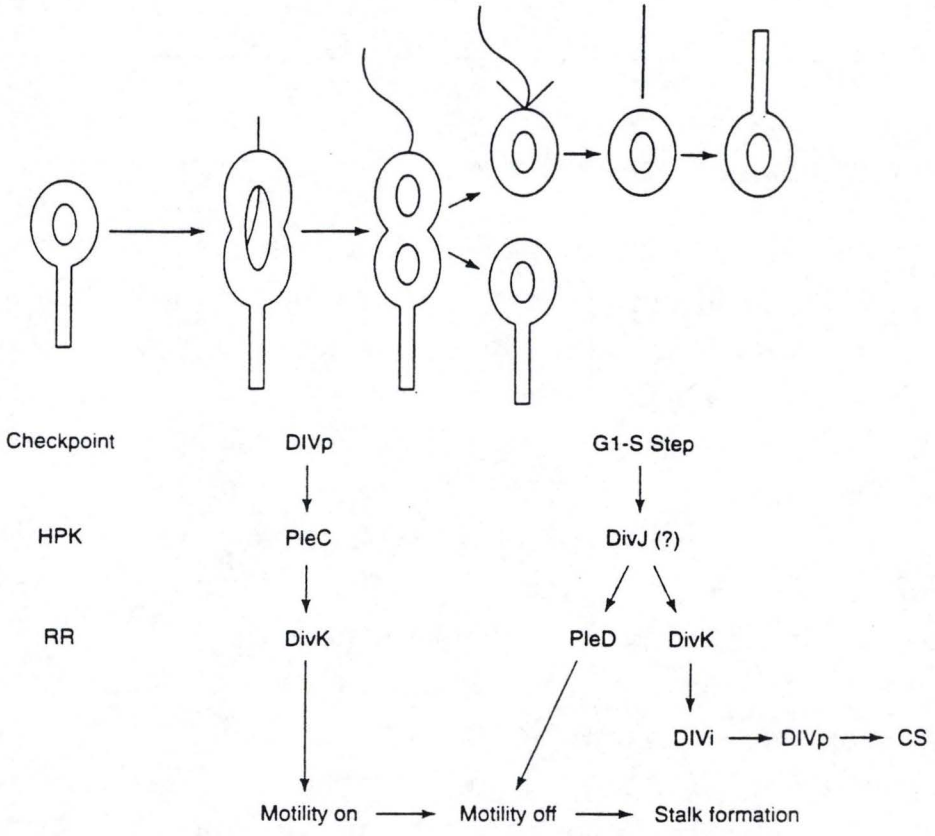


Figure 19 : Présentation des deux voies de transduction du signal chez *Caulobacter*. DivK intervient dans l'initiation de la motilité et la formation du pied mais aussi dans la régulation du cycle cellulaire (Otha et Newton, 1996).

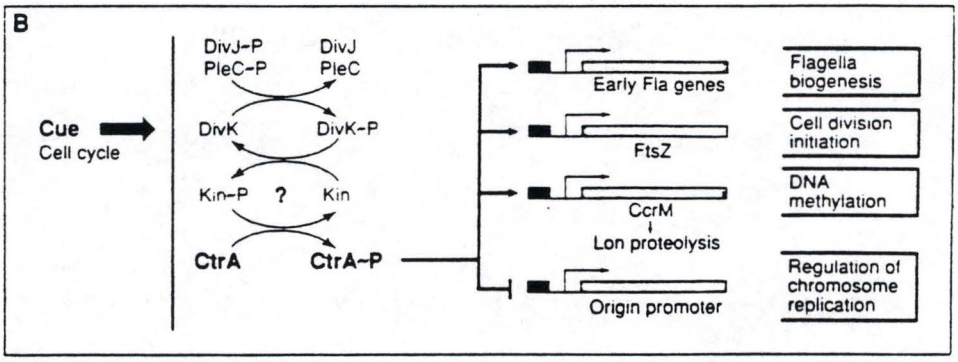


Figure 20 : Présentation du "supposé" phosphorelais activant le régulateur transcriptionnel du cycle cellulaire, CtrA, chez *C. crescentus*. Les fonctions des gènes activés par CtrA sont présentées dans les cadres sur la droite de la figure (Shapiro et Losick, 1997).

Bien que non encore complètement élucidé, le système de transduction du signal chez *Caulobacter* présente des similitudes avec le système multicomposant de *B. subtilis*. Différentes protéines jouant un rôle dans le contrôle du développement du cycle cellulaire ont été identifiées.

Le couple PleC-DivK semble intervenir dans l'initiation et le maintien de l'asymétrie dans la cellule en division (Hecht *et al.*, 1995). Il semble qu'il existe une deuxième voie de transduction du signal impliquant DivK, ainsi qu'un autre régulateur, PleD, et le senseur DivJ. Celle-ci assure le contrôle de la division cellulaire (fig. 19) (Hecht *et* al., 1995, Otha et Newton, 1996).

Tout comme Spo0F de *B subtilis*, DivK, composé uniquement du domaine amino-terminal conservé, peut agir en tant que phosphodonneur pour une protéine cible ; à moins qu'il n'assure sa fonction au moyen d'une interaction protéine-protéine. Bien que non unique, DivK se démarque des autres régulateurs par le fait qu'il est essentiel pour le système de transduction du signal. Enfin, DivK se caractérise aussi par le fait qu'il est incapable de s'autophosphoryler (Hecht *et* al., 1995).

Il existe aussi un autre régulateur chez *C. crescentus*, CtrA. Cette protéine a les caractéristiques des régulateurs de transduction du signal à deux composants, elle présente le domaine receveur ainsi qu'un domaine de liaison à l'ADN du côté C-terminal (Quon *et al.*, 1996). Présenté comme le régulateur clé (Shapiro et Losick, 1997), CtrA est impliqué à la fois dans la synthèse de flagelle, dans l'initiation de la réplication de l'ADN et dans la méthylation de ce dernier. Cette faculté de contrôle sur les étapes essentielles du cycle cellulaire implique que CtrA puisse intégrer les signaux spatiaux et temporels nécessaires à la bonne progression de la division cellulaire (Quon *et al.*, 1996). A ce titre, CtrA joue un rôle plus ou moins similaire à celui de Spo0A chez *B. subtilis*.

Bien que non encore prouvé, il se peut que CtrA agisse, avec DivK et PleC, dans un même système multicomposant de phosphorelais intégrant des informations spatiales et temporelles et permettant la division asymétrique de la bactérie (fig. 20 et fig. 21), (Domian *et al.*, 1996). En effet DivJ, DivK et PleC sont proposés pour agir au sein d'un même système de transduction du signal assurant ainsi le contrôle de la division cellulaire, la formation du pied et la motilité du flagelle. Cependant, les signaux

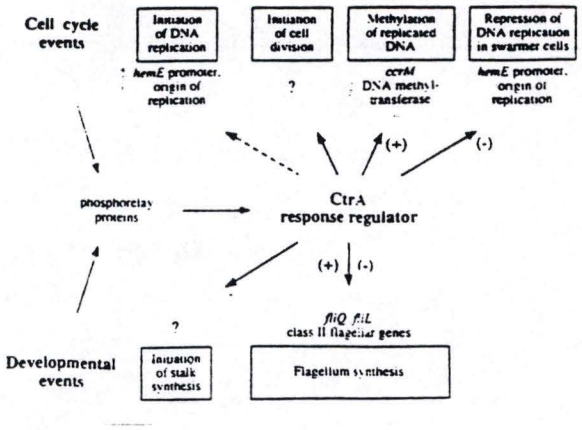


Figure 21 : Présentation des différents rôles connus ou supposés de CtrA dans la régulation et le développement du cycle cellulaire chez *Caulobacter* (Quon *et al.*, 1996).

"input" et "output" de système de transduction n'ont pas encore été identifiés. Dès lors, il se pourrait que ce système de transduction du signal s'exprime au travers de CtrA.

5° Le Genre *Brucella* :

Découverte par Bruce , à Malte, en 1887, la brucellose fait partie des différentes zoonoses, qui, au niveau mondial, aujourd'hui encore possède un impact socio-économique non négligeable. Cet agent pathogène peut se rencontrer chez les animaux domestiques : ruminants, bovins, équidés, canidés, porcins... mais aussi chez différents animaux sauvages tels que le chevreuil, le chamois, le lièvre... Signalons enfin que la transmission à l'homme est possible et est connue sous le nom de "fièvre de Malte".
Le genre *Brucella* comporte six espèces : *B. abortus, B. canis, B. melitensis, B. neotomae, B. ovis* et *B. suis*. Cette classification, bien que sujette à caution par certains auteurs, est basée sur la spécificité d'hôte mais aussi des techniques de laboratoire (typage sérologique, phagiques...).

Le pouvoir pathogène des brucelles varie selon les espèces, mais aussi en fonction de la souche, de l'inoculum, de la sensibilité de l'hôte et de son état physiologique. La période de sensibilité maximale chez les animaux a lieu durant la gestation. Les voies principales de pénétration de l'agent infectieux sont les muqueuses orales ou conjonctives ainsi que les voies respiratoires supérieures.
Les symptômes majeurs, chez le ruminant, sont l'avortement pour la femelle et l'orchite, l'épididymite amenant à la stérilité pour le mâle (Garin-Bastuji, 1993).
Chez l'homme, la brucellose provoque des fièvres intermittentes, des troubles neurologiques et cardiaques et des atteintes ostéo-articulaires. La transmission à l'homme résulte en général d'un contact direct avec des animaux infectés ou par l'ingestion de lait contaminé (Verger,1993).

En raison de l'impact économique de cette zoonose, et du risque pour la santé humaine, d'importants programmes sanitaires ont été mis en place pour lutter contre la brucellose. Ils reposent principalement sur la vaccination et l'élimination des animaux infectés. Actuellement la vaccination génère une réponse humorale très proche de celle engendrée par la souche infectieuse. Dès lors, la différenciation entre animaux infectés et animaux vaccinés, est rendue quasi impossible, ce qui est

incompatible avec l'obligation d'abattage des animaux réagissant aux épreuves du diagnostic sérologique de la brucellose
Des recherches sont en cours pour mettre au point de nouveaux vaccins induisant une réponse sérologique parfaitement identifiable de celle engendrée par une contamination naturelle (Verger,1993).

D'un point de vue phylogénétique, le genre *Brucella* fait partie de la classe des α2-Protéobactériaceae, division ou l'on retrouve aussi *Caulobacter crescentus*.
Coccobacilles dont la taille avoisine le µm, les brucelles sont des bactéries aérobies strictes à croissance optimale à 37°C. Elles sont Gram-négatives, immobiles et asporulées.

Objectifs du travail

Notre travail s'inscrit dans le programme d'étude de la bactérie *Brucella sp.* mené au sein des différents laboratoires de l'URBM et porte plus précisement sur l'étude du système de transduction du signal à deux composants. Considérée encore à l'heure actuelle comme un fléau socio économique, la bactérie responsable de cette zoonose reste relativement peu connue. La caractérisation et l'étude des systèmes de transduction du signal pourraient s'avérer très utile pour comprendre différents mécanismes régissant le fonctionnement de cette bactérie, et pourquoi pas améliorer ainsi nos connaissances sur des mécanismes particulier comme ceux responsables, en autre, de la virulence.

Les objectifs de ce travail sont tout d'abord le clonage chez *B. abortus* d'un régulateur homologue à DivK de *Caulobacter crescentus* et la surproduction de la protéine en vue de réaliser ultérieurement des études sur ses capacités de s'autophosphoryler, de transfert du groupement phosphate et d'interaction avec des partenaires supposés du système de transduction du signal à deux composants de la "voie" BaCtrA.

Afin de mieux comprendre les relations structure - fonction de la protéine, le dernier objectif à atteindre pour ce travail sera d'établir un modèle de la structure tridimensionnelle du régulateur.

Résultats et discussion:

1° Clonage d'un régulateur chez *B. abortus* :

L'objectif premier de cette étape était de cloner un régulateur homologue à DivK de *Caulobacter crescentus* chez *Brucella abortus*. Différentes étapes préliminaires avaient été effectuées prouvant l'existence, chez cette bactérie, d'un tel régulateur du système de transduction du signal à deux composants. Afin de pouvoir cloner ce dernier, une sonde[8] était disponible au laboratoire. Grâce à cette dernière, la technique d'hybridation sur plage de lyse a été utilisée pour cloner la protéine complète.

1.1. Criblage de la banque génomique de Brucella *:*

1.1.1. Présentation générale :

Le criblage de la banque de *B. abortus* exprimée en phage λgt11 (Tibor *et al.*, 1994) a été effectuée au moyen de la sonde marquée à la fluorescéine. Le screening de 13500 plages de lyse a permis d'identifier trois phages positifs. Les divers phages positifs ont subi une première étape de purification : prélèvement du phage positif, infection et puis screening.

1.1.2. Vérification de l'insert :

Après ce premier round de purification, des PCR sur plusieurs plages de lyse positives ont été réalisées pour vérifier si nous disposions de l'insert souhaité. Nous disposions des oligonucléotides[9] D1 et D2 définis préalablement pour la réalisation de la sonde. L'insert que l'on souhaite obtenir permet l'amplification, par PCR, d'un fragment d'une taille de 276

[8] Une description complète des caractéristiques de cette sonde est présentée à l'annexe 1.

[9] La nomenclature D1 et D2 des deux oligonucléotides est expliquée en annexe 1.

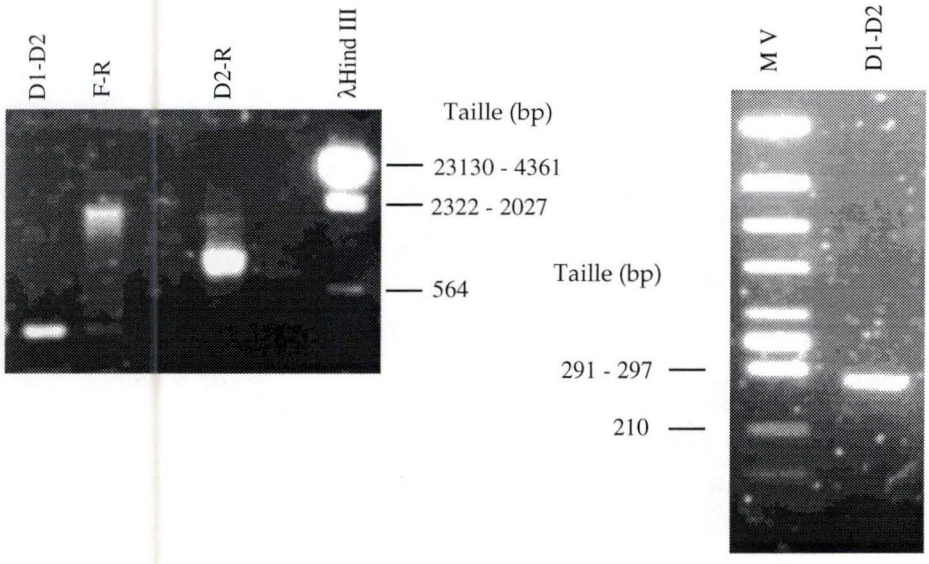


Figure 22 : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification PCR sur plage de lyses positives.
D1 et D2 sont les amorces définies pour la fabrication de la sonde, F et R sont les amorces situées de part et d'autre du site d'insertion de l'ADN du phage. Les marqueurs de taille sont le marqueur V (M V) et le λHind III .
A gauche, électrophorèse sur gel 1,5%, montre l'amplification D1 - D2 sur une plage de lyse positives.
A droite, électrophorèse sur gel 0,8%, montre la taille de l'insert amplifié par les amorces D1 - D2.

paires[10] de bases (fig. 22). Etant donné que les oligonucléotides avaient été définis sur base de DivK de *C. crescentus*, des conditions PCR peu stringentes ont été utilisées afin de permettre l'amplification de ce fragment[11].

Seul le premier phage répondant à ce critère a été purifié complètement. Les autres phages positifs qui ne permettaient pas l'amplification d'un tel fragment ont été abandonnés (fig. 23). En effet, l'absence de la partie amont ou de la partie aval du gène recherché permet toujours une reconnaissance par la sonde lors de l'hybridation ; par contre l'amplification du fragment D1-D2, par PCR, est rendue impossible par manque de site d'hybridation pour une des deux amorces. Dès lors, le fragment d'intérêt n'y est donc sûrement pas complet. Le phage positif a subi d'autres rounds de purification jusqu'à donner 100% de plages de lyse positives

Le phage positif, totalement purifié a ensuite été surproduit en culture liquide. Après lyse des cellules par les phages, ceux-ci sont séparés des débris cellulaires par une étape de centrifugation. Ainsi isolé, les phages sont précipités par addition de polyéthylèneglycol. Récupéré par centrifugation et ultracentrifugation, l'ADN est apte à être utilisé pour les étapes suivantes du travail.

Plus d'un µg du phage contenant le fragment d'intérêt ont ainsi été obtenu.

---

[10] La taille de 276 paires de bases correspond à la longueur du fragment obtenu après amplification PCR, avec les deux oligonucléotides D1 et D2, sur le génomique de *C. crescentus*. Nous savions de part la fabrication de la sonde que l'on pouvait amplifier, à partir du génomique de *B.* abortus et avec D1 et D2, un fragment de taille similaire dont le pourcentage d'identité à DivK de *Caulobacter* était de 68,8%.

[11] Les conditions dans lesquelles on effectue ce type de PCR (quantité d'ADN, pureté de ce dernier...) ne sont pas des plus optimales. Dès lors une absence d'amplification ne signifie pas nécessairement que la cible à amplifier est absente. Plusieurs PCR ont été effectuées sur différentes plages de lyse d'une même culture avant de tirer une quelconque conclusion.

Les cycles de températures que nous avons utilisés sont les mêmes que ceux définis pour l'amplification la réalisation de la sonde.

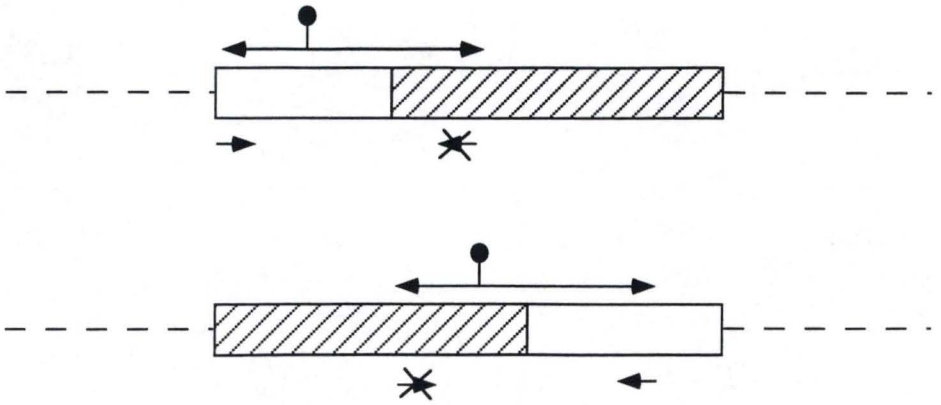


Figure 23 : Représentation schématique de la situation où les plages de lyse sont positives (hybridation de la sonde) mais sur une zone d'intérêt tronquée de l'insert. Dès lors toute amplification PCR est rendue impossible par manque de site d'hybridation pour une des deux amorces. Les amorces D1 et D2 sont représentées respectivement par → et ←. La zone hachurée représente la zone de l'insert en amont ou en aval de la partion délimitée par la séquence recherchée. Les traits — – représentent l'ADN du phage dans lequel est exprimé la banque de *Brucella*. Enfin, la sonde est représentée par :

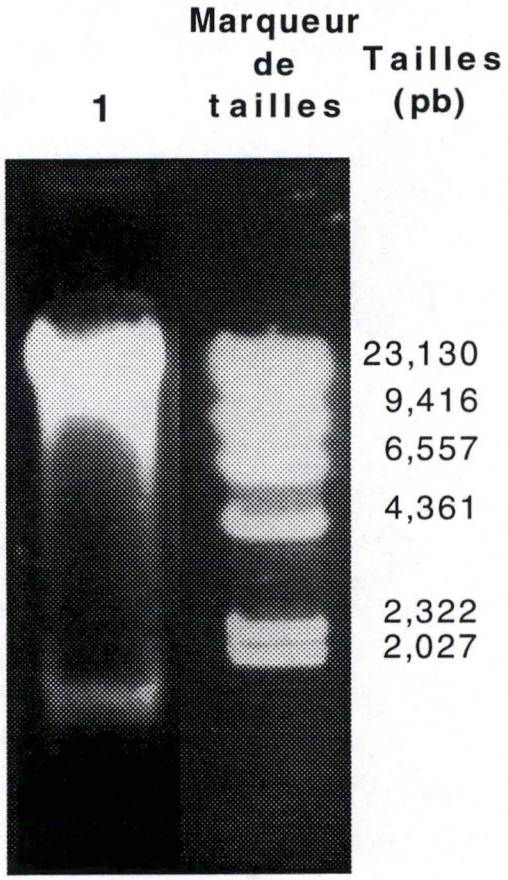


Figure 24: Produit de la restriction *Eco* RI du phage purifié (piste 1). Les bras du vec lGT11 sont visibles dans la partie supérieure du gel. La taille de l'insert a été évaluée alentours de 1500 pb.

1.1.3. Séquençage :

En vue du séquençage, l'insert du phage positif a été cloné dans le plasmide pBluescript KS II - (Stratagène). La banque génomique étant clonée au site site *Eco RI* du phage λgt11, l'ADN du phage positif a été restreint par cette enzyme pour récupérer l'insert. Les produits de la restriction ont été placés sur gel d'agarose (fig. 24) et la bande d'une taille d'environ 1500 paires de bases a été récupérée au moyen du kit Jet SorB. Après la purification nécessaire, la ligation des 50 ng d'insert a été effectuée dans 20 ng de pBluescript KS II - linéarisé par l'enzyme *Eco R1* (fig. 25).

A partir des oligonucléotides D1 et D2 mais aussi Forward et Reverse du plasmide, différentes PCR de séquençage ont été réalisées. Chaque réaction, après purification, a été analysée par le séquenceur automatique ABI PRISM 377.

L'analyse des résultats du séquençage nous a permis de trouver une seule phase ouverte de lecture d'une taille de 369 paires de bases codant pour une protéine de 123 acides aminés. La séquence ainsi obtenue a été soumise à Blast afin de rechercher, dans des banques de données, des séquences homologues. Sans trop de surprise, la séquence obtenue, présentant le plus de similarité est celle du régulateur DivK de *Caulobacter crescentus*[12] . L'alignement de ces deux séquences montre un pourcentage d'identité égal à 78,3% (fig. 26). Enfin, les autres séquences retenues par Blast correspondent à différentes protéines appartenant à la famille des régulateurs de transcription du système de transduction du signal à deux composants.
L'alignement par le logiciel Matchbox permet de retrouver chez DivKBru l'équivalent des 5 principaux résidus conservés chez les différents régulateurs de la famille CheY (fig. 27). Ces résidus sont, chez CheY, trois aspartates, une thréonine et une lysine.

[12] Etant donné le tel pourcentage d'identité entre les deux protéines, nous appelerons désormais DivKBru, pour DivK de *Brucella*, la protéine que nous venons de cloner. Afin de la différencier, la protéine DivK de *Caulobacter* sera, dans la suite de ce travail, dénommée DivKCau.

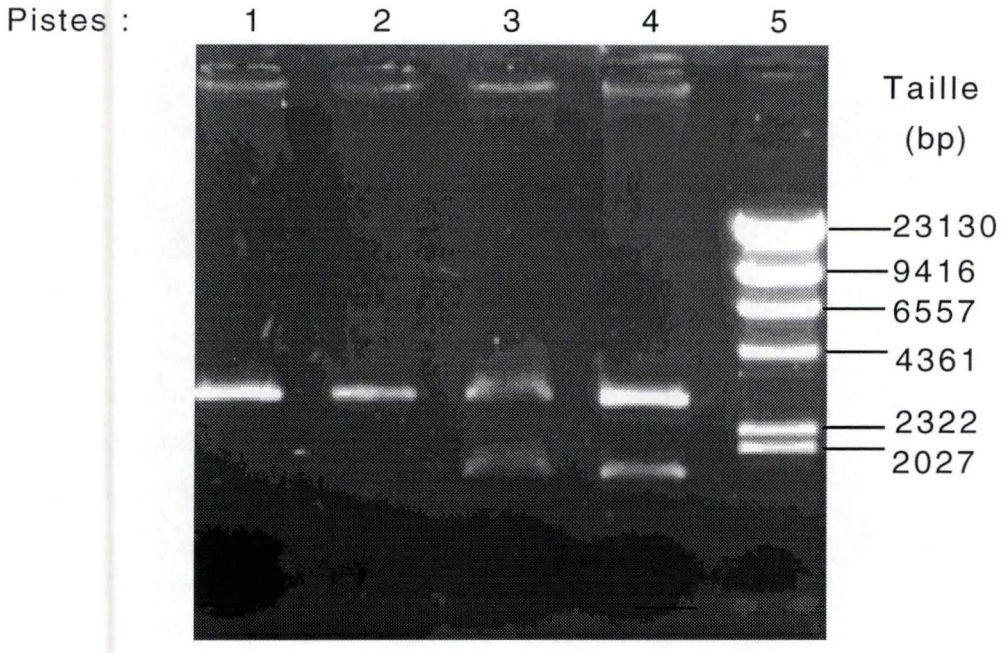


Figure 25 : Vérification de la ligation par restriction *Eco R1* du pKS-*DivKBru*.
Pistes 1 et 2 : matrice linéarisée de +/2900 bp.
Pistes 3 et 4 : matrice avec l'insert de 1400/1500 bp.
Piste 5 marqueurs de taille λhind III

Les résidus homologues aux résidus aspartates formant la poche acide de CheY, D12, D13 et D57 seraient représentés chez DivKBru par E9, D10 et D53 ; T87 et K109 de cheY seraient quant à eux représentés par T83 et K105 chez DivKBru.

```
DivK de Brucella :      MTKSVMIVEDNELNMKLFRDLIEASGYETIRTRSGLEALDLAREHHPDL
                        :::.:.:::::::::::::::.::.::::..:: :: ::..::::..:::
DivK de Caulobacter :   MTKKVLIVEDNELNMKLFHDLLEAQGYETLQTREGLSALSIARENKPDL

ILMDIQLPEVSGLEVTKWLKDDEELRHIPVIAVTAFAMKGDERRIRQGGCEAYISKPISVPRFIETIKSYL
:::::::::.:::::::::::..:: ::::.:::::::::::::.:::.:::::::::::::: .:.:::::  :
ILMDIQLPEISGLEVTKWLKEDDDLAHIPVVAVTAFAMKGDEERIREGGCEAYISKPISVVHFLETIKRLL
```

Figure 26 : Alignement pairé entre DivK de *Brucella abortus* et DivK de *Caulobacter crescentus*. L'alignement montre les 78,3% d'identité entre les deux séquences. Les ":" indiquent les identités parfaites entre deux acides aminés, les "." les similarités.

```
équence de DivKBru.
équence de 3CHY.

--mtksvmivednelnmklfrdlieasgyetir-trsglealdlarehHPdlilmdiqlpevsglevtkw
ADkelkflvvddfstmrrivrnllkelgfnnveEaedgvdalnklqagGYgfvisdwnmpnmdglellkt

lkddeelrhipviavtafamkgderrirqggceayiskpisvprfieTIKSYLGDA--
iradgamsalpvlmvtaeakkeniiaaaqagasgyvvkpftaatleeKLNKIFEKLGM
```

Figure 27 : Alignement entre DivKBru et 3CHY réalisé par le logiciel Matchbox. Les zones grisées présentent les 5 résidus conservés entre les domaines N-terminaux des différents régulateurs.
Les lettres en majuscules correspondent aux acides aminés non alignés par le logiciel.

1.2. Discussion :

Très peu de choses concernant la transduction du signal chez *B. abortus* sont connues. A ce jour, nous disposons d'éléments prouvant l'existence du régulateur BaCtrA (de Fays, 1996) ainsi que du régulateur DivKBru. Malheureusement, au contraire de *C. crescentus*, nous ne disposons d'aucun élément concernant d'éventuelles autres protéines, senseurs ou régulateurs, intervenant dans la transduction du signal chez *Brucella*. Il n'empêche qu'au vu des résultats énoncés ci-dessus, on ne peut s'empêcher de faire la comparaison avec ce que l'on connaît de *C. crescentus*.

Il est possible que *B. abortus* possède aussi un système multicomposant de phosphorelais, mais de nombreuses recherches doivents être encore menées afin de trouver le ou les senseurs et vérifier aussi que BaCtrA et DivKBru agissent dans une même voie de transduction du signal, comme cela a été postulé chez *C. crescentus* (Domian *et al.*, 1996).

La comparaison avec *C. crescentus* doit aussi être nuancée par le fait que *B. abortus* présente un développement morphologique différent que celui de *Caulobacter*. Dès lors, s'il existe un voie de transduction du signal impliquant DivKBru et BaCtrA chez *Brucella*, cette dernière serait impliquée dans des régulations propres à cette bactérie. Par exemple, le tandem DivKBru - BaCtrA pourrait intervenir dans la régulation d'enzymes impliqués dans la topologie et la réparation de l'ADN, mais aussi dans les mécanismes de virulence de cette bactérie...

Le régulateur du système de transduction du signal à deux composants DivKBru ne possède que le domaine receveur, ce qui permet de le classer parmi les différents autres régulateurs de la famille CheY. Les résidus principaux, caractéristiques de systèmes à deux composants, sont retrouvés chez DivKBru.

2° Construction d'un modèle de la protéine DivK :

Après avoir obtenu la séquence du régulateur DivKBru, un modèle de la structure 3D de la protéine a été réalisé. La conception de ce modèle a été réalisée en utilisant le logiciel Modeller. Ce logiciel semble présenter toutes les qualités nécessaire à l'élaboration de modèles (Mosimann *et al.*, 1995 et Dunbrack *et al.*, 1997). L'usage académique est gratuit et relativement aisé. Une caractéristique importante de cette méthode réside dans la possibilité de fixer des restrictions pour la construction des modèles. Les résidus les plus conservés dans les différentes séquences peuvent être fixés, dès lors ces résidus dans le modèle se présentent dans la même conformation que dans la (les) structure(s) de référence. Cette capacité permet la construction automatique d'un modèle en se basant sur les connaissances fonctionnelles des protéines homologues.

2.1. Recherche de protéines homologues de structure connue :

De part son appartenance à la famille CheY, plusieurs structures 3D connues de régulateur homologue à DivK sont disponibles. En effet, la structure tridimensionnelle de CheY ainsi que de plusieurs de ses mutants, a été déterminée par analyse aux rayons X ou par RMN. Les recherches dans la banque de protéines de structures connues (PDB) ont permis d'obtenir plusieurs protéines homologues à DivKBru. Les séquences présentant un score Blast supérieur à cent sont :

- 2CHE, CheY, complexé avec Mg^{++} de *Salmonella thyphimurium.*
- 3CHY, CheY non lié au Mg^{++} (forme apo) d'*E. coli.*
- 1CEY, CheY, complexé avec Mg^{++}, d'*E. coli*, structure déterminée par RMN.
- Ainsi que différentes formes mutantes de CheY (2CHY, 1YMV, 1YMU, 1CYE et 1HEY). Toutes ces structures ont été obtenues par diffraction aux rayons X et toutes proviennent d'*E. coli* sauf 2CHY qui provient de *S. thyphimurium.*.

Les séquences, primaires, de 2CHE et 3CHY sont presque identiques . En effet seuls trois acides aminés diffèrent entre les deux séquences :

- La phénylalanine en position 50 de 2CHE est remplacée par une tyrosine chez 3CHY (F50Y).

- L'isoleucine en position 53 de 2CHE est remplacée par une valine chez 3CHY (I53V).
- Enfin, la sérine en position 75 de 2CHE est remplacée par une glycine chez 3CHY (S75G).

- Les différentes formes mutantes de CheY sont caractérisées par les remplacements de certains acides aminés par d'autres. Quatre de ces formes mutantes ont ainsi de un à trois remplacements. Seul 1HEY présente neuf modifications.

Ces séquences des protéines mutantes de CheY n'ont pas été retenues pour l'élaboration du modèle. En effet, ces dernières sont presque identiques, apportant dès lors une redondance d'information. En utilisant un alignement multiple comprenant ces différentes séquences, le logiciel Modeller considère comme hautement conservé des résidus qui en réalité sont identiques. Le modèle obtenu grâce à un tel alignement serait identique au template.

Pour l'élaboration des alignements en vue de la formation des différents modèles, nous n'avons tenu compte que des séquences de 2CHE et 3CHY. Ces structures possèdent un score Blast le plus élevé, elles proviennent de deux espèces bactériennes différents (*Salmonella* et *Escherischia*), l'une a été cristallisée avec l'ion magnésium, l'autre pas.

```
1  --mtksvmivednelnmklfrdlieasgyetir-trsglealdlarehHPdlilmdiqlpevs
2  ADkelkflvvddfstmrrivrnllkelgfnnveEaedgvdalnklqagGFgfiisdwnmpnmd

1'       BBBBB    HHHHHHHHHHHHH     BBB      HHHHHHHHH     BBBBB
2'        BBBB    HHHHHHHHHHHHHH     BBBB   HHHHHHHHH      BBBBB

        plan I       hélice I      plan II  hélice II    plan III


glevtkwlkddeelrhipviavtafamkgderrirqggceayiskpisvprf---ietiksylgdA
glellktiradsamsalpvlmvtaeakkeniiaaaqagasgyvvkpftaatlEEKlnkifeklgm-

 HHHHHHHHHH       BBBBBB      HHHHHHHHH              HHHHHHHHHHHHHHH
HHHHHHHHHHH        BBBBB     HHHHHHHHH     BBBB     HHHHHHHHHHHHHHH

hélice III       plan IV     hélice IV   plan V       hélice V
```

Figure 28 : Alignement Matchbox entre la séquence de DivKBru (1) et la séquence de 2CHE (2) montrant leurs structures secondaires. Les acides aminés représentés par des lettres majuscules correspondent aux acides aminés non alignés.
Les structures secondaires de DivKBru (1') sont prédites par PHD, celles de 2CHE (2') sont déterminées par DSSP. Les acides aminés appartenant aux hélices a sont représentés par la lettre H, ceux appartenant au plan b par la lettre B. Enfin les structures secondaires sont numérotées de I à V.

Alignement CLUSTAL W :

```
divk        --MTKSVMIVEDNELNMKLFRDLIEASGYETIRTRS-GLEALDLAREHHPDLILMDIQLPEVSGL
2CHE        ADKELKFLVVDDFSTMRRIVRNLLKELGFNNVEEAEDGVDALNKLQAGGFGFIISDWNMPNMDGL
3CHY        ADKELKFLVVDDFSTMRRIVRNLLKELGFNNVEEAEDGVDALNKLQAGGYGFVISDWNMPNMDGL

divk        TKWLKDDEELRHIPVIAVTAFAMKGDERRIRQGGCEAYISKPISVPRFIETIKSYLGDA--
2CHE        LKTIRADSAMSALPVLMVTAEAKKENIIAAAQAGASGYVVKPFTAATLEEKLNKIFEKLGM
3CHY        LKTIRADGAMSALPVLMVTAEAKKENIIAAAQAGASGYVVKPFTAATLEEKLNKIFEKLGM
```

Alignement Matchbox :

```
DivKBru    --mtksvmivednelnmklfrdlieasgyetir-trsglealdlarehHPdlilmdiqlpevsgle
2CHE       ADkelkflvvddfstmrrivrnllkelgfnnveEaedgvdalnklqagGFgfiisdwnmpnmdgle
3CHY       ADkelkflvvddfstmrrivrnllkelgfnnveEaedgvdalnklqagGYgfvisdwnmpnmdgle


DivKBru    tkwlkddeelrhipviavtafamkgderrirqggceayiskpisvprf---ietiksylgdA
2CHE       lktiradsamsalpvlmvtaeakkeniiaaaqagasgyvvkpftaatlEEKlnkifeklgm-
3CHY       lktiradgamsalpvlmvtaeakkeniiaaaqagasgyvvkpftaatlEEKlnkifeklgm-
```

Figure 29 : Alignements entre DivKBru, 2CHE et 3CHY au moyen des deux méthodes. Les résidus conservés entre les domaines N-terminaux des différents régulateurs sont représentés en gras. Les zones grisées montrent les différences dans la position des gaps entre l'alignement Matchbox et l'alignement ClustalW.

2.2. Elaboration du modèle :

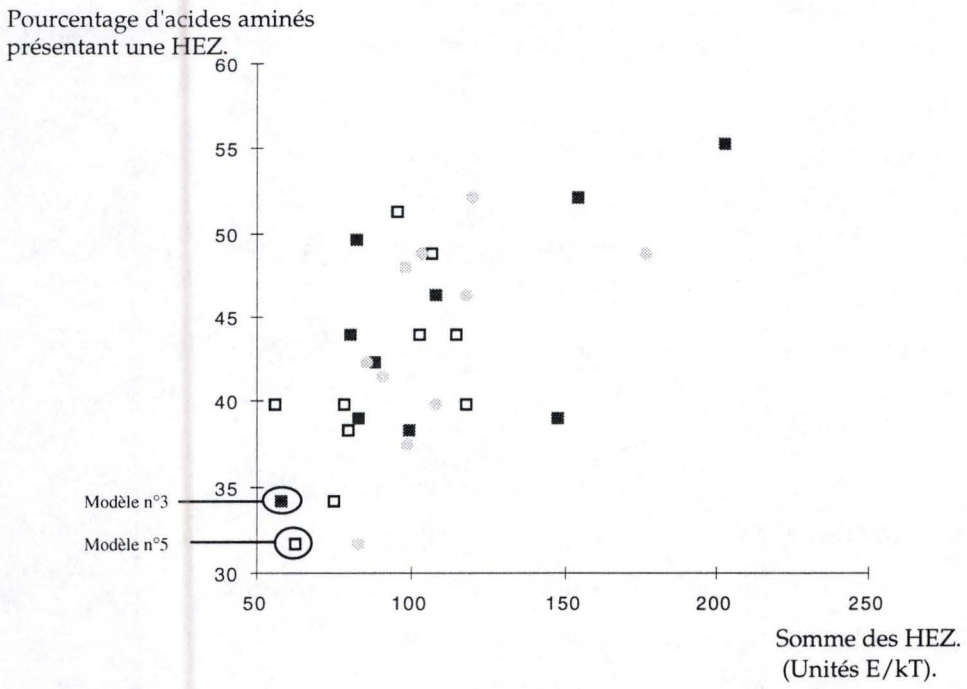
2.2.1 Alignements de séquences :

Pour avoir une première ébauche de la protéine DivKBru, La structure secondaire a été prédite au moyen du logiciel PHD (fig. 28). L'alignement entre la structure secondaire ainsi prédite et celle de 2CHE déterminée par DSSP montre une très bonne correspondance, excepté pour le cinquième plan β de CheY qui ne se retrouve pas dans la prédiction pour DivKBru. Ces résultats montrent que DivKBru partage une distribution et une longueur similaire de ces éléments de structure secondaire avec CheY. Une architecture similaire en 3D semble partagée entre CheY et DivKBru, comme dans la plupart des domaines N-terminaux des autres régulateurs (Stock, *et al.*, 1989).

L'élaboration d'un modèle, au moyen du logiciel Modeller, nécessite un alignement entre la séquence à "modéliser" et une ou plusieurs séquences dont la structure 3D est connue. De la qualité de cet alignement dépendra la qualité du modèle.
L'alignement entre la séquence DivKBru et les séquences de 2CHE et 3CHY a été réalisé au moyen de deux logiciels différents, Matchbox d'un côté et ClustalW de l'autre.
Les résultats ainsi obtenus diffèrent quant à la position et au pattern des gaps comme le montre la figure 29. La divergence principale entre ces alignements réside dans la présence ou l'absence d'un gap au niveau de l'hélice α C-terminale. Ces deux alignements ont été utilisés pour construire des modèles avec Modeller.

2.2.2. Vérification de la qualité des modèles obtenus :

Le logiciel Modeller génère dix modèles à partir de l'alignement entre la séquence de la protéine d'intérêt et la ou les séquences de protéines homologues de structure connue. Les différences entre modèles sont principalement localisées au niveau des loops ainsi que dans la position des chaînes latérales des résidus les moins conservés. Afin de sélectionner le meilleur de ces vingt modèles, ils ont été "testés" au



Légende :

- ■ Modèles générés grâce à l'alignement ClustalW.
- □ Modèles générés grâce à l'alignement modifié.
- Modèles générés grâce à l'alignement Matchbox.

Figure 30 : Comparaison du profil énergétique, obtenu par Anolea, des modèles provenant des différents alignements.

moyen des logiciels Verify 3D et Prosa 4.0. Ces logiciels n'ont pas décelé des zones d'erreurs dans les modèles.
Dans un deuxième temps, ces vingt modèles ont été testés au moyen d'un logiciel plus sensible, Anolea. Cette fois-ci, l'analyse des profils énergétiques a permi de déceler, sur les différents modèles, des zones de haute énergie (HEZ)[13] . Dans l'ensemble, les cinq plans β sont relativement corrects, il y a des zones de haute énergie au niveau des loops ainsi qu'au niveau des différentes hélices α. La présence d'HEZ au niveau des loops est fréquemment observée, même sur des structures obtenues par analyse aux rayons X. En effet, le modèle 3CHY testé par Anolea présente des HEZ au niveau de certains loops. Enfin, une des caractéristiques de ces différents modèles réside dans la présence chez tous, à des degrés divers, de zones de haute énergie dans l'hélice α carboxy-terminale, ce qui pourrait s'expliquer par une erreur d'alignement dans cette zone.

Avant de passer aux étapes plus complexes pour affiner le modèle (minimisation d'énergie et dynamique moléculaire), l'alignement entre les différentes séquences a été modifié en changeant la position des gaps et ce principalement au niveau de la dernière hélice α. Cette modification de l'alignement de séquence au niveau de l'hélice α carboxy-terminale a pour but de trouver un consensus entre les deux alignements de départ afin d'établir une nouvelle série de modèles présentant moins d'HEZ au niveau de cette structure secondaire.
Disposant de deux alignements différents, une comparaison globale des modèles obtenus par Matchbox et ClustalW a été réalisée par analyse des profils énergétiques au moyen du logiciel Anolea (fig. 30). La confrontation entre les différents modèles s'est faite sur base du pourcentage d'acides aminés repris dans les HEZ ainsi que la somme "énergétique" de ces différentes HEZ. Le modèle présentant à la fois le plus faible pourcentage d'acides aminés situés en HEZ et la plus faible somme énergétique s'avère être le modèle trois provenant de l'alignement de ClustalW. Dès lors l'alignement modifié a été réalisé sur base de l'alignement de ClustalW,

[13] Les HEZ sont exprimées en unités E/kT, E est l'énergie en kcal/mole, k la constante de Boltzmann et T la température absolue. Le terme d'énergie pour chaque résidu représente une somme de toutes les énergies d'intéractions atomique de chaque atome.(Melo et Feytmans, 1997).

```
DivKBru         --MTKSVMIVEDNELNMKLFRDLIEASGYETIRTRS-GLEALDLAREHHPDLILMDIQLPEVSGL
2CHE            ADKELKFLVVDDFSTMRRIVRNLLKELGFNNVEEAEDGVDALNKLQAGGFGFIISDWNMPNMDGL
3CHY            ADKELKFLVVDDFSTMRRIVRNLLKELGFNNVEEAEDGVDALNKLQAGGYGFVISDWNMPNMDGL

DivKBru          EVTKWLKDDEELRHIPVIAVTAFAMKGDERRIRQGGCEAYISKPISVPRFIETI-KSY--LGDA
2CHE            ELLKTIRADSAMSALPVLMVTAEAKKENIIAAAQAGASGYVVKPFTAATLEEKLNKIFEKLG-M
3CHY            ELLKTIRADGAMSALPVLMVTAEAKKENIIAAAQAGASGYVVKPFTAATLEEKLNKIFEKLG-M
```

Figure 31 : Alignement modifié entre DivKBru, 2CHE et 3CHY. Réalisé sur base de l'alignement de ClustalW. La zone grisée délimite la partie de l'alignement ayant été modifiée.

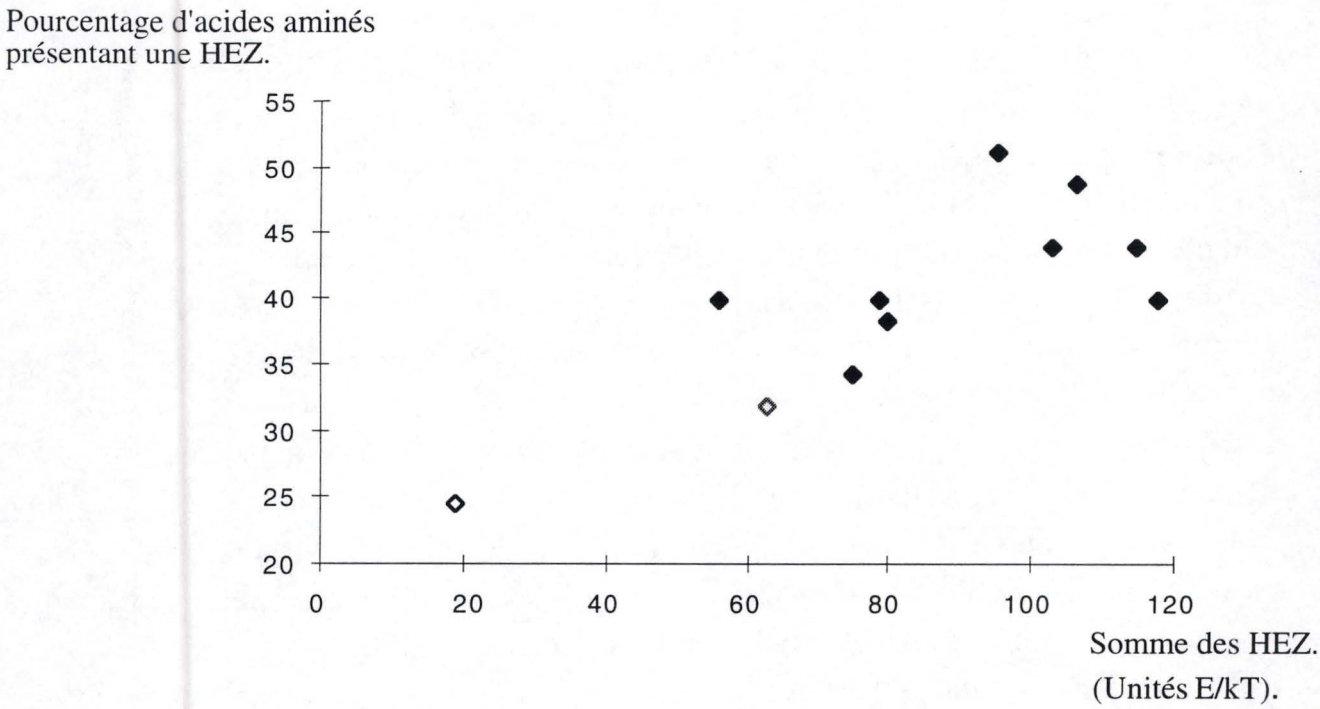


Figure 32 : Comparaison du profil énergétique, obtenu par Anolea, des différents modèles avant et après minimisatio d'énergie. Les losanges pleins représentent les 10 modèles de l'alignement modifié avant minimisation d'

◇ Le modèle 5 avant minimisation d'énergie.

◆ Le modèle 5 après minimisation d'énergie.

excepté la zone correspondant à l'hélice V. La figure 31 présente les modifications réalisées au niveau de l'alignement entre les différentes séquences. Le nouvel alignement a été réalisé pour maximiser les identités en acides aminés. Par rapport aux deux alignements précédent, ce dernier a les lysines, les leucines et les glycines parfaitement alignées, enfin la tyrosine de DivKBru est alignée avec les phénylalanines de CheY. Ce nouvel alignement a permis de générer une nouvelle série de dix modèles via le logiciel Modeller. Après analyse au moyen d'Anolea, on peut constater une amélioration dans la qualité des modèles obtenus, surtout en ce qui concerne l'hélice α C-terminale.

Une comparaison globale des trentes modèles obtenus a été réalisée par analyse des profils énergétiques au moyen du logiciel Anolea (fig. 30). Globalement on constate que les dix modèles générés sur base de l'alignement modifié présentent des profils énergétiques plus favorable que les modèles générés par les alignements Matchbox et ClustalW initiaux.

Le choix du modèle de référence s'est porté sur le modèle 5 de l'alignement modifié, celui-ci présentant à la fois le plus faible pourcentage d'acides aminés situés en HEZ et la plus faible somme énergétique.

2.2.3. Amélioration du modèle :

Un processus de minimisation d'énergie a été effectué sur le modèle 5, sélectionné à partir de l'alignement modifié. Comparé au modèle avant minimisation d'énergie, le modèle ayant subit ce processus présente des différences au niveau de la position des chaînes latérales de certains acides aminés. En effet, certains acides aminés hydrophobes, comme les tyrosines et phénylalanine, présentent des chaînes latérales dirigées plus vers l'intérieur de la protéine.

Après cette minimisation d'énergie, la vérification du modèle a été entreprise avec le logiciel Anolea (fig. 32). Le pourcentage d'acides aminés présentant une HEZ est ainsi passé de 31,71% à 24,39%, la somme de ces HEZ est quant à elle passée de 62,85 à 18,76 unités E/kT. Le tableau 1 montre les acides aminés présentant une HEZ et à quelle structure secondaire ils appartiennent. Les acides aminés des hélices a I et V présentent le plus de HEZ, les acides aminés des trois autres hélices en présentent aussi mais dans une moindre mesure.

Ce modèle aurait pu être encore affiné par un protocole de dynamique moléculaire et de minimisation d'énergie, mais entre temps, de nouvelles données concernant la structure 3D d'un régulateur plus similaire au niveau de la séquence à DivKBru ont été rendues accessibles, ce qui nous a permis de recommencer l'élaboration d'un second modèle.

```
Spo0F     MNEKILIVDDQSGIRILLNEVFNKEGYQTFQAANGLQALDIVTKERPDLVLLDMKI
          :.....::.:.     :. ....  ::.:... .::.::::. ...:::.:.:...
DivKBru   MTKSVMIVEDNELNMKLFRDLIEASGYETIRTRSGLEALDLAREHHPDLILMDIQL

 PGMDGIEILKRMKVIDE--NIRVIIMTAYGELDMIQESKELGALTHFAKPFDIDEIRDAVKKYL
 : ..:.:. : .:   .:   .: :: .:::.     .. .. :  ....::... .. ...:.::
 PEVSGLEVTKWLKDDEELRHIPVIAVTAFAMKGDERRIRQGGCEAYISKPISVPRFIETIKSYL
```

Figure 33 : Alignement pairé entre Spo0F et DivKBru montrant les 29,2% d'identité entre les deux séquences. Les ":" indiquent les identités entre acides aminés, les "." les similarités.

```
Spo0F       MMNEKILIVDDQSGIRILLNEVFNKEGYQTFQAANGLQALDIVTKERPDLVLLDMKIPGMD
DivKBru     -MTKSVMIVEDNELNMKLFRDLIEASGYETIRTRSGLEALDLAREHHPDLILMDIQLPEVS

Spo0F           BBBBB   HHHHHHHHHHHH    BBBBB  HHHHHHHHHH    BBBBB
DivKBru         BBBBB   HHHHHHHHHHHHH    BBB    HHHHHHHHH     BBBBB

                plan I     Hélice I     plan II Hélice II   plan III


    GIEILKRMKVIDE--NIRVIIMTAYGELDMIQESKELGALTHFAKPFDIDEIRDAVKKYLPLKSN
    GLEVTKWLKDDEELRHIPVIAVTAFAMKGDERRIRQGGCEAYISKPISVPRFIETIKSYLGDA--

    HHHHHHHHHHH       BBBBBB    HHHHHHHHHH    BBB    HHHHHHHHHH
     HHHHHHHHHH       BBBBBB     HHHHHHHH            HHHHHHHHHH

      Hélice III     plan IV    Hélice IV    plan V   Hélice V
```

Figure 34 : Alignement ClustalW entre les séquences Spo0F et DivKBru présentant les structures secondaires. La structure secondaire de Spo0F est déterminée par DSSP, celle de DivKBru est prédite par PHD. La lettre H représente les acides aminés localisés dans une hélice a, B représente les acides aminés localisés dans un plan b. Les structures secondaires sont numérotées de I à V.

2.2.4. Recherche de la structure 3D de DivKBru en utilisant Spo0F comme référence :

En cours d'élaboration du modèle, les données concernant la cristallisation de Spo0F, régulateur de transcription chez *Bacillus subtilis*, ont été rendues accessibles sur le réseau internet. Composé d'un seul domaine, ce régulateur appartient aussi à la famille CheY. Les résidus conservés, entre les domaines N-terminaux des différents régulateurs, homologues à D12, D13, D57, T87 et K109 de CheY sont, chez Spo0F : D10, D11, D54, T82 et K104 (Hetch *et al.*, 1995). Une nouvelle recherche des homologues à DivKBru par Blast effectuée dans la banque PDB a montré que la séquence de Spo0F de *Bacillus subtilis* (1SRR) présentait le plus haut score Blast (138). Les autres séquences, des formes mutantes ou non, viennent ensuite avec des scores Blast de 103 à 101. Suite à ces résultats, un alignement entre la séquence de DivKBru et celle de Spo0F a été réalisé (fig. 33) montrant un pourcentage d'identité plus élevé que celui obtenu entre DivKBru et 3CHY ; de 25% d'identité on passe avec le nouvel alignement à 29,2%.
L'alignement des structures secondaires entre d'une part celle de Spo0F déterminée par DSSP et d'autre part celle prédite sur DivKBru par PHD montre une bonne corrélation (fig. 34).

Enfin, avant de se lancer dans une nouvelle procédure d'élaboration de la structure 3D de DivKBru au moyen de Spo0F, les différences entre les structures tridimensionnelles de CheY et de Spo0F ont été analisées afin de vérifier quel serait l'apport de la nouvelle structure Spo0F pour la réalisation du modèle de DivKBru. Ces différences ont été visualisées en superposant les deux structures templates. Nous avons pu constater que les plus grandes variations entre les deux structures de référence provenaient principalement de la position de la première et de la dernière hélice α (fig. 35). Dans notre premier modèle, après minimisation d'énergie, ces deux régions présentaient différentes HEZ, une nouvelle procédure de modélisation de DivKBru, mais cette fois-ci en tenant compte de Spo0F comme structure de référence, a été entreprise.

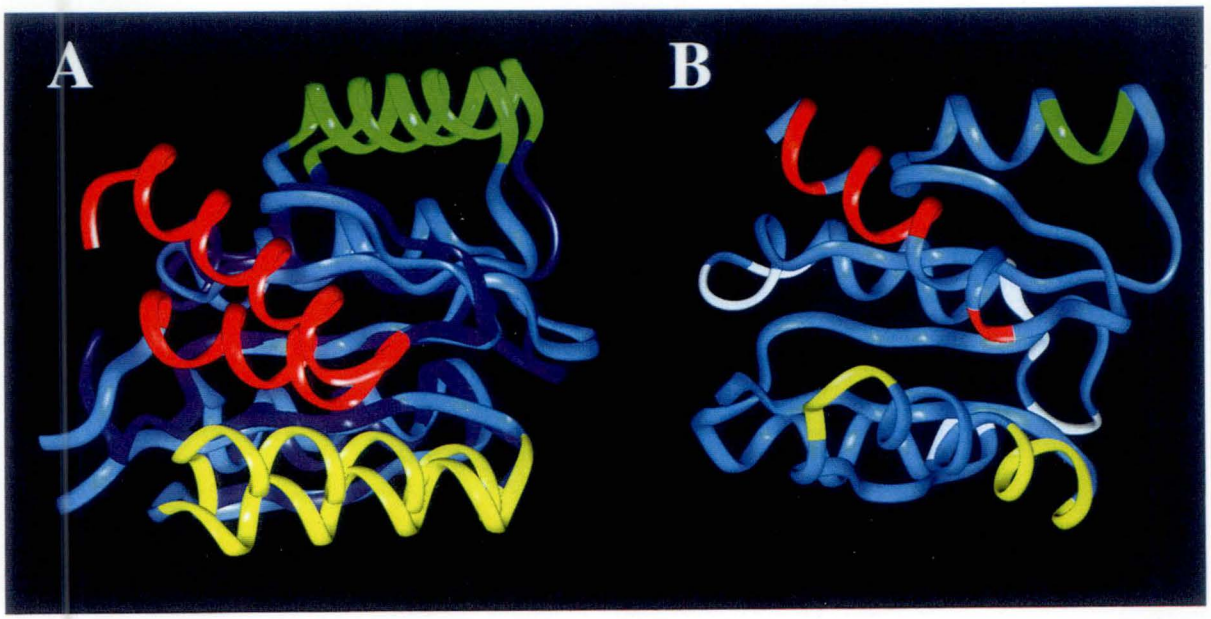


Figure 35 : A : Superposition de 3CHY et de 1SRR (Spo0F de *Bacillus subtilis*). En jaune représentation de l'hélice I, en vert de l'hélice IV et en rouge de l'hélice V. Ces trois hélices présentent des différences de conformation, surtout pour la I et la V. La figure B présente le modèle obtenu, après minimisation d'énergie, sur base de l'alignement modifiée entre DivKBru, 2CHE et 3CHY. Les résidus présentant une HEZ sont représentés en jaune pour ceux de l'hélice I, en vert pour ceux de la III et en rouge pour ceux de l'hélice V. Les résidus présentant une HEZ dans les loops sont représentés en blanc.

```
Spo0F      MMNEKILIV**DD**QSGIRILLNEVFNKEGYQTFQAANGLQALDIVTKERPDLVLL**D**MKIPGMDGIEIL
DivKBru    -MTKSVMIV**ED**NELNMKLFRDLIEASGYETIRTRSGLEALDLAREHHPDLILM**D**IQLPEVSGLEVT

Spo0F      KRMKVIDEN--IRVIIM**T**AYGELDMIQESKELGALTHFA**K**PFDIDEIRDAVKKYLPLKSN
DivKBru    KWLKDDEELRHIPVIAV**T**AFAMKGDERRIRQGGCEAYIS**K**PISVPRFIETIKSYLGDA--
```

Figure 36 : Alignement ClustalW entre DivKBru et Spo0F. Les 5 résidus conservés dans les différents domaines N-terminaux des différents régulateurs sont représentés en gras.

2.2.5. Elaboration du second modèle :

Pour élaborer ce second modèle, lune procédure similaire à la précédente à été utilisée. L'alignement réalisé par ClustalW (fig. 36) a été soumis à Modeller pour établir dix modèles. Ces derniers ont ensuite été soumis à Anolea et leur profil énergétique comparé (fig. 37). Selon les mêmes critères que précédemment, le modèle numéro 4 a été sélectionné comme étant le modèle de référence. Avec ce dernier, une minimisation d'énergie a été effectué selon les mêmes caractéristiques choisies précédemment (cfr. matériel et méthode).

L'analyse des profils énergétiques révèle que, avant minimisation de son énergie, le modèle 4 présentait 32,52% d'acides aminés repris dans une HEZ et la somme de ces dernières était de 53,13 unités E/kT. Après minimisation seulement 5,59% des acides aminés de ce modèle sont repris dans une HEZ et pour une somme de 3,066 unités E/kT. De plus, les 7 acides aminés présentant une HEZ sont tous situés au niveau des loops (fig. 38). La comparaison entre les modèles avant et après minimisation d'énergie, présente relativement peu de différences visibles à trois dimensions. Ces différences sont principalement présentes au niveau de la conformation des chaînes latérales de quelques acides aminés.
Comme on peut le constater, ce second modèle présente un meilleur profil énergétique que celui établi à partir des structures 2CHE et 3CHY.

La modèle de la protéine DivKBru (fig. 39) montre que ce régulateur possède, comme les domaines N-terminaux des autres régulateurs, une zone centrale composée de 5 plans β entourée de 5 hélices α (Stock *et al.*, 1989).

2.2.6. Comparaison entre le modèle et le template Spo0F :

La visualisation des différence entre le modèle DivKBru et la structure de Spo0F s'est faite par superposition des structures 3D. Les nombreuses variations se retrouvent principalement niveau de la position des chaînes latérales des différents acides aminés commun aux deux structures. Par contre, la superposition des backbones des deux structures se fait facilement sauf à un ou deux endroit(s) où il y a de légères

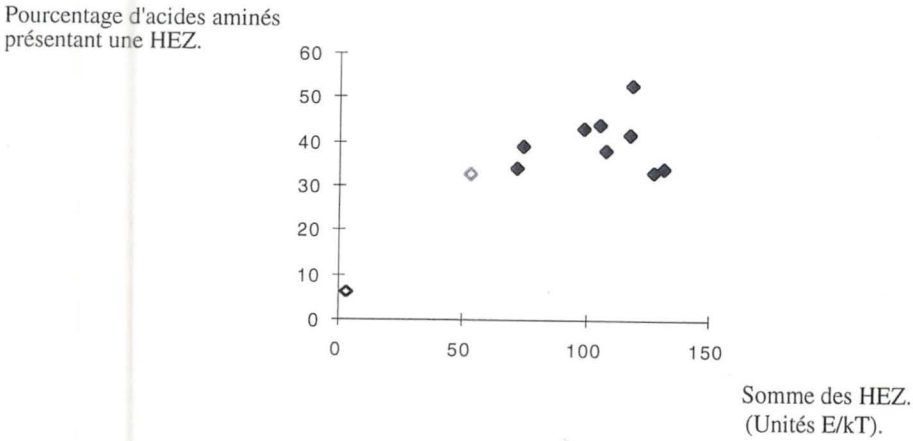


Figure 37: Comparaison du profil énergétique, obtenu par Anolea, des différents modèles avant et après minimisation d'énergie. Les losanges pleins représentent les 10 modèles de l'alignement entre DivKBru et Spo0F avant minimisation d'énergie.

◇ Le modèle 4 avant minimisation d'énergie.

◆ Le modèle 4 après minimisation d'énergie.

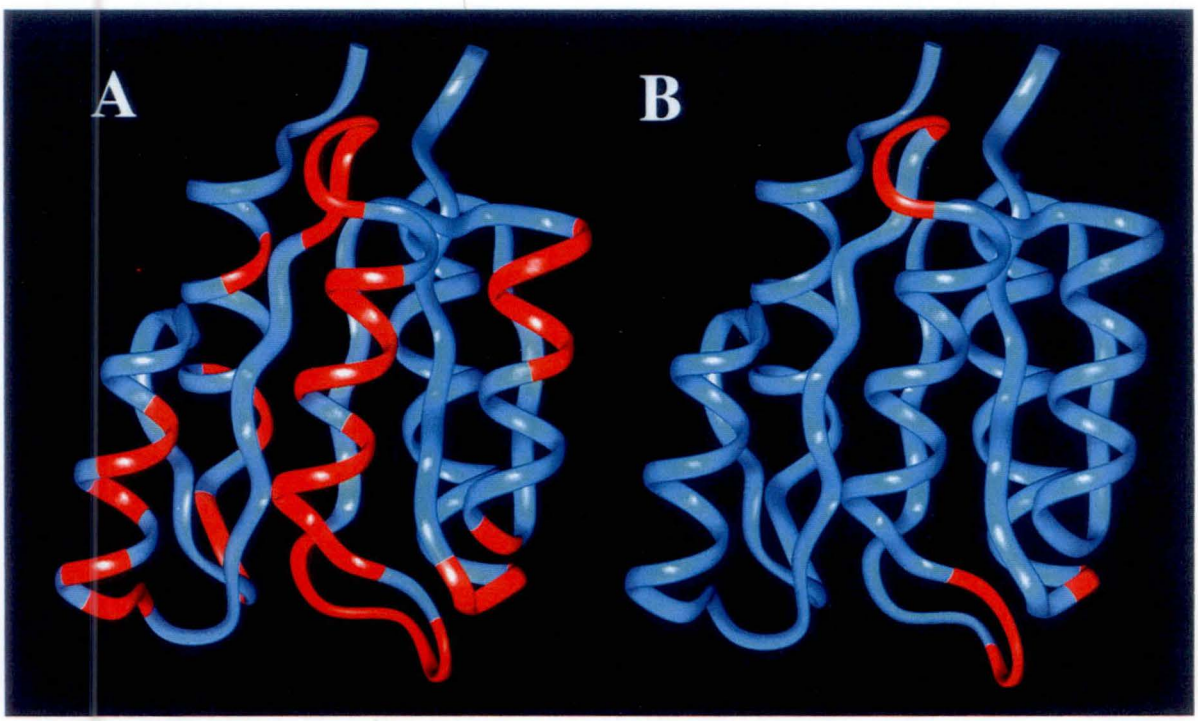


Figure 38 : Représentation des HEZ (en rouge) du modèle 4 élaboré a partir l'alignement entre DivKBru et Spo0F. En A, représentation du modèle avant le processus de minimisation d'énergie, en B le même modèle après avoir effectué le processus de minimisation d'énergie.

différences. Dans l'ensemble, ces deux structures tertiaires sont très proches (fig. 40).

Les cinq résidus conservés présentent, entre les deux structures 3D, une conformation similaire. La superposition du modèle et de la structure de référence (Spo0F) de la figure 40, montre la conformation des chaînes latérales des résidus conservés. On constate que la lysine conservée (K105) du modèle de DivKBru adopte une conformation différente de celle de Spo0F (K104). Cette différence de conformation s'explique probablement par le remplacement du résidu aspartate (D10) de Spo0F par un glutamate (E9) chez DivKBru qui interagit avec la K105.

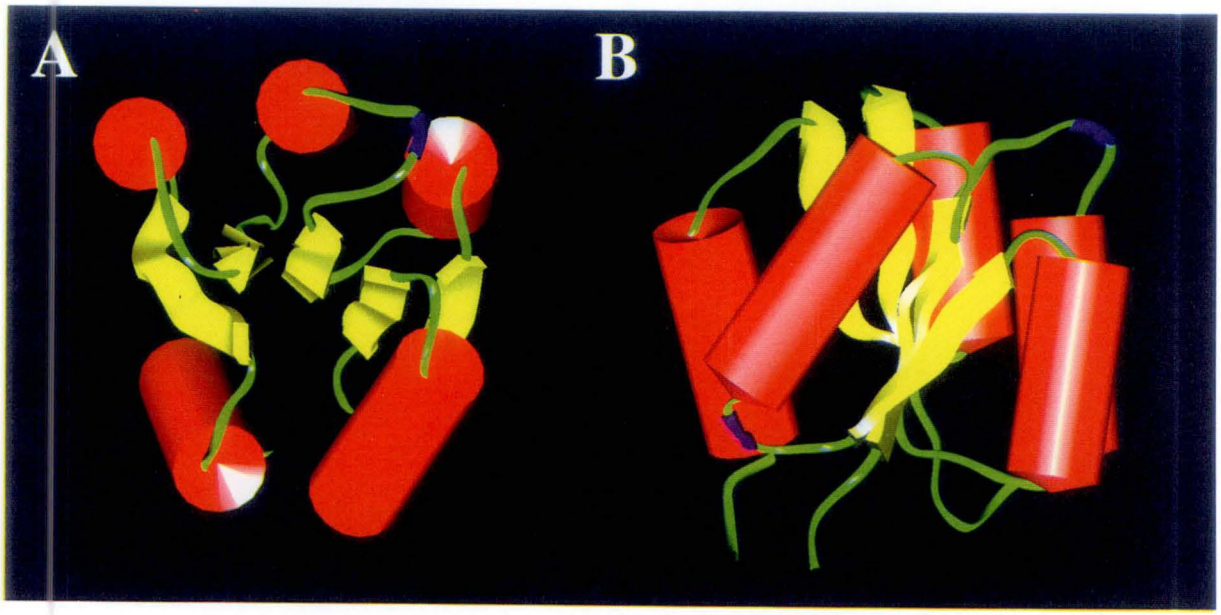


Figure 39 : Représentation du modèle de DivKBru. Les hélices α sont représentées par les cylindres rouges et les plans β par les flèches jaunes. Le reste représente les loops.

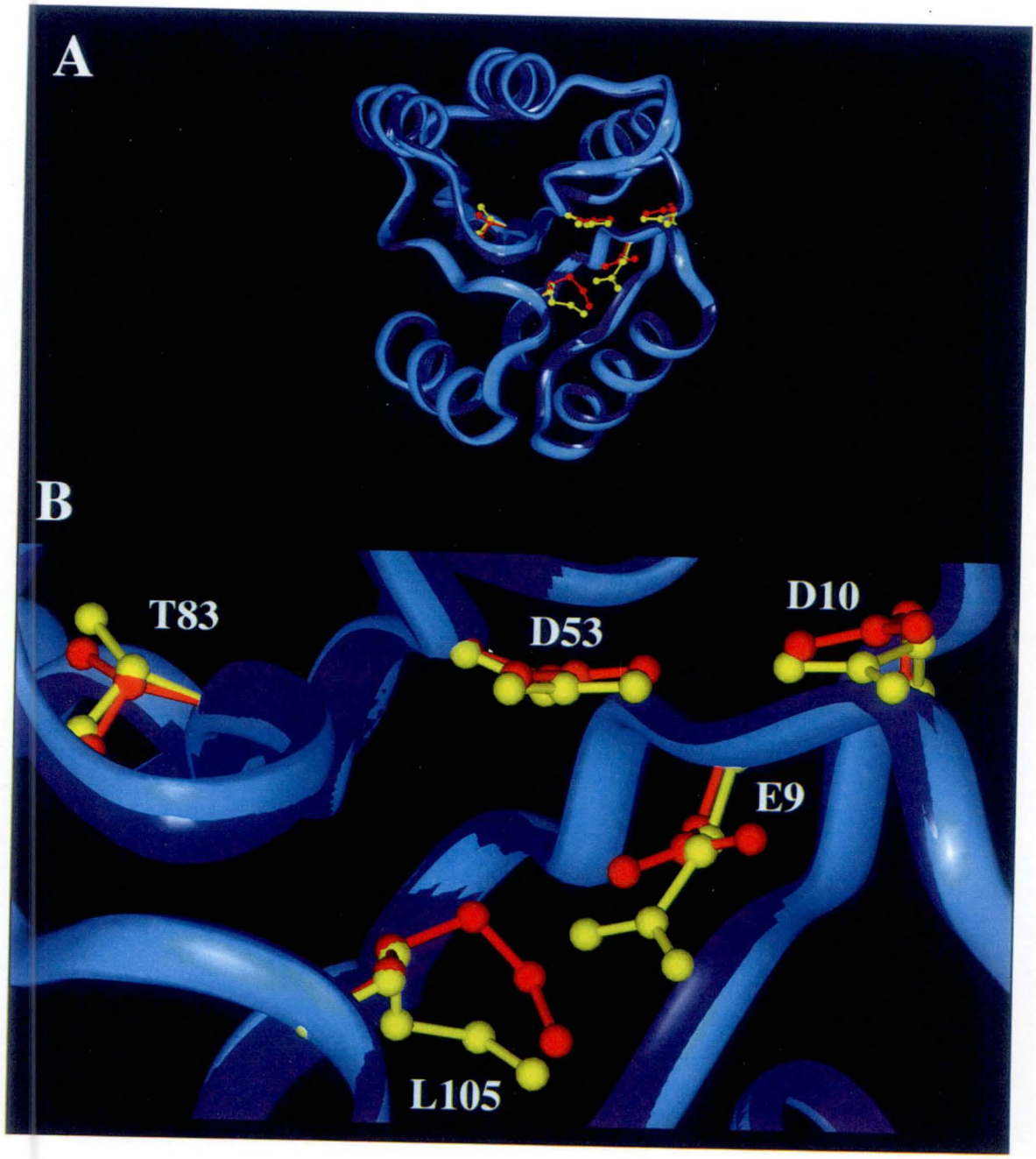


Figure 40 : Superposition du modèle et de la structure 1SSR avec représentation des carbones alphas et des chaînes latérales des cinq résidus conservés entre les domaines N-terminaux des différents régulateurs. Les résidus conservés (E9, D10, D53, T83 et K105) du modèle de DivKBru sont représentés en jaune. En rouge, sont représentés les résidus conservés de Spo0F (D10, D11, D54, T82 et K104).
En A, présentation d'une vue générale. La figure B montre en détail la superposition de ces résidus.

2.3. Discussions :

La protéine clonée appartient à la famille CheY des régulateurs de transduction du signal des systèmes à deux composants. Comme CheY, DivKBru présente probablement un repliement α/β. Les plans β sont disposés au centre de la protéine tandis que les hélices α sont disposées en périphérie. Parmi les cinq résidus conservés au sein de cette famille de protéines, E9, D10 et D53 (résidus déterminés comme participant à la formation de la poche acide), se retrouvent dans une conformation proche de celle adoptée par les résidus homologues chez CheY. Les deux autres, T83 et K105 se retrouvent aussi localisés dans une conformation proche de celle adoptée par les résidus homologues chez CheY.

Le résultat obtenu est une première ébauche dans la réalisation de la modélisation de la protéine DivKBru. En effet, ne disposant pas de données expérimentales concernant, par exemple, des zones d'interaction de cette protéine avec une autre, aucune restriction n'a été appliquée lors de la formation du modèle. Lorsque l'on aura déterminé les résidus intervenant dans de telles interactions, le modèle pourra être refait en appliquant par exemple, des restrictions quant à la minimisation d'énergie de ces résidus. Les modèles ainsi obtenus permettront probablement d'avoir une représentation plus adéquate de la structure 3D de cette protéine.

Il n'empêche, que même perfectible, la réalisation est tout à fait suffisante pour servir de modèle de la protéine DivKBru lors des études ultérieures d'interaction entre protéines du système de transduction du signal.

Oligonucléotides :

DivKExpUp 5'-**AAC-ATA**-TGA-CGA-AAA-GCG-TAA-TGA-T-3'
Nde 1

DivKExpDown 5'-GGA-TCC-TAG-GCA-TCG-CCC-AGA-TA-3'
Bam H1

Figure 41 : Séquence des deux amorces définies sur la séquence *DivKBru.* pour le clonage dans le vect pET-15b. Les sites de restriction des enzymes sont soulignés, en gras la portion de l'amorce ne s'hybrid pas.

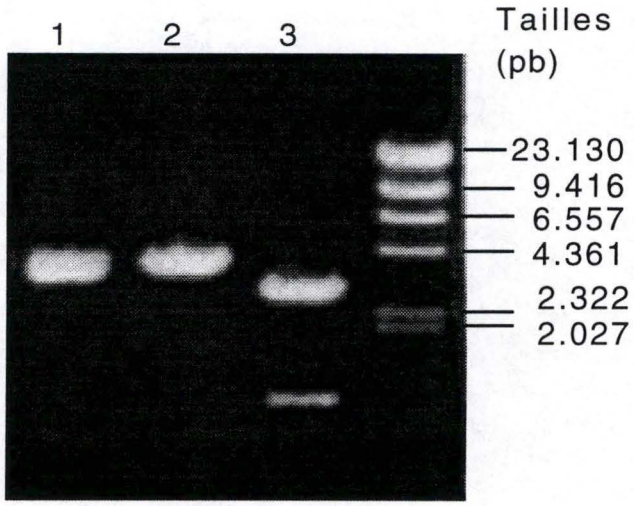


Figure 42 : Restriction du plasmide pGEM-T/DivK par les enzymes de restriction*Nde* I (1), *Bam* HI (2) et *Pvu* II (3). La bande de 410 pb pour la restriction *Nde* I n'est pas visible sur cette photo.

3° Surproduction de la protéine DivK :

3.1. Introduction :

La premiere étape dans l'étude de l'interaction entre partenaires du système de transduction du signal à deux composants chez de *B. abortus*, est la surproduction des protéines concernées. Nous avons donc réalisé cette surproduction pour la protéine que nous avons cloné, DivKBru. La technique utilisée par le laboratoire consiste à cloner le gène de la protéine, que l'on souhaite surproduire, dans le vecteur pET-15b.

3.2. Etapes préliminaires :

3.2.1. Définir deux nouveaux oligonucléotides :

Le site d'insertion dans le vecteur pET 15b est bordé des sites de restriction *Nde 1* et *Bam H1*. Afin de pouvoir cloner l'insert dans ce vecteur, nous devons donc disposer d'un insert bordé de ces deux sites de restriction. Dès lors, deux nouveaux oligonucléotides ont été défini sur les extrémités amont et aval de la séquence de notre protéine (fig. 41) ; l'amorce amont possédant le site de restriction *Nde 1* tandis que l'aval possède lui le site *Bam H1*.

Le site de restriction de l'enzyme *Nde 1* étant CATATG, nous avons déterminé la séquence de notre amorece amont sorte que l'ATG du début de la séquence nucléotidique de DivKBru corresponde à l'ATG du site de restriction de l'enzyme de restriction *Nde 1*.
L'enzyme *Nde 1* nécessitant un site bordé de part et d'autre par une dizaine de paires de bases pour réaliser la restriction, une étape intermédiaire est nécessaire avant de cloner l'insert dans le pET 15b . Cette étape consiste à cloner l'insert dans un autre vecteur pour pouvoir le restreindre au moyen des deux enzymes en question.

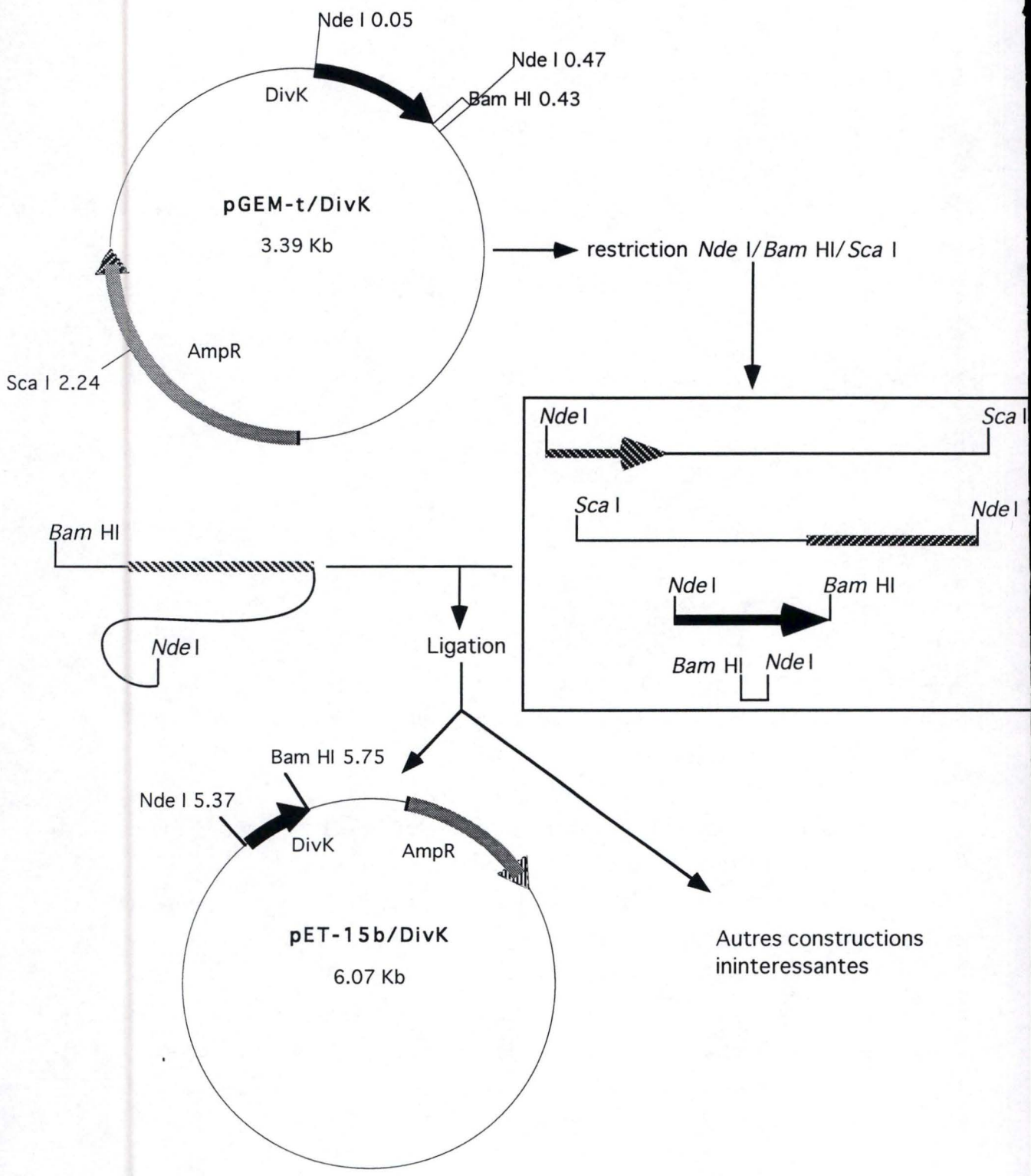


Figure 43: Représentation schématique de la stratégie employée pour cloner le géne de *DivkBru* dans le pET-15b. Seuls les sites d'intéret sont représentés.

3.2.2. Passage par un vecteur intermédiaire :

Pour réaliser cette étape intermédiaire, le choix du vecteur s'est porté sur le pGEM-T. Ce plasmide permet de réaliser facilement le clonage d'une séquence amplifiée par PCR au moyen de la Dynazyme (polymérase), cfr. matériel et méthode.
L'amplification sur le génomique de *Brucella abortus* a été réalisée avec les amorces définies précédemment. Le produit PCR contenant le gène *DivKBru* bordé des sites de restriction *Bam H1* et *Nde 1* a été purifié avant d'être ligué dans le vecteur. 70 ng de produit PCR ligué à 50 ng de pGEM-T ont été transformés par des *E. coli* XL1 Blue compétentes.

Nous avons effectué une vérification des transformants par analyse de différents profils de restriction. En effet, connaissant la séquence de l'insert ligué mais aussi celle du vecteur, nous avons choisi de faire les restrictions *Bam H1, Nde 1* et *Pvu II*. La restriction *Nde 1* du plasmide génère un fragment d'une taille de 2876 et un de 410. Celle par*PVU II*, donne des fragments de 2566 et 820 et enfin, *BamH 1* linéarise le plasmide (une bande de 3386) (fig. 42).

3.2.3. Clonage du gène *Divkbru* dans le pET-15b :

Afin de permettre le clonage du gène d'intérêt dans le pET-15b, nous avons restreint le plasmide pGEM-T/*DivKBru* par les endonucléases de restriction *Nde* I et *Bam* HI, en vue de libérer l'insert contenant l'ORF de *DivKBru*. Afin d'éviter que la matrice du pGEM-T ne puisse également se liguer dans le vecteur suivant, le pET-15b, celle-ci a été restreinte par l'enzyme Sca I qui ne coupe qu'en un site unique sur le plasmide pGEM-T/*DivKBru* (fig. 43).

200 ng de pGEM-T/Divk ont ainsi été restreint par l'enzyme *Nde* I. Le produit de restriction a alors été précipité pour permettre de changer le tampon de restriction, et une double restriction *Bam* HI, *Sca* I a été réalisée. Le produit final, triplement restreint, a été purifié des enzymes de restriction par précipitation au phénol/chloroforme et lavé par

a)

	Eco RV	*Pvu* II
pET-15b/DivK	4229 1842	4476 1502 93
pET-15b/petit fragment	4429 1504	4138 1502 93

b)

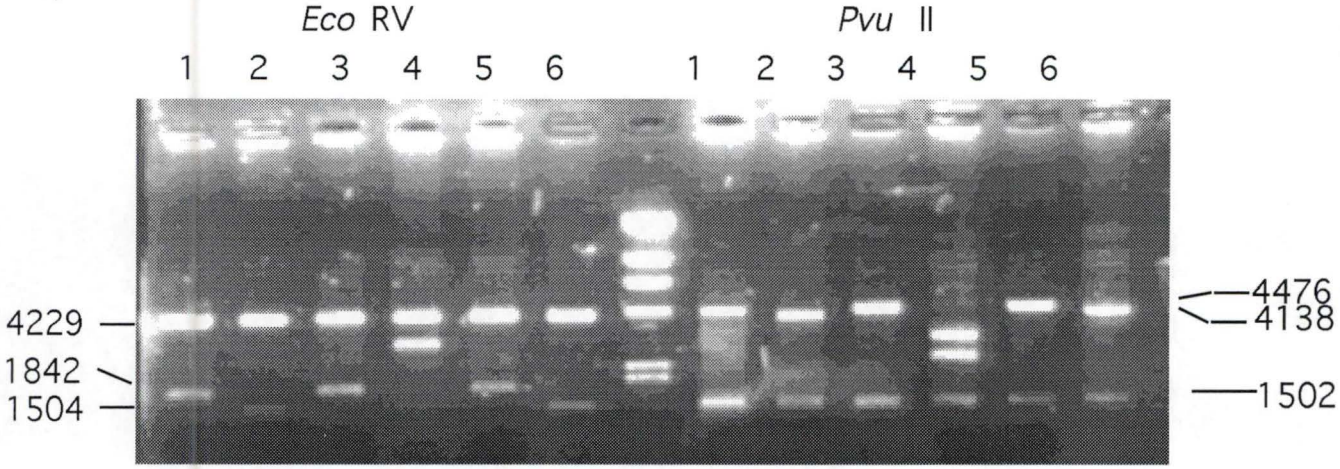


Figure 44: a) tableau récapitulatif reprennant les tailles théoriques des restrictions des deux plasmides principaux par les enzymes *Eco* RV et *Pvu* II (en paires de bases) obtenus lors de la ligation du gène *DivK* dans le pET-15b. b) Electrophorèse en gel d'agarose des 6 des 20 plasmides screenés restreints par les enzymes cités ci-dessus. Les plasmides présentants les profils attendus sont les plasmides 1, 3 et 5.

précipitation à l'éthanol. La totalité de ce produit (environ 100 ng) a ensuite été ligué dans 50 ng de pET-15b ouvert par les enzymes *Nde* I et *Bam* HI et utilisé pour transformer des cellules *E. coli* XL1-Blue. Des différents fragments générés par ces restrictions, deux sont limités par les sites *Nde* I et *Bam* HI et ont donc la plus grande probabilité de se liguer avec la matrice du pGEM-T (fig. 43). L'insertion du plus petit fragment dans le pET-15b donne génère des fragments de 4229 et 1504 pb lors d'une restriction *Eco* RV et de 4138, 1502 et 93 pb lors d'une restriction *Pvu* II (fig. 44). L'insertion de l'autre fragment, celui qui contient le gène de *Divkbru*, génère quant à lui des fragments de 4229 et 1842 avec l'enzyme *Eco* RV et de 4476, 1502 et 93 avec *Pvu* II. Sur 20 transformants vérifiés par analyse des profils de restriction *Eco* RV et *Pvu* II, 7 présentaient le profil correspondant à l'insertion du petit fragment dans le pET-15b et 4 possédaient le profil de restriction recherché.

3.2.4. Surproduction de la protéine DivkBru :

50 ng du plasmide pET-15b contenant le gène de DivkBru ont été utilisé pour transformer des cellules BL21 DE3, souche de production, cfr. matériel et méthode. Les transformants obtenus ont permis la surproduction de la protéine clonés. Une préculture ayant servit à inoculer 56 ml de milieu LB, lorsqu'une D.O.à 600 nm de 0,6 a été atteinte, l'addition d'1 mM d'IPTG a permit d'induire la surproduction. Toutes les heures, 500 µl de culture ont été prélevé jusqu'à la quatrième heure. 20 µl de ces prélèvements ont été déposé sur gel de polyacrylamide 15%. Après quatre heures d'induction, le pourcentage de protéine Divk par rapport au total protéique a été estimé aux alentours de 10% (fig. 45).

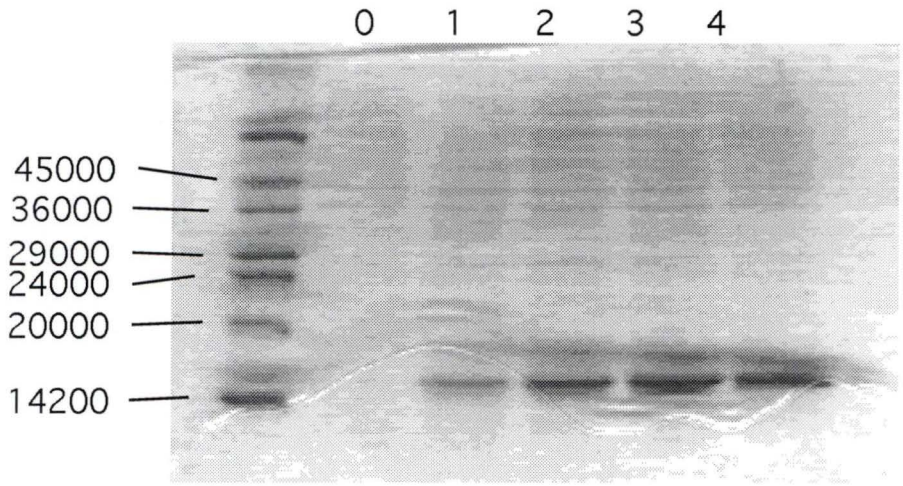


Figure 45: Electrophorèse en gel de polyacrylamide des prélèvements de cultures de BL21 DE3 contenant le plasmide pET-15b/DivK avant (0) et après une (1), deux (2), trois (3) et quatres (4) heures d'induction .

3.3. Discussions :

La derniére étape de notre travail a été atteinte. Avec un pourcentage de protéine exprimée d'au moins 10% par rapport aux protéines totales, il faudrait actuellement déterminer la fraction soluble de cette surexpression et l'optimaliser par des essais à différentes températures.

Cette protéine purifiée pourra alors être utilisée pour l'étude de l'interaction de DivK avec ses partenaires.

Annexe 1 : Réalisation d'une sonde "DivK".

Dans le cadre des recherches menées au sein de notre laboratoire sur l'étude de l'interaction entre composants du système de transduction du signal, le régulateur BaCtrA de *Brucella abortus* avait déjà été cloné (de Fays, 1996). La proximité phylogénétique entre *Caulobacter crescentus* et *Brucella abortus*, ainsi que la présence de BaCtra nous a poussé, chez cette dernière, à rechercher les autres composants connus du système du transduction signal de *C. crescentus*.

Au départ de la séquence de DivK de *C. crescentus* (Hetch *et al.*, 1995), nous avons définis deux oligonucléotides, D1 et D2. Le premier a été défini sur l'extrémité amont de la séquence, le deuxième, 276 paires de bases en aval. (D1 : 5'-ATG ACG AAG GTC CTC ATG GTG G-3' ; D2 : 5'-CTC CTC ATC CCC CTT CAT GGC -3').

Cette zone présente plusieurs critères nécessaires à la formation de la sonde :

- permettre l'amplification d'un fragment de taille suffisante,
- être dans une zone où la séquence est la plus conservée,
- et enfin présenter une dégérénescence du côde génétique la plus faible possible.

Par PCR et dans des conditions peu stringentes, il a été possible d'amplifier, au moyen de ces deux oligonucléotides, un fragment de taille correspondante sur le génomique de *B. abortus*. Ces résultats préliminaires prouvant l'existence d'un régulateur homologue à DivK de *C. crescentus* nous ont encouragé à poursuivre nos manipulations en vue de cloner ce gène. Pour ce faire une sonde a été réalisée à partir du fragment amplifié sur le génomique de *B. abortus*.

Cette sonde a été séquencée, ce qui a permis de montrer que le fragment amplifié possède 68,8% d'identité avec le fragment de taille similaire amplifié sur *C. crescentus*.

Conclusion et Perspectives

Nous avons cloné, chez *Brucella abortus*, une protéine homologue à DivK, régulateur du système de transduction du signal à deux composants de *Caulobacter crescentus*. D'une taille de 123 acides aminés et partageant 78,3% d'identité avec DivK de *Caulobacter crescentus* ce régulateur est appelé DivKBru. Contrairement à la plupart des régularteurs connus, DivKBru n'est composé que d'un seul domaine, le domaine accepteur de phosphate aussi appelé domaine receveur. De part cette particularité, cette protéine se classe parmi les régulateurs de la famille CheY, protéine avec qui elle partage 25% d'identité.
Les cinq résidus conservés au travers des domaines receveurs des différents régulateurs se retrouvent également chez DivKBru. La poche acide est formée par les résidus E9, D10 et D53, la T83 et la K105 complètent ce groupe de résidus conservés.

Les connaissances actuelles concernant le système de transduction du signal à deux composants chez *Brucella* sont limitées à la présence d'un autre régulateur, BaCtrA partageant 80,5% avec la protéine CtrA de *C. crescentus* (de Fays, 1996).

Dans l'avenir, il serait important de rechercher les autres composants du système de transduction du signal. En se basant sur ce que l'on connaît de *C. crescentus* et en employant la même méthode que celle utililisée pour le clonage de DivKBru, ou bien des méthodes plus performantes (système du double hybride, Bialight...), on pourrait se focaliser sur la recherche, chez *Brucella*, de senseurs homologues à PleC ou à DivJ de *C. crescentus*, ainsi que tout autres protéines interagissant avec les deux régulateurs connus. Lorsque les protéines interagissants avec le régulateur DivK seront connues, l'on pourra réaliser des mutations dirigées afin de cibler les résidus important de DivKBru, par exemple ceux permettant l'interaction avec une autre protéine.
Brucella, bien que proche d'un point vue phylogénétique, développe des caractéristiques morphologiques différentes de celles de *C. crescentus*. Parallèlement à la recherche d'autres composants du système de

transduction du signal, il est important de caractériser les fonctions propres de BaCtrA et de DivKBru, de voir si ces deux régulateurs agissent au sein d'une même voie de transduction du signal et enfin vérifier la présence ou l'absence d'interaction entre ces deux protéines.

Nous avons élaboré un modèle de la structure tridimensionnelle de la protéine DivKBru. Pour le réaliser, nous avons choisi d'utiliser le logiciel Modeller. A partir d'un alignement entre la séquence dont on veut connaître la structure 3D et une ou plusieurs séquence(s) de protéine homologue dont les structures tridimensionnelles sont connues, ce logiciel génère des modèles. L'utilisation d'un logiciel, analysant le potentiel d'énergie au niveau atomique, nous a permis d'évaluer chaque modèle obtenu et d'affiner le meilleur d'entre eux par un processus de minimisation d'énergie.

Une première approche dans l'essais de prédiction de la structure 3D de DivKBru a été réalisée en se basant sur la structure de CheY cristallisé. Les données concernant la structure tridimensionnelle de Spo0F étant rendue accessible en cours de travail, nous avons entamer un deuxième processus de recherche de la structure 3D de DivKBru en utilisant Spo0F comme template. Par rapport à la protéine CheY cristallisée, Spo0F différe quant à la conformation des hélices α, principalement la première et la dernière.

Nous avons testé les différents modèles obtenus et affiné le meilleur d'entre eux. Seulement 5,7% des résidus de ce dernier possèdent une conformation énergétiquement défavorable.
Le modèle ainsi obtenu servira pour la prédiction et l'interprétation d'expériences futures. Lorsque certains résidus auront été mis en évidence, par exemple ceux intervenants dans les interactions avec d'autres protéines, le modèle pourra être modifié en tenant compte de ces nouvelles données expérimentales.

Finalement, la surproduction de cette protéine a été réalisée. Une surproduction supérieure à 10% de la charge protéique totale a été atteinte.

Les perspectives à ce travail sont premièrement l'optimalisation des conditions de surproduction. La purification sera alors l'étape suivante évidente.
Des tests d'autophosphorylations pourront ensuite être réalisés sur la protéine purifiée en présence de petits donneurs de groupement phosphate.
Lorsque des partenaires auront été clonés, des études d'interactions pourront être tentées. Le modèle permettra alors de prédire certaines zones d'interactions ou de comprendre les résultats de certaines expériences. Une interaction entre travail théorique et expérimental permettra d'affiner le modèle et de mieux comprendre les spécificités de l'interaction entre deux protéines.
Si la surproduction et la purification s'avère satisfaisante, une procédure de crystalisation pourra également être envisagée, ce qui permettra, en plus de l'apport théorique d'une nouvelle structure, de comparer le modèle obtenu à la la structure crystallographique de la protéine.

Matériel et Méthodes

1° Matériel :

1.1. Souches et plasmides :

**E. coli* XL1-blue :*

Cette souche est utilisée pour les différentes étapes de clonage. Son génotype est recA1, endA1, gyr A96, thi-1, hsd R-17, Sup E44, rel A1, Δ lac, (F', lac IqZΔM15, Tn10).

- recA1 réduit la recombinaison au millième de son taux normal, minimisant ainsi la recombinaison entre ADN endogène et exogène.
- endA1 améliore le rendement et la qualité des préparations d'ADN plasmidique à petite échelle en diminuant le taux d'endonucléases ;
- Δ lac, délétion de l'opéron lactose qui la rend incapable de métaboliser le lactose.

L'épisome F' (facteur de conjugaison bactérienne) porte les caractères suivants :

- Tn10 contient un marqueur de résistance à la tétracycline (Tet^R) permettant de sélectionner les bactéries contenant l'épisome F' ;
- lac Iq renforce la production du répresseur de l'opéron lactose ;
- ZΔM15, fragment du gène lacZ qui, par complémentation intragénique avec un plasmide portant un autre fragment du gène lacZ (lacZ'), donne une coloration bleue à la colonie en présence d'un chromogène, le X-gal. Si, au niveau du plasmide, le fragment lacZ' est disrupté (plasmide recombinant), la colonie sera blanche en présence de X-gal.

**E. coli* Y1090 :*

Cette souche est utilisée lors du criblage de la banque d'expression de *Brucella abortus* exprimée en phage λgt11.

Le génotype de cette souche est : Δ lac U 169, Pro A+, Δ lon, ara Δ139, Str A, Sup F (Trp22 : Tn10) (PMC 9). Ces caractéristiques sont les suivantes :

- une délétion dans l'opéron lactose (Δ lac U 169) ;
- la mutation lac Iq porté par le plasmide PMC 9. Celle-ci accroît d'un facteur dix la puissance du promoteur du gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose ;
- la mutation Sup F supprime la mutation ambre (UAG) présente dans le gène de lyse S du phage λgt11 ;
- une déficience pour la protéase lon (Δ lon), ce qui augmente la stabilité d'une éventuelle protéine de fusion ;
- un gène de résistance à la tétracycline, porté par le Tn 10 ;
- un gène de résistance à l'ampicilline porté par le PMC9.

**E. coli* BL21 DE3 :*

Cette souche est utilisée pour avec les systèmes pET à des fins de surproduction. Ne possède pas de marqueur de résistance aux antibiotiques.

**pGEM-T :*

Ce vecteur commercialisé par la firme Promega est utilisé pour le clonage de produit PCR. Ce plasmide est linéarisé au moyen de l'enzyme Eco R V et possède une thymine ajoutée à l'extrémité 3' terminale. La présence de cette base T protrudante facilite la ligation des produits PCR obtenu par certaines DNA polymérases, dont la DynaZyme (Finnzymes OY) , qui ajoute une base A aux extrémités 3'. Le site unique de clonage se trouve dans l'α peptide codant pour la β galactosidase, ce qui permet d'effectuer le test "blanc-bleu". Le plasmide pGEM-T possède les sites, uniques, de restriction suivants : *Apa I, Aat II, Sph I, Nco I, Sac II, Spe I, Not I, Pst I, Sal I, Nde I, Sac I, BstX I et Nsi I.* Enfin, ce plasmide possède le gène *bla* encodant la résistance à l'ampicilline.

* pKS :

Commercialisé par la firme Stratagène, le pBluescript II KS - est un phagemide de 2961 paires de bases dérivé du pUC 19. Le site unique de clonage se trouve dans l'α peptide codant pour la β–

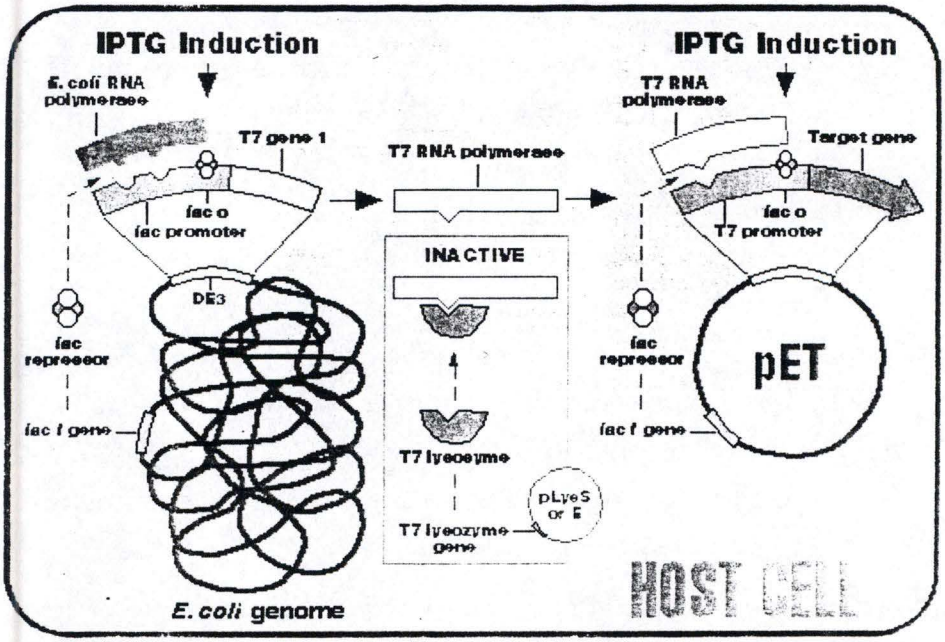


Figure 46: Eléments de controle du système pET. Les gènes cibles sont clonés sous le controle de signaux forts de transcription et de translation du bactériophage T7 dans le plasmide pET. Les plasmides sont transférés dans l'hôte d'expression qui contient une copie chromosomique du gène de la T7 RNA polymérase sous controle de *lacUV5,* dont l'expression est induite par addition d'IPTG.

galactosidase, ce qui permet de différencier les plasmides recombinants qui ont une coloration blanche des non-recombinants qui ont une coloration bleue.
Ce plasmide possède le gène de résistance à l'ampicilline.

* pET-15b :

Commercialisé par la firme Novagen, les systèmes pET sont utilisés pour le clonage et l'expression de protéines dans *E. coli* (fig. 46). Le gène de la protéine d'intérêt est cloné dans un plasmide pET qui est sous contrôle du signal de transcription du bactériophage T7. L'expression ne peut être induite que par la T7 RNA polymérase qui est une enzyme très sélective.
Afin de pouvoir contrôler l'expression de la protéine d'intérêt, le gène de cette dernière est cloné dans une souche possédant le gène de la T7 polymérase sous contrôle du *lacUV5*. Dès lors, l'expression par la polymérase de la protéine clonée, peut être induite par l'addition d'IPTG qui induit la T7 polymérase.

Le pET-15b ajoute une queue poly - histidines du côté N-terminal de la protéine. Cette queue poly - his., pouvant être clivée, permet une purification rapide sur colone de nickel. Enfin, le pET-15b possède le gène de résistance à l'ampicilline.

1.2. Milieux de culture :

1.2.1. Milieux pour bactéries :

** Milieu Luria Bertani (LB) :*

- Tryptone	1 g/100 ml.
- NaCl	0,5 g/100 ml.
- Yeast extract	0,5 g/100 ml.

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

** Milieu 2YT :*

- Tryptone	1,6 g/100 ml.
- NaCl	0,5 g/100 ml.
- Yeast extract	1 g/100 ml.

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

* *Milieu LB solide :*

De même composition que le LB liquide, ce milieu contient 1,5% d'Agar. On peut additionner, au milieu autoclavé et refroidi à 55 °C, les antibiotiques ou autres additifs mentionnés avant de le couler dans des boites de Pétri.

* *SOC (milieu utilisé pour les électroporations) :*

- Yeast extract	0,5%.
- Tryptone	2%.
- KCl	2,5mM.
- NaCl	10 mM.
- MgCl2	10 mM.
- MgSO4	10 mM.
- Glucose	20 mM.

1.2.2. Milieux pour phages :

La préparation des milieux (liquides ou solides) pour phages est identique à celle des milieux pour bactéries mais l'on ajoute 0,2% de maltose stérile et 10 mM de $MgSO_4$ stérile lorsque la solution est refroidie. Le maltose induit l'opéron maltose qui contient le gène *LomB* qui code pour le récepteur bactériophage. Le $MgSO_4$ favorise l'adhésion du phage sur la bactérie.

* *TB TOP Agar :*

- Tryptone	1 g/100 ml.
- NaCl	0,5 g/100 ml.
- Agar	0,8 g/100 ml.

Après avoir autoclavé et laisser refroidir la solution, ajouter 1 ml de $MgSO_4$ 1M stérile.

1.2.3. Solutions :

* *Solutions d'antibiotiques :*

- Ampicilline 50 mg/ml d'H2O.
- Tétracycline 25 mg/ml éthanol 70%.

Utiliser dilué 1000X.
Aliquoter et conserver à - 20 °C.

* *Solution d'IPTG (Isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside) :*

- 100 mM IPTG dans de l'eau pure.

Filtrer sur membrane 0,22 µm.
Aliquoter et conserver à -20 °C.

** Solution d'X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactoside) :*

- 2% X-gal dans du dimethylformamide.
Filtrer sur membrane 0,22 µm.
Aliquoter et conserver à -20 °C.

** Maltose :*

-solution 0,2%, filtrée 0,22 µm.

** MgSO4 1M :*

-$MgSO_4$ (246,5 g/mol) 24,65 g.
Porter à 100 ml avec de l'eau distillée et filtrer avec filtre 0,22 µm.

** HEPES 1mM : (4-(2-hydroxyethyl)-1 piperazine-ethane-sulfonic acid, Boehringer Mannheim)*

-HEPES 1 mM: 0,117 g d'HEPES
Porter à 500 ml avec de l'eau distillée. Autoclaver.
Refroidir sur glace avant utilisation.

** Glycérol 10% :*

-Diluer 20 ml de glycérol (UCB) dans 180 ml d'eau distillée. Autoclaver. Refroidir sur glace avant utilisation.

2° Transformation :

2.1. Préparation de cellules $CACl_2$ Compétente :

-L'ensemble des opérations doit se faire dans des conditions de parfaite stérilité (travailler sous hôte à flux laminaire). Prévoir, avant de commencer, le matériel stérile nécessaire à l'opération.
- A partir d'une colonie de la souche *E. coli* XL1-blue, obtenue sur milieu solide (LB Agar + Tétra), effectuer une préculture O.N. à 37 °C dans 5 ml de milieu (LB+ tétra) liquide.
- Dans un Erlenmeyer de 2 L, mettre 400 ml de milieu liquide (LB + Tétracycline) et faire préchauffer à 37 °C.
- Inoculer au moyen de 2 ml de préculture, placer à 37 °C avec agitation jusqu'à atteindre une DO de 0,3 à 600 nm.
- Placer la culture sur glace pendant 20 minutes.
- Stérilement, transférer la culture dans deux récipients pour rotor HS-4. Centrifuger 10 minutes à 6500 rpm, éliminer le surnageant.
- Ajouter 50 ml de $CaCl_2$, conservé sur glace, par récipient. Resuspendre par agitation, ensuite laisser 20 minutes sur glace.
- Centrifuger 10 minutes à 6500 rpm, éliminer le surnageant.
- Resuspendre chaque culot avec 30 ml de $CaCl_2$ 50 mM conservé sur glace.
- Laisser 20' sur glace.
- Centrifuger 10 minutes à 6500 rpm, éliminer le surnageant.
- Resuspendre à la P1000 chaque culot avec 2 ml de $CaCl_2$ 50 mM + glycerol 15% conservé sur glace.
- Aliquoter par 0,2 ml dans des Eppendorfs stériles et conservés à 4 °C.
- Stocker à - 80 °C.

2.2. Préparation de cellules électrocompétentes :

- A partir d'une colonie de la souche d'intérêt, obtenue sur milieu solide (LB Agar + Streptomycine), inoculer 5 ml de milieu 2YT contenant 10 mg/ml de streptomycine. Incuber une nuit, à 37°C sous forte agitation.
- Transférer la préculture dans un erlen de 3 litres muni de contre-pales contenant 500 ml du même milieu.
- Incuber à 37°C jusqu'à l'obtention d'une D.O. à 600 nm de 0,5 à 0,7 et placer 30 minutes sur glace.
- Répartir la culture dans 4 tubes stériles. Centrifuger 10 minutes à 6500 rpm et à 4 °C dans une centrifugeuse Sorvall RC-5B (rotor HS-4)
- Eliminer le surnageant et resuspendre chaque culot avec 50 ml d'une solution d'HEPES 1 mM froide et stérile.
- Centrifuger 10 minutes à 6500 rpm et à 4 °C dans une centrifugeuse Sorvall RC-5B (rotor HS-4).
- Eliminer le surnageant et resuspendre chaque culot avec 50 ml d'une solution d'HEPES 1 mM froide et stérile.
- Centrifuger 10 minutes à 6500 rpm et à 4 °C dans une centrifugeuse Sorvall RC-5B (rotor HS-4).
- Eliminer le surnageant et resuspendre avec 50 ml d'une solution de glycérol 10% froid et stérile pour deux culots.
- Centrifuger 10 minutes à 6500 rpm et à 4 °C dans centrifugeuse Sorvall RC-5B (rotor HS-4).
- Eliminer le surnageant et resuspendre chaque culot avec 1,5 ml d'une solution de glycérol 10% froide et stérile.
- Echantillonner par 200 µl et stocker à - 80 °C.

2.3. Transformation de cellules $CaCl_2$ compétentes :

2.3.1. Introduction :

La paroi bactérienne est rendue fragile par les conditions de préparation des cellules ($CaCl_2$), ce qui favorise l'entrée d'ADN étranger. La survie et la transformation bactérienne dépendent de la rapidité du choc thermique et de la précision des températures appliquées.

2.3.2. Protocole :

- A la solution de ligation (max. 50 ng d'ADN dans 10 µl), ajouter 100 µl de cellules compétentes.
- Laisser 35' sur glace.
- Effectuer un choc thermique, 2' à 42 °C puis remettre sur glace.
- Rajouter 0,5 ml de LB, et laisser 35' à 37 °C.
- Etaler 150 µl par boite.

2.4. Electroporation :

2.4.1. Introduction :

Cette technique utilise un bref choc électrique pour permettre l'entrée d'ADN étranger dans une cellule bactérienne. La survie et la transformation bactérienne dépendent principalement de l'intensité et de la durée du choc électrique.

2.4.2. Méthode:

- Dégeler les cellules "électrocompétentes" 20 minutes sur glace.
- Dans un Eppendorf stérile froid, mélanger 50 µl de cellules avec 10 ng d'ADN (de 1 à 10 µl maximum) et laisser au moins 1 minute sur glace.
- Placer le "Gene Pulser" à 25 µF et 2000 volts et le "Gene Controller" à 200 Ω .
- Transférer, sans faire de bulles, le mélange d'ADN et de cellules dans une cuvette à électroporation de 0,2 cm de largeur (Bio-Rad). Placer cette cuvette entre les 2 électrodes de l'électroporateur et mettre sous tension.
- Enlever la cuvette et y ajouter immédiatement 1 ml de milieu SOC.
- Transférer le mélange dans un Eppendorf stérile et incuber 1 heure à 37 °C.
- Etaler sur milieu LB solide avec antibiotique, et incuber une nuit à 37 °C.

3° Techniques relatives à l'ADN :

3.1. Minipréparation :

3.1.1. Introduction :

Cette technique permet de purifier les plasmides produits par *E.coli.* L'opération est conçue pour isoler l'ADN plasmidique de l'ADN génomique et des protéines bactériennes.
Une miniprep. comprend 5 étapes: la lyse alcaline des bactéries, l'élimination des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN, le lavage de l'ADN plasmidique et enfin sa resuspension.

3.1.2. Méthode :

- Ensemencer 5 ml de milieu liquide (LB+antibiotiques) avec une colonie isolée.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37 °C sous forte agitation.
- Centrifuger 1,5 ml de la culture dans un Eppendorf (pendant 5 minutes à 12 500 rpm) et éliminer le milieu de culture.
- Resuspendre ce culot dans 300 µl de S1 sans RNase A, ajouter 300 µl de S2 et mélanger doucement par retournement. Incuber 5 minutes ^ température ambiante.
- Ajouter 300 µl de S3 et mélanger doucement par retournement, incuber 10 minutes sur glace.

- Centrifuger 25 minutes à 12500 rpm, récupérer le surnageant dans un nouvel Eppendorf.
- Précipiter l'ADN en ajoutant 0,72 µl d'isopropanol, secouer énergiquement.
- Centrifuger 17 minutes à 12500 rpm, éliminer le surnageant.
- Laver l'ADN, en ajoutant 1 ml d'éthanol 70% et centrifuger 10 minutes à 12500 rpm. Eliminer prudemment l'éthanol.
- Sécher sous vide quelques minutes et resuspendre dans 18 µl d'H_2O distillée et 2 µl de S1 avec RNase A.
- Laisser une heure à température ambiante puis stocker à - 20 °C.

3.2. Midipréparation :

3.2.1. Introduction :

Cette technique permet de purifier des quantités de plasmides plus importantes que lors d'une minipréparation. L'ensemble des différentes opérations à effectuer sont similaires à celles de la miniprep.

3.2.2. Méthode :

- Ensemencer 50 ml de milieu liquide (LB+antibiotiques) avec une colonie isolée.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37 °C sous forte agitation.
- Centrifuger 6' la culture à 6000 rpm (Sorvall, rotor HS-4).
- Eliminer le surnageant, resuspendre avec 4 ml de S1. Transférer la solution dans un Corex de 30 ml.
- Ajouter 4 ml de S2. Mélanger doucement et laisser 5' à température ambiante.
- Ajouter 4 ml de S3. Mélanger doucement et laisser 8' sur glace.
- Centrifuger 40' à 12500 rpm à 4 °C, éliminer le surnageant.
- Pendant ce temps, équilibrer la colonne avec 2 ml de N2.
- Faire passer sur la colonne la solution d'ADN.
- Laver la colonne avec 8 ml de N3.
- Eluer l'ADN avec 2 ml de N5, l'éluat est récolté dans un Corex de 15 ml.
- Ajouter 1,8 ml d'isopropanol en agitant doucement au vortex.
- Centrifuger 20', à 12500 rpm et 4 °C.
- Eliminer le surnageant, ajouter 4 ml d'éthanol 70%.
- Centrifuger 7', à 12500 rpm et à 4 °C.
- Laisser sécher le culot.
- Resuspendre le culot dans 100µl d'eau et stocker à - 20 °C.

3.3. Solutions :

*S1 :

- Tris-HCl 50 mM pH 8,0.
- EDTA 10 mM.

On peut éventuellement ajouter 100 µg de RNase A par ml .
Dans ce cas stocker à 4 °C.

*S2 :

- NaOH 200 mM.
- SDS 1%.

Conserver à température ambiante.

*S3 :

- KAc 2,6 M pH 5,2.

Conserver à 4 °C.

*RNase A (Macherey - Nagel) :

- Incuber 1 mg de RNase A par ml d'eau pure 60' à 37 °C.
- A utiliser à 1/10ème de volume.

3.4. Extraction au phénol-chloroforme :

Afin d'extraire les protéines d'une solution d'ADN, on utilise le phénol, solvant non-miscible à l'eau. Les protéines précipitent à l'interface entre la phase organique et la phase aqueuse. Cette opération s'effectue principalement entre deux restrictions ou entre une restriction et une ligation.

3.4.1. Protocole :

- Porter le volume de la solution à 400 µl avec de l'eau pure.
- Ajouter 400 µl de phénol saturé en TEN.
- Agiter au vortex pendant 30 secondes à 1'.
- Centrifuger 10' à la microfuge.
- Prélever avec précaution la phase supérieure, en évitant de reprendre l'interface phénol-eau.

3.4.2. Solution :

- phénol saturé au TEN buffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl). Ajouter un volume de phénol à un volume de TEN. Mélanger et centrifuger, éliminer la phase supérieure et recommencer jusqu'à ce que le pH du mélange soit supérieur à 7,8.
- ajouter à ce mélange un même volume de chloroforme (UCB) + alcool isoamylique (UCB) (dans une proportion 24/1).

3.5. Précipitation de l'ADN :

3.5.1. Introduction :

Il est souvent nécessaire de concentrer une solution d'ADN, par exemple après une extraction au phénol. A cet effet, on précipite l'ADN pour le resuspendre dans un volume inférieur.

3.5.2. Méthode :

- Ajouter à la solution 1/10ème de volume d'acétate de sodium 3M, pH 5,2 et 2,5 volumes d'éthanol absolu.
- Mélanger par retournement.
- Précipiter l'ADN 30' à - 80 °C.
- Centrifuger 17' à 12500 rpm.
- Eliminer le surnageant et ajouter 3,6 volumes d'éthanol 70% (dessalage).
- Centrifuger 10' à 12500 rpm.
- Eliminer le surnageant.
- Sécher le culot
- Resuspendre l'ADN précipité dans le volume désiré d'eau pure.

3.6. Restrictions :

3.6.1. Introduction :

Le clivage de l'ADN bicaténaire à des sites précis se fait par des endonucléases de restriction qui reconnaissent de courtes séquences palindromiques de 4 à 6 paires de bases. Les enzymes de restriction et leurs tampons sont fournis par différentes firmes.

3.6.2. Méthode :

Placer dans un Eppendorf :
- l'ADN à restreindre en suspension dans de l'eau distillée.
- Tampon de restriction 10X : 1/10ème du volume final (livré avec l'enzyme de restriction).
- Enzyme de restriction: entre 2 et 10 unités d'enzyme par µg d'ADN (1 unité correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour restreindre complètement 1 µg d'ADN du phage λ en 1 heure à 37 °C dans un volume de 25 µl).
- Amener au volume final avec de l'eau pure.
- Incuber une heure à la température optimale pour l'enzyme (principalement 37 °C). La réaction peut aussi être stoppée (enzyme inactivée) soit par chauffage (15 à 20 minutes à 65 °C) si l'enzyme est thermosensible, soit par une extraction phénol/chloroforme.

3.7. Ligation :

3.7.1. Introduction :

Pour lier de manière covalente deux fragments d'ADN, on utilise l'enzyme ADN ligase du phage T4, qui catalyse la formation de liens phosphodiesters 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^{++}. La réaction nécessite un ADN purifié des protéines et des sels qui pourraient le contaminer. Une extraction au phénol est donc nécessaire entre une restriction et une ligation.

3.7.2. Méthode :

Mélanger dans un tube Eppendorf :
- Les fragments d'ADN à liguer, le nombre d'insert étant un peu plus élevé que le nombre de vecteur (au moins 200 ng).
- 1/10 ème du volume final de tampon ligase 10x livré avec l'enzyme.
- Le nombre d'unités de ligase nécessaire (dépendant de la quantité d'ADN)
- Compléter avec de l'eau distillée stérile.
- Incuber O.N. à 16 °C.
- Conserver le mélange de ligation à - 20 °C.

4° Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose:

4.1. Introduction :

Cette technique permet de séparer des fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser est inversement proportionnel à la taille des fragments à séparer.
La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Nous avons utilisé comme marqueurs de taille: l'ADN du phage λ coupé par *Hind* III (GibcoBRL) ou le marqueur V (Eurogentec).
L'utilisation du bromure d'éthidium, une molécule fluorescente liant l'ADN bicaténaire en s'intercalant entre les bases de la double hélice, permet la visualisation des fragments sous illumination UV.
La fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille, mais aussi à la quantité d'ADN présente; ainsi, en connaissant la quantité d'ADN du marqueur de taille, on peut estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison des intensités de fluorescence.

4.2. Préparation de l'échantillon :

- Ajouter 1 µl de solution de coloration et d'alourdisseur à l'échantillon d'ADN.

4.3. Gel :

- Dissoudre l'agarose (de 0,8 à 2% selon la séparation désirée) dans le TAE 1X et chauffer la solution jusqu'à transparence.
- Placer les peignes dans la cuve.
- Couler l'agarose dans la cuve quand la solution a refroidi à environ 50 °C, ajouter une goutte de bromure d'éthidium (2 mg/ml) par 50 ml de gel.
- Laisser le gel se solidifier au moins 20'.
- Retirer les peignes.
- Placer le gel dans la cuve et le recouvrir de TAE 1X.

4.4. Solution de bromure d'éthidium :

- 2 mg/ml d'eau.

4.5. Migration :

- Déposer les échantillons préparés dans les puits.
- Migrer avec une différence de potentiel de 50 - 100 volts pendant 1 à 2 heures.
- Visualiser sur table U.V.

λ/Hind III

Taille (bp)	ng
23130	238
9416	97
6557	63
4361	45
2322	24
2027	21
564	5,8

ϕx174DNA/HincII DIGEST

Taille (bp)	ng
1057	196
770	143
612	114
495	92
392	73
345 341 335	189
297 291	109
210	39
162	30
79	15

Figure 47 : Etalons de taille pour gel d'agarose.

4.6. Marqueurs de taille (fig. 47) :

* *λ/Hind III (Gibco BRL) :*

- λ/Hind III (Gibco BRL)	100 µl.
- Tampon de marqueur de taille	700 µl.
- Bromophenol bleu 6x	200 µl.

Incuber 10' à 65 °C et aliquoter par 10 µl.
Conserver à - 20 °C.

* *ϕx174DNA/HincII DIGEST ou Marqueur V (Eurogentec) :*

- Marqueur V (Eurogentec)	100 µl.
- Tampon de marqueur de taille	700 µl.
- Bromophenol bleu 6x	200 µl.

Aliquoter par 10 µl.
Conserver à - 20 °C.

4.7. Récupération d'un fragment :

Après une restriction, il est parfois utile de récupérer un fragment d'une taille donnée pour par exemple le cloner dans un vecteur. Pour réaliser ce genre de manipulation, nous avons utilisé Jet Sorb Gel Extraction Kit/150 de Genomed.

4.7.1. Protocole :

- Faire migrer l'échantillon dans un gel d'agarose adéquat.
- Placer le gel sur un banc UV et découper la bandelette de gel contenant le fragment à récupérer.
- Peser la masse de gel ainsi obtenue et placer dans un Eppendorf.
- Ajouter 300 µl de solution A1 par 100 mg de gel.
- Ajouter 10 µl de Jet Sorb Suspension, préalablement vortexée, par 100 mg de gel.
- Vortexer puis laisser 15' à 50 °C en mélangeant toutes les 3'.
- Centrifuger 30'' à 12500 rpm, enlever le surnageant.
- Laver avec 300 µl de solution A1 par 100 mg de gel.
- Centrifuger 30'', enlever le surnageant.
- Laver ensuite avec 300 µl de solution A2 par 100 mg de gel.
- Centrifuger 30'' à 12500 rpm, enlever le surnageant.
- Relaver une deuxième fois avec 300 µl de solution A2 par 100 mg de gel.
- Centrifuger 30'' à 12500 rpm, enlever le surnageant.
- Sécher le culot.
- Resuspendre dans 20 µl d'eau. Laisser 5' à 50 °C, mélanger 1 fois pendant ce temps.
- Centrifuger 30'' à 12500 rpm et récupérer le surnageant dans un nouvel Eppendorf.

4.8. Solutions :

4.8.1. Tampon pour les marqueurs de taille :

- Tris	10 mM.
- NaCl	5 mM.
- EDTA	0,1 mM.

4.8.2. Solution de coloration et alourdisseur :

- Sucrose	50%.
- EDTA	100 mM.
- SDS	1%.
- Bleu de bromophénol	0,1%.

4.8.3. TAE 50X :

- Tris-HCl	242 g.
- Acide acétique glacial	57,1 ml.
- EDTA 0,5 M (pH 8,0)	100 ml.

Dissoudre dans un litre dÕeau distillée

4.8.4. Solution du kit Jet SorB :

- Buffer A1 : contient du NaClO4, TBE solubizer et de l'acétate de sodium, le tout dans des concentrations non précisées.
- Buffer A2 : contient de l'EDTA, du NaCl et du Tris/HCl, le tout dans des concentrations non précisées.

Avant utilisation, ajouter de l'éthanol 95 - 100 %.

- Jet Sorb Suspension. Composition non précisée.

Stocker les différentes solutions à température ambiante.

5° PCR :

5.1. Introduction :

La PCR permet l'amplification de fragments d'ADN.

L'ADN doit être dénaturé. Des amorces oligonucléotidiques d'environ 20 bases, complémentaires de séquence se trouvant de chaque côté de la région-cible, s'hybrident chacune à un des deux brins. La longueur de la séquence-cible est déterminée par la distance entre les 2 amorces.

Une ADN polymérase thermostable est alors utilisée pour synthétiser à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque amorce un brin d'ADN. Un cycle consiste en 3 étapes: dénaturation, hybridation des amorces et élongation.

En répétant ce cycle, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies de la cible.
La température d'hybridation utilisée est inférieure à la température de melting Tm des amorces. Ce Tm se calcule de la façon suivante : Tm = 4(G+C) + 2(A+T). Les amorces devront contenir environ le même pourcentage de bases G-C que l'ADN cible. Il est également recommandé, de façon à limiter les amplifications non spécifiques, que l'amorce contienne un excès de G/C à l'extrémité 5' et au centre et que les deux ou trois dernières bases de l'extrémité 3' soient A/T.
L'unité de polymérase est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse l'incorporation de 10 nM de déoxynucléotides 3 phosphorylés dans de l'ADN précipitable en 30' à 70 °C.

5.2. Méthode :

5.2.1. La PCR "traditionnelle" :

- Le mélange de réaction est réalisé dans un Eppendorf pour PCR.
- 1 µl de primer 1 (20 µM).
- 1 µl de primer 2 (20 µM).
- 2 µl de dNTP à 10 mM chacun.
- De l'eau distillée pour PCR afin de porter le volume à 100µl.
- 10 µl de tampon d'ADN polymérase (Dynazyme)10X.
- environ 250 ng d'ADN génomique ou plasmidique portant la région à amplifier
- faire un quick-spin, mettre sur glace.
- 1 µl de Dynazyme ou de 0,5 µl de PWO (2 U/ml),
- Déposer 80 µl d'huile minérale ultra pure au-dessus du mélange de réaction afin d'empêcher toute évaporation,

-Programmer l'appareil à PCR comme suit :
Dénaturation de 5 minutes à 95 °C,
36 cycles d'amplification définis en fonction des oligos :
1 min, à 95 °C pour la dénaturation
1 min, à la température d'hybridation (inférieure au Tm des oligonucléotides)
1 min, à 72 °C pour la polymérisation
Elongation finale de 10 minutes à 72 °C,

- Mettre les Eppendorfs 20' à - 20 °C,
- Eliminer l'huile minérale,
- Déposer 10 µl sur gel d'agarose et conserver le reste à -20 °C,

5.2.2. La PCR sur plages de lyse :

Cette PCR a été effectuée pour vérifier les phages positifs lors de la purification de phages sélectionnés. Presque identique à la PCR habituelle, elle se caractérise par le fait que l'ADN à amplifier est prélevé directement sur les plages de lyse.

Pour ce faire : toucher la plage de lyse avec l'extrémité d'un tips stérile et ensuite le mettre en contact avec le mélange PCR.
Nous avons utilisé pour ce type de PCR :

- 1 µl de primer 1 (20 µM).
- 1 µl de primer 2 (20 µM).
- 2 µl de dNTP 10 mM chacun.
- 1 µl de Dynazyme (2 U/ml).
- Et comme cycles, nous utilisons 35 X les suivants :

30'' à 95 °C pour la dénaturation.
30'' à 55 °C pour l'hybridation.
Et 1 min. à 72 °C pour la polymérisation.

5.2.3. La PCR de séquençage :

Pour séquencer les fragments d'ADN, nous avons utilisé le Kit ABI PRISM dye terminator de Perkin Elmer. Cette technique est basée sur l'amplification d'ADN par PCR avec des didéoxyribonucléotides marqués. Chacun des nucléotides possède un marquage par une sonde fluorescéinée émettant une longueur d'onde d'émission qui lui est propre après excitation. Ceci qui permet la lecture, à partir d'une seule réaction PCR, par le séquenceur automatique.
La présence de didéoxyribonucléotides arrête la polymérisation, ce qui permet d'obtenir une population de brins tronqués représentant la séquence d'ADN.

Protocole :

- 0,4 µg d'ADN (bicaténaire) à séquencer.
- Ajouter un primer à la quantité de 3,2 pmôles.
- Ajouter 8 µl de Terminator Ready Mix.
- Recouvrir de 40 µl d'huile pour PCR.

Cycles :

- 1' à 95 °C.
- 25 cycles de : * 30'' à 96°C.
  * 15'' à 50 °C.
  * 4' à 60 °C.
- Maintenir à 4 °C ou stocker directement à - 20 °C.

Purification :

Avant d'analyser les produits PCR par le séquenceur automatique, il est nécessaire de les purifier afin d'éliminer les nucléotides marqués non incorporés.

- Dans un nouvel Eppendorf, placer 20 µl de solution PCR, 50 µl d'éthanol 95% et 2 µl d'acétate de sodium 3M pH 5,2.
- Vortexer puis laisser 10' sur glace.

- Centrifuger 30' à 12500 rpm.
- Enlever le surnageant et laver le culot avec 250 µl d'éthanol 70%.
- Enlever l'éthanol et laisser sécher le culot.
- Les produits PCR peuvent être ensuite "lu" par le séquenceur.

5.4. Purification d'amplifications PCR:

5.4.1. Introduction :

Lors d'une PCR préparative, il est nécessaire de purifier les séquences amplifiées ^ partir du mélange réactionnel des contaminants (primers de départ, primers-dimers, protéines, sels,...). Ces purifications sont effectuées en utilisant le kit Wizard PCR Preps (Promega).

5.4.2. Méthode :

- Transférer la phase aqueuse dans un Eppendorf propre, car la présence d'huile minérale peut diminuer le rendement de la purification.
- Ajouter 100 µl de "Direct Purification Buffer". Vortexer.
- Ajouter 1 ml de résine (PCR Preps DNA purification resin) et vortexer 3 fois en 1'.
- Préparer une minicolonne "Wizard" pour chaque produit PCR. Retirer le piston d'une seringue de 3 ml et y attacher la minicolonne.
- Injecter le mélange ADN/tampon/résine dans la minicolonne à l'aide du piston (très lentement).
- Détacher la seringue de la minicolonne et retirer le piston. Réajuster le corps de la seringue à la minicolonne et injecter 2 ml d'isopropanol 80%.
- Transférer la minicolonne sur un Eppendorf. Centrifuger le tout 20 secondes à 12500 rpm pour éliminer la solution de lavage et sécher la résine.
- Placer la minicolonne sur un nouvel Eppendorf et ajouter 50 µl d'eau distillée. Laisser 1' à température ambiante.
- Centrifuger 20 secondes à 12500 rpm pour éluer l'ADN.
- Stocker l'ADN purifié à -20 °C.

5.4.3. Solution :

**Direct purification buffer*

- KCl	50 mM.
- Tris HCl	10 mM, pH 8,8.
- $MgCl_2$	1,5 mM.
- Triton X-100	0,1%.

6° Hybridation sur plages de lyse :

6.1. Introductions :

Cette technique, permet de screener une banque de phages. Très proche du Southern blot, elle se caractérise par le fait que l'ADN que l'on veut screener est exprimé en phage, et que le transfert sur une membrane de nylon chargée positivement se fait directement par application de cette dernière sur les plages de lyse. Le reste de la manipulation est identique à celle du Southern blot.

6.2. Préparation de la sonde :

6.2.1. Protocole :

Le Random Primer Fluorescein DNA Labeling Kit (Tropix) est utilisé pour générer une sonde fluorescéinylée à partir d'un fragment d'ADN. Le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I catalyse *in vitro* l'addition de nucléotides fluorescéinylés à partir de primers aléatoires (nonamers) fluorescéinylés. Les éléments du kit (stockés à -20 °C) sont placés dans de la glace durant la manipulation.

Protocole:

- Préparer le tampon de réaction en mélangeant 1 µl de dUTP-fluorescéine avec 11,5 µl de Nucleotide buffer 5x dans un Eppendorf stérile.
- Dans un Eppendorf, mélanger les réactifs suivants:
. 100 ng d'ADN template (1 à 29 µl)
. 10 µl de random 9-mer primers
. de l'eau stérile pour arriver à un volume de 39 µl
- Chauffer à 95 °C pendant 5' puis mettre immédiatement sur glace.
- Ajouter les réactifs suivants dans le tube de réaction:
. 10 µl de tampon de réaction
. 1 µl de Kleenow (5U)
- Mélanger et incuber à 37 °C pendant 30 à 60 minutes.
- Arrêter la réaction en ajoutant 2 µl de Stop Solution
- Conserver à 4 °C à l'obscurité.
- Les sondes fluorescéinylées sont dénaturées avant d'additioner la solution d'hybridation.

Vérification du marquage de la sonde :

L'efficacité de la sonde est un facteur important pour le succès de l'hybridation et de la détection qui suivent. Le marquage est vérifié de la manière suivante:

- Réaliser 6 dilutions croissantes de la sonde et d'un ADN prébiotynilé (de 10^{-1} à 10^{-6}).
- Déposer 1 µl de chaque dilution sur une membrane.
- Sécher la membrane et fixer l'ADN sous UV 5 secondes.
- Suivre le protocole de l'étape de détection du Southern blot (point 6.3.5.). Le marquage de la sonde est considéré satisfaisant lorsque la dilution 10^{-3} est visible.

6.2.2. Réactifs livrés avec le kit :

** 5X Nucleotide Buffer :*

- Solution aqueuse	
- dATP, dCTP, dGTP	100 µM
- dTTP	20 µM

** Random 9-mer Primers :*

- Tris-HCl	10 mM, pH 7,5.
- EDTA	1 mM.
- random 9-mer oligonucléotides.	

** DNA Polymerase I Kleenow Fragment (Exo-) 5U/µl :*

- Solution au glycérol.

** Fluorescein-12-dUTP 1mM :*

- Solution aqueuse.

** Stop Solution :*

- EDTA	0,5 M, pH 8,0.

6.3. Protocole de l'hybridation sur plages de lyse :

6.3.1. Culture :

Effectuer les cultures de phages en utilisant les milieux décrits au point 1.2. Le premier screening se fait sur des cultures réalisées sur des boites de 22 cm de côté. Ensuite pour les étapes de purification les cultures se font sur boite de Petri traditionnelle. La purification du phage positif

consiste à répéter le protocole plusieurs fois jusqu'à obtenir 100% de plages de lyse positives.

Protocole :

- Effectuer une culture liquide Y1090, O.N., dans du milieu LB pour phage avec tétracycline.
- Centrifuger 5' à 12500 rpm, éliminer le surnageant.
- Resuspendre dans 1 ml de $MgSO_4$ 10 mM.

Stocker à 4 °C.

* Pour une grande boite :

- Diluer la banque dans 400 µl de SM.
- Ajouter 400 µl de Y1090 préparé précédemment, laisser le tout 20' dans un bain à 37 °C.
- Ajouter 30 ml d'Htop préchauffé à 45 °C, mélanger et couler sur une boite préchauffée à 37 °C contenant le milieu adéquat.

* Pour une boite de Petri :

- Même technique que pour les grandes boites mais les quantités sont de 100 µl de bactéries et 100 µl de la solution diluée de phages ainsi que 3 ml d'Htop.

6.3.2. Transfert :

- Stocker les boites de culture pendant une heure à 4 °C.
- Pendant ce temps, avec des gants, découper la membrane de nylon aux dimensions de la boite. Marquer d'une croix au crayon la face supérieure.
- Sous hotte, appliquer, en une fois, cette membrane sur la culture tout en évitant les bulles. Avec une aiguille chauffée à rouge faire trois trous dans la membrane pour pouvoir, après révélation, la repositionner. Sur la boite, tracer le contour de la membrane.
- Laisser à l'étuve à 37 °C 5-10'.
- Décrocher délicatement les membranes et les laisser sécher 10' sur la paillasse, face en contact avec l'ADN vers le haut.
- Sur trois papiers Whatman effectuer les bains suivants :
  - 5' avec la solution dénaturante.
  - 5' avec la solution de neutralisation.
  - 5' avec du SSC 6X.
- Laisser sécher 15' au four à 80 °C les membranes entre deux Whatman.

6.3.3. Préhybridation :

Après avoir fixé l'ADN transféré sur la membrane et marqué la sonde, il faut hybrider la sonde aux fragments d'ADN de la membrane. Mais avant, une étape préalable est nécessaire: la préhybridation. L'ADN transféré n'a saturé qu'une faible proportion des sites de fixation potentiels de la membrane. Si la sonde fluorescéinylée était apportée avant cette étape, elle irait directement se fixer sur ces sites plutôt que d'aller s'hybrider sur les séquences complémentaires de l'ADN transféré. La préhybridation a pour but de saturer tous ces sites non spécifiques par de l'ADN hétérologue, dans notre cas de l'ADN de sperme de saumon.

- Préchauffer les solutions de préhybridation et d'hybridation à 65 °C.
- Bouillir le sperme de saumon pendant 5 minutes.

- Fixer l'ADN sur la membrane en passant celle-ci 5 secondes sous UV.
- Mouiller la membrane dans du dissodium phosphate 0,25M pH 7,2.
- Placer la membrane dans un hybritube de 20 ml (Gibco BRL) en l'enroulant autour du plongeur (la face de la membrane portant l'ADN vers le plongeur).
- Préhybridation: ajouter 267 µl de sperme de saumon à 16 ml solution de préhybridation et verser dans l'hybritube.
- Laisser incuber 1 heure à 65 °C.

6.3.4. Hybridation :

- Bouillir la sonde 5 minutes.
- Hybridation : ajouter la sonde bouillie à la solution de préhybridation, puis mélanger en inversant l'hybritube quelques fois.
- Laisser incuber une nuit à 65 °C.

6.3.5. Révélation :

La détection avec le kit "Southern-*Star*™ [a] Chemoluminescent Systems" comprend le bloquage, une incubation avec une phosphatase alcaline conjuguée à un anticorps anti-fluorescéine (le "Fluorx-AP conjugate") et une réaction finale de chémoluminescence. Le CDP-Star™[a] (Tropix) est transformé en un produit responsable de l'émission locale de lumière, qui peut impressionner un film photographique.
Le protocole suivit comprend des temps, des stringences et des températures de lavage qui peuvent être adaptés, par exemple pour une meilleure élimination du bruit de fond.

Protocole:

**Laver la membrane :
- 2 x 5' à température ambiante dans du SSC 2X, 1% SDS (1 ml/cm2).
- 2 x 5' à 65 °C dans du SSC 0,1X, 1% SDS.
- 2 x 5' à température ambiante dans du SSC 1X.
- 2 x 5' dans du "Blocking Buffer" (0,5 ml/cm2).
**Incuber 25' dans du "Blocking Buffer" (1 ml/cm2).
Diluer le "Fluorx-AP conjugate" 1 : 5,000 dans du "Blocking Buffer". Utiliser 2,0 µl de "Fluorx-AP conjugate" dans 10 ml de "Blocking Buffer" par 100 cm2 (0.1 ml/cm2).
**Incuber la membrane 25' à température ambiante sous agitation constante dans la solution de conjugué.
**Laver la membrane :
- 5' dans du "Blocking Buffer" (0,5 ml/cm2).
- 3 x 5' dans du "Wash Buffer" (1 ml/ cm2).
- 2 x 2' dans de l'"Assay Buffer" (0,5 ml/ cm2).
Eliminer le liquide en posant le coin de la membrane sur un papier Whatman, puis la poser à plat.
- Déposer une mince couche de CDP-Star sur la membrane (3 ml/ 100 cm2) et incuber 5'.
Eliminer l'excès de CDP-Star et placer la membrane dans un feuillet de développement.
Enlever les bulles et les faux-plis.
Exposer la membrane au film de 30" à plusieurs minutes.

Immerger le film 5' dans le révélateur.
Rincer le film à l'eau distillée et l'immerger 8' dans le fixateur .
Rincer ensuite à l'eau de ville.

6.3.6. Isolement des phages positifs :

Les plages de lyse positives apparaissent sous forme de spot foncé sur le négatif. Au moyen des marques sur la membrane et sur la boite, localiser les plages de lyse sur la culture.

- Prélever, stérilement, la partie d'Htop contenant la plage de lyse positive au moyen d'un tips stérile dont l'extrémité a été coupée.
- Faire diffuser un heure à température ambiante dans un Eppendorf stérile contenant 1 ml de SM stérile et une goutte de chloroforme.
- Conserver à 4 °C.

6.4. Réalisation et détermination du titre d'une solution de phages :

Après avoir isolé et purifié un phage positif, il est très souvent nécessaire de le produire en quantité suffisante et de connaître la concentration exacte de la solution ainsi produite.

6.4.1. Surproduction de phages :

- Effectuer 6 cultures O.N. à 37 °C avec la solution de phages purifiés dilué 50X.
- Déposer sur chaque culture 2,5 ml de SM stérile.
- Agiter faiblement pendant 3 heures à 4°C.
- Stérilement, récupérer le SM des différentes boites dans un tube stérile de 50 ml.
- Gratter la couche d'Htop de chaque culture et placer le tout dans le tube contenant le SM récolté précédemment.
- Ajouter 3 gouttes de chloroforme et laisser 10' à température ambiante.
- Centrifuger 15' à 4500 rpm.
- Récupérer le surnageant dans un nouveau tube stérile et y ajouter deux gouttes de chloroforme.
- Aliquoter en un ml.
- Conserver à 4 °C.

6.4.2. Détermination du titre de la banque :

Pour déterminer le titre d'une banque, il suffit d'effectuer des dilutions 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6},... et 10^{-12}. Compter le nombre de plages de lyse en fonction de la dilution, en faire une moyenne et exprimer en PFU/ml.

6.5. Solutions :

6.5.1. Réactifs livrés avec le kit :

* *CDP-Star ™ Ready-to-use substrate solution :*

- Concentration de 0,25 mM.

Conserver à 4 °C.

* *I-Block ™ Reagent :*

Caséine hautement purifiée fournie sous forme de poudre sèche et protégée de la contamination par la phosphatase alcaline.

Conserver à 4 °C.

* *Fluorx-AP :*

Anticorps anti-fluorescéine conjugué avec une phosphatase alcaline.

- Diluer 1 : 5000.

Conserver à 4 °C.

* *10X Assay Buffer :*

- Tris-HCl	200 mM, pH 9,8.
- $MgCl_2$	10 mM.

Diluer 1 : 10 avec de l'eau MilliQ [a] ou équivalent.

Conserver à 4 °C.

6.5.2. Solutions à préparer :

* *Solution de dénaturation :*

- NaOH	200 mM.
- NaCl	1,5 M.

- Amener le volume à 1 L.

* *Solution de neutralisation :*

- Tris	0,5 M.
- NaCl	1,5 M.

- Amener à pH 7,5.
- Amener le volume à 1L.

* *Solution de préhybridation :*

- EDTA	1 mM (0,25 ml EDTA 0,2 M).
- SDS	7% (17,5 ml de SDS 20%).
- Disodium Phosphate, pH7,2	0,25 M (25 ml de disodium phosphate 0,5 M, pH 7,2).

- Ajouter de l'eau déionisée pour arriver à un volume final de 50 ml.
- Si le SDS précipite, mettre la solution dans un bain à 50 °C pour le redissoudre.

** Blocking buffer :*

- I-Block Reagent 0,2% (0,6 g).
- PBS 1X (30 ml PBS 10X).
- SDS 0,5% (7,5 ml SDS 20%).
- Ajouter 30 ml de PBS 10X à 200 ml d'eau déionisée.
- Ajouter l'I-Block Reagent et passer au micro-onde environ 80 secondes (35"/100ml) ou chauffer à 70 °C 5', sans faire bouillir.
- Refroidir avant utilisation.

** Wash buffer :*

- PBS 1X (50 ml PBS 10X).
- SDS 0,5% (12,5 ml SDS 20%).
- Ajouter de l'eau déionisée pour atteindre un volume de 500 ml.

** SSC 25X pH 7,0 :*

- NaCl 3 ,75 M (21,9 g/100 ml).
- Citrate de sodium 375 mM (11,0 g/100 ml.)
- Ajuster le pH à 7,0 (avec quelques gouttes de NaOH 10 M).

** Disodium Phosphate 0,5 M pH 7.2 :*

- Na_2 HPO_4 0,5 M (13,4 g/100 ml).
- H_3PO_4 85% (0,4 ml/100 ml).

** EDTA 0,2 M pH 8,0 : 7,4 g/100 ml.*

** PBS 10X :*

- Na_2HPO_4 0,58 M (82,3 g).
- $NaH_2HPO_4.H_2O$ 0,17 M (23,5 g).
- NaCl 0,68 M (40,0 g).
- Ajouter de l'eau déionisée pour arriver à un volume final de 1 l.

** SM :*

- Gélatine 0.01%.
- Tris-HCL pH 7.5 50 mM.
- NaCl 100 mM.
- $MgSO_4$ 8 mM.

Filtrer sur membrane 0,22 µm.

7° Production d'ADN de phage :

Après avoir purifié le phage positif, il est très souvent nécessaire de produire l'ADN de ce phage en quantité importante.

- Effectuer une culture liquide de Y1090.
- Déterminer le nombre de cellules présentent dans la culture en sachant que la valeur de la DO, à 540 nm, multipliée par 8.10^8 est égale au nombre de cellules par ml.
- Prélever 10^{10} cellules Y1090.
- Centrifuger 10' à 4000 g.

- Enlever le surnageant et resuspendre dans le même volume de $MgSO_4$ 10 mM.
- Ajouter une dilution de la solution de phages dont le titre est connu, pour obtenir un rapport d'environ 30 cellules pour un phage.
- Laisser 20' à 37 °C sous faible agitation.
- Transférer ensuite dans un Erlenmeyer de 3 l contenant 500 ml de milieu liquide pour phage, le tout préchauffé à 37 °C.
- Laisser la culture à 37 °C sous agitation.

La turbidité de la solution va augmenter, passer par un maximum avant de diminuer lorsque les phages auront lysés les cellules. A ce moment, ajouter 10 ml de chloroforme.

- Laisser 10' à 37 °C sous agitation.
- Ajouter 50 µl de RNase A et 50 µl de DNase , laisser à température ambiante pendant 30' (la concentration finale en enzyme doit être d'1 µg/ml).

Ajouter 29,22 gr de NaCl et laisser une heure sur glace.

- Centrifuger 10' à 4°C et à 7250 rpm. Récupérer le surnageant.
- Ajouter 50 gr de PEG 8000 et le faire dissoudre correctement.
- Laisser une nuit à 4°C.
- Centrifuger 10' à 4 °C et à 8000 rpm.
- Récupérer le culot dans 15 ml de SM.
- Centrifuger 10' à 4 °C et à 8000 rpm.
- Récupérer le surnageant.
- Ultracentrifuger à 30000 rpm pendant une heure.
- Resuspendre le culot dans le volume d'eau souhaité.

8° Electrophorèse de protéines en gel de polyacrylamide

8.1. Electrophorèse

Couler le "running" gel et ajouter une couche d'alcool isoamylique.
laisser polymériser 30 minutes.
Eliminer l'alcool avec un papier absorbant.
Couler le "stacking" gel jusqu'au bord des plaques avec le peigne.
Mélanger 20 µl d'échantillon à 5 µl de tampon d'échantillons.
Placer les échantillons dans un bain à 100°C durant 5 minutes.
Déposer les échantillons dans les puits.
Migrer une heure à 100 Volts dans du tampon d'électrophorèse.
Colorer au bleu de Coomasie durant 15 minutes.
Décolorer dans la solution de décoloration durant une heure.
Sécher le gel sous vide entre deux feuilles de cellophane humides.

8.1. Solutions (pour un gel 15%)

Solution d'acrylamide-bisacrylamide	
Acrylamide	30 %.
Bisacrylamide	0,8%.

'Running' gel

Solution d'acrylamide-bisacrylamide	4 ml.
Tris 1,5 M SDS 0,4% pH 8,8	2,5 m.l
Eau distillée	3 ml.
TEMED	10 µl.
Persulfate d'ammonium 1%	500 µl.

'Stacking' gel

Solution d'acrylamide-bisacrylamide	1ml.
Tris 1,5 M SDS 0,4% pH 8,8	2,5 ml.
Eau distillée	5,5 ml.
TEMED	10 µl.
Persulfate d'amonium	500 µl.

Tampon d'éléctrophorèse

Tris	125 mM.
Glycine	960 mM.
SSDS	0,5 %.

Tampon d'échantillons 5x

Tris HCL pH 8,3	312,5 mM.
SDS	10 %.
Bleu de bromophénol	0,005%.
b-mercaptoéthanol	25 %.
Glycérol	50 %.

Solution de coloration

Bleu R250 (Coomassie)	0,1 %.
Acide acétique	10 %.
Méthanol	40 %.
Eau distillée	50 %.

Solution de décoloration

Acide acétique	10 %.
Méthanol	40 %.
Eau distillée	50 %.

9° Recherche de la structure tridimensionnelle d'une protéine :

9.1. Introduction :

Dans un cadre plus général, concernant l'étude de l'interaction entre composants du système de transduction du signal chez *B. abortus*, la représentation de la structure 3D de la protéine étudiée a été réalisée. L'analyse du modèle permet de disposer des informations nécessaires à la prédiction d'expériences futures concernant l'interaction entre partenaires du système de transduction du signal.

9.2. Matériel :

Le matériel informatique utilisé est composé d'une station de travail graphique Silicon Graphics, modèle Indigo2, dotée d'un processeur cadencé à 150 MHZ, disposant de 64 Mb de mémoire vive et sous système d'exploitation Irix 5.3.

9.3. Alignements:

9.3.1. Recherche de séquences homologues :

Lorsque que l'on a cloné un gène, une des premières chose que l'on fait après l'avoir séquencé, c'est de rechercher des séquences homologues à la séquence obtenue. Différentes banques sont accessibles par le réseau Internet pour exécuter de telles recherches.
Pour les effectuer, nous avons utilisé le logiciel Blast (Altschul *et al.*, 1990), accessible par le réseau Internet (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Différents programmes sont présents sur le serveur Blast :
- blastp : compare une séquence protéique avec les séquences contenues dans les banques de séquences protéiques ;
- blastn : compare une séquence nucléique avec les séquences contenues dans les banques de séquences nucléiques ;
- blastx : compare les séquences protéiques déduites dans les 6 phases d'une séquence nucléique avec les séquences contenues dans les banques de séquences protéiques ;

- tblastn : compare une séquence protéique avec les séquences contenues dans les banques de séquences traduites dans les 6 phases ;
- tblastx : compare les séquences déduites dans les 6 phases avec les séquences traduites dans les 6 phases.

Pour avoir le plus possible de séquences similaires, il est nécessaire de consulter différentes banques, chacune ayant des caractéristiques propres :
- SwissProt : http:// expasy.hcuge.ch/sprot/sprot-top.html. Banque de séquences protéiques, Department of Medical Biochemistry (University of Geneva) and EMBL Outstation.
- GenBank : http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/query_form.html. Banque de séquences nucléiques.
- PDB : http://www.pdb.bnl.gov/. Banque de structures cristallographiques de protéines, Brookhaven National Laboratory (New-York).

9.3.2. Alignements de séquences :

Les séquences homologues ainsi obtenues, il est nécessaire d'en faire des alignements si l'on veut obtenir des informations concernant les différents résidus des séquences alignées. Par exemple, il est possible de déterminer la localisation supposée de résidus impliqués dans une fonction catalytique, préciser des régions structuralement conservées...
L'alignement entre séquences s'avère aussi très important pour la recherche de la structure tridimensionnelle d'une protéine.
Pour les alignements, nous avons utilisés les logiciels Match-box server (Depiereux *et al.*, 1997) et ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Le logiciel Match-Box server est sur le réseau :
http://www.fundp.ac.be./science/biologie/bms/matchbox_submit.html,
ClustalW est quant à lui utilisé sur le système d'exploitation.
Pour déterminer le pourcentage d'identité entre deux séquences, le logiciel Lalign du serveur BCM Search Laucher : Pairwaise Sequence Alignment a été utilisé. http://dot.imge.bcmtmc.edu:9331/seq-search/alignment.html.

9.4. Structure secondaire :

Lorsque l'on possède une séquence en acides aminés de protéine n'ayant pas d'homologue de structure tridimensionnelle connue, il est possible de prédire la structure secondaire de la protéine étudiée. Dans de

pareils cas il est conseillé d'utiliser plusieurs logiciels et d'établir un consensus entre les résultas obtenus.

Dans notre cas la protéine étudiée fait partie d'une famille de protéines bien connues dont la structure 3D du principal représentant a été déterminée par cristallographie. Les autres représentants de cette famille partagent une structure 3D similaire. Dès lors, pour vérifier que la structure secondaire de la protéine étudiée correspondait à celle des séquences homologues de structures 3D connues, nous n'avons utilisé que le logiciel PHD (Rost et Sander, 1993) disponible sur le réseau Internet (http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html).

La structure secondaire des protéines cristallisées est déterminée par calcul au moyen du logiciel DSSP - Define Secondary Structure of Proteins - (Kabsch and Sander, 1983). Ce logiciel est utilisé sur le système d'exploitation.

La détermination de la structure secondaire se fait à partir d'un algorithme basé principalement sur l'analyse des ponts hydrogènes entre constituants de la protéine.

L'hélice α est définie comme étant une répétition de 4 turns, le turn correspond à la configuration présentant un pont H entre le CO d'un résidu "i" et le NH d'un résidu "i+n", n = 3, 4 ou 5.

Le plan β est défini comme la répétition de "ponts", le pont correspondant à la conformation présentant des résidus non disposés l'un près de l'autre et possédant des ponts H.

9.5. Structure tertiaire :

La réalisation du modèle de la protéine clonée a été réalisé par l'intermédiaire du logiciel Modeller (Sali et Blundell, 1993) utilisé sur le système d'exploitation . Un alignement entre la séquence dont on souhaite déterminer la structure tridimensionnelle et une ou plusieurs séquences dont on connait la structure 3D est soumis à Modeller. Afin de générer le meilleur modèle, l'alignement doit parfois être modifié manuellement en vue de maximiser les identités entre acides aminés dans certaines zones des séquences alignées.

Le logiciel génère différents modèles présentant des variations au niveau des loops et de la conformation des chaînes latérales des acides aminés, mais pas au niveau de la chaîne principale.

Pour notre travail, le nombre de modèles généré par le logiciel a été fixé à 10 par alignements.

Les différents modèles obtenus par Modeller sont vérifiés au moyen des logiciels Prosa 4.0. (Sippl, 1993),Verify 3D (Lüthy *et al.*, 1992) et Anolea (Melo *et al.*, 1997).

Prosa 4.0. est utilisé sur le système d'exploitation. Ce logiciel calcul un profil d'énergie pour la protéine. L'énergie pour chaque résidu est prise à partir d'un potentiel de force moyenne au niveau acide aminé et prend aussi en compte l'exposition au solvant. Les profils obtenus à partir de cette méthode utilisent une fenêtre moyenne entre 20 et 50 acides aminés.

Verify 3D est disponible sur le réseau :
http://www.mbi.ucla.edu/verify3d.html. Ce logiciel fait une évaluation de l'environnement de chaque résidu. Cet environnement est définis par trois paramètres : l'aire du résidu qui est couvert par des autres atomes, la fraction de l'aire de la chaîne latérale qui couverte par des atomes polaires (O et N) et la structure secondaire locale. En utilisant une matrice de préférences, un score pour chaque résidu est déterminé en fonction de l'environnement dans lequel il se trouve.

Anolea (Atomic Non-Local Environment Assessment) est un logiciel développé au laboratoire et disponible sur le réseau:

http://www.fundp.ac.be/pub/ANOLEA.html

Ce logiciel détermine un profil énergétique de la structure de la protéine (d'une façon similaire à Prosa 4.0. mais au niveau atomique) basé seulement sur les interactions non locales des atomes lourds des différents acides aminés. Les valeurs énergétiques de chaques interactions sont prises dans un potentiel de force moyenne au niveau atomique (Melo et Feytmans, 1997). Pour chaque résidu, la somme des énergies non locales de tous ces atomes est réalisée. L'analyse du profil énergétique se fait sur une fenêtre de 5 acides aminés. Les zones de haute énergie (HEZ) sont définies à partir d'une valeur supérieure à zéro unités E/kT. Ces HEZ correspondent soit à des zones d'erreur dans la réalisation du modèle, soit à des zones d'interaction entre protéines (Melo et Feytmans, soumis).

La minimisation d'énergie s'est faite au moyen de Champ de force CVFF du logiciel Discover (versions 2.9.7, MSI). La méthode utilisée est

celle du steepest descents. Le nombre d'itérations a été fixé à 100, la constante diélectrique à 1 et les termes de charge ont été retirés.

La visualisation, manipulation et réalisation des représentations des structures tridimensionnelles de protéines ont été faites sur Insight II (version 95.0, MSI).

Bibliographie

Aiba H., Kato N., Tsuzuki M., and Mizuno T. (1994). Mechanism of gene activation by the *Escherichia coli* positive regulator, OmpR: a mutant defective in transcriptional activation. *FEBS lettr.* **351**: 303-307.

Aiba H., Nakasai F., Mizushima S., and Mizuno T. (1989). Evidence for physiological importance of the phosphotransfer between the two regulatory components, EnvZ and OmpR, in osmoregulation of *Escherichia coli. J.Biol.Chem.* **264**: 14090-14094.

Bourret R.B., Borkovich K.A., and Simon M.I. (1991). Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **60** : 401-441.

Brissette R.E., Tsung K., and Inouye M. (1991). Suppression of a mutation in OmpR at the putative phosphorylation center by a mutant EnvZ protein in *Escherichia coli. J.Bacteriol.* **173** : 601-608.

Brissette R.E., Tsung K., and Inouye M. (1991). Intramolecular second-site revertants to the phosphorylation site mutation in OmpR, a kinase-dependant transcriptional activator in *Escherichia coli. J.Bacteriol.* **173** : 3749-3755.

Brissette R.E., Tsung K., and Inouye M. (1992). Mutations in a central highly conserved non-DNA binding region of OmpR, an *Escherichia coli* transcriptional activator, influence its DNA binding ability. *J.Bacteriol.* **174** : 4907-4912.

Bruix M., Pascual J., Santoro J., Prieto J., Serrano L., and Rico M.. (1993). ^{1}H- and ^{15}N-NMR assignment and solution structure of the chemotactic *Escherichia coli* CheY protein. *Eur.J.Biochem.* **215** : 573-585.

Burbulys D., Trach K.A., and Hoch J.A. (1991). Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* **64** : 545-552.

Csonka L.N. and Hanson A.D. (1991). Prokaryotic osmoregulation : genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45** : 569-606.

Depiereux E., Baudoux G., Briffeuil P., Reginster I., De Bolle X., Vinals C., and Feytmans E. 1997). Match-box server : a multiple sequence alignment tool placing emphasis on reliability. *Cabios*, **13** n°3 : 249-256.

Domian I.J., Quon K.C., and Shapiro L. (1996). The control of temporal and spatial organization during the *Caulobacter* cell cycle. *Current Opinion in Genetics & Development*. **6** : 538-544.

Dunbrack R.L., Gerloff D.L., Bower M., Chen X., Lichtarge O., and Cohen F.E. (1997). Meeting review : the Second Meeting on the Critical Assessment of techniques protein Structure Prediction (CASP2), Asimolar, California, December 13-16, 1996. *Folding & Design* . **2** : 27-42.

Forst S., Comeau D., Norioka S., and Inouye M. (1987). Localisation and membrane topology of EnvZ, a protein involved in osmoregulation of OmpF and OmpC in *Escherichia coli .J.Biol.Chem*. **262** : 16433-16438.

Forst S.,.Delgado J., and Inouye M. (1989). Phosphorylation of OmpR by the osmosensor EnvZ modulates expression of the OmpF and OmpC genes in *Escherichia coli.. Proc.Natl.Acad.Sci.USA* . **86** : 6052-6056.

Forst S.A., and Roberts D.L.. (1994). Signal transduction by the EnvZ-OmpR phosphotransfer system in Bacteria *12th Forum in Microbiology.*

Garin-Bastuji (1993). Brucelloses bovine, ovine et caprine : contrôle et prévention. *Le Point Vétérinaire.* **152** : 15-22.

Hecht G.B., and Newton A. (1995). Identification of a novel response regulator requiered for the swarmer-to-stalked-cell transition in Caulobacter crescentus. *J.Bacteriol.* **177** : 6223-6229.

Hecht G.B., Lane T., Ohta N., Sommer J.M., and Newton A. (1995). An essential single domain response regulator required for normal cell division and differentiation in *Caulobacter crescentus*. *The EMBO Journal.* **16** : 3915-3924.

Kabsch W. and Sander C. (1983). Dictionary of protein secondary structure : pattern recognition of hudrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers,* **22** : 2577-2637.

Lane T., Benson A., Hecht G.B., Butyon G.J., and Newton A. (1995). Switches and signal transduction networsk in the *Caulobacter crescentus* cell cycle. Two-component signal transduction ; **Hoch J.A. Silhavy T.J.** *American Society for Microbilogy.* 403-417.

Lukat G.S., McCleary W.R., Stock A.M., and StockJ.B. (1992). Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* . **89**: 718-722.

Lukat G.S., Stock A.M., and Stock J.B. (1990). Divalent metal ion binding to the CheY protein and its signifiance to phosphotransfer in bacterial chemotaxis. *Biochemestry,* **29** : 5436-5442.

Lüthy R., Bowie J.U., and Eisenberg D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature.* **356** : 83-85.

Melo F. and Feytmans E. (1997). Novel knowledge-based mean force potential at atomic level. *J. Mol. Biol.,* **267** : 207-222.

Melo F. and Feytmans E. (1997). A sensitive method to assess protein structures. Soumis à *J. Mol. Biol.*.

Melo F., Devos D., Depiereux E., and Feytmans E. (1997). ANOLEA : a www server to assess protein structures. *Intelligent systems for molecule biology,* "In press".

Mosimann S., Meleshko R., and James, M.N.G. (1995). A critical assessment of comparative molecular modeling of tertiary structures of proteins. *Proteins : structure, function , and genetics.* **3** : 301-317.

Moy F.J., Lowry D.F., Matsurama P., Dahlquist F.W., Krywko J.E., and Domaille P.J.. (1994) Assignment, secondary structure, global fold, and dynamics of chemotaxis Y protein using three- and four-dimensional heteronuclear (^{13}C, ^{15}N) NMR spectroscopy. *Biochemistry.* **33** : 10731-10742.

Otha N., and Newton A..(1996). Signal transduction in the cell cycle regulation of *Caulobacter* differentiation.*Trends in Microbiology.* **4** (8) : 326-332.

Otha N., Lane T., Ninfa E.G., Sommer J.M., and Newton A. .(1992). A histidine protein kinase homologue requiered for regulation of bacterial cell division and differentiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **89 :** 10297-10301.

Parkinson J.S. (1993) Signal transduction schemes in bacteria. *Cell,* **73** : 857-871.

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

Piggot P.J. (1996). Spore development in *Bacillus subtilis. Current Opinion in Genetics & Development.* **6** : 531-537.

Pratt L.A., and Silhavy T.J.. (1995). Identification of base pairs important for OmpR-DNA interaction. *Mol.Microbiol.* **17**(3) : 565-573.

Pratt L.A., and Silhavy T.J.. (1995). Porin regulon of *Escherichia coli.*. Two-component signal transduction ; **Hoch J.A. Silhavy T.J.** *American Society for Microbilogy.* 105-127.

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.

Sali A. and Blundell T.L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, **234** : 779-815.

Sanders D.A., Gillece-Castro B.L., Burlingame A.L., and Koshland D.E. Jr. (1992) Phosphorylation site of NtrC, a protein phosphatase whose covalent intermediate activates transcription. *J.Bacteriol.*, **174** : 5117-5122.

Shapiro L. and Losick R. (1997). Protein localization and cell fate in bacteria. *Science.* **276** : 712-717.

Sippl M.J. (1993). Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins : structure, fonction, and genetics.* **17 : 355-362.**

Stock A.M., Martinez-Hackert E., Rasmusen B.F., West A.H., Stock J.B., Ringe D., and Petsko G.A.. (1993). Structure of the Mg^{++}-bound form of the CheY protein and mechanism of phosphoryl transfer in bacterial chemotaxis. *Biochemistry.* **32** : 13375-13380.

Stock A.M., Mowbray S.L. (1995). Bacterial chemotaxis : a field in motion. *Current Opinion in structural Biology.* **5** : 744-751.

Stock J.B., Ninfa A.J., and Stock A.M.. (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptative response in bacteria. *Microbiol.Rev.* **53** : 450-490.

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

Strauch M.A., and Hoch J.A. (1993). Signal transduction in *Bacillus subtilis* sporulation. *Current Opinion in Genetics & Development..* **3** : 203-212.

Swanson R.L., Alex L.A., and Simon M.L. (1994). Histidine and aspartate phosphorylation : two-component systems and limits of homology. *Tibs .* **19** : 485-490.